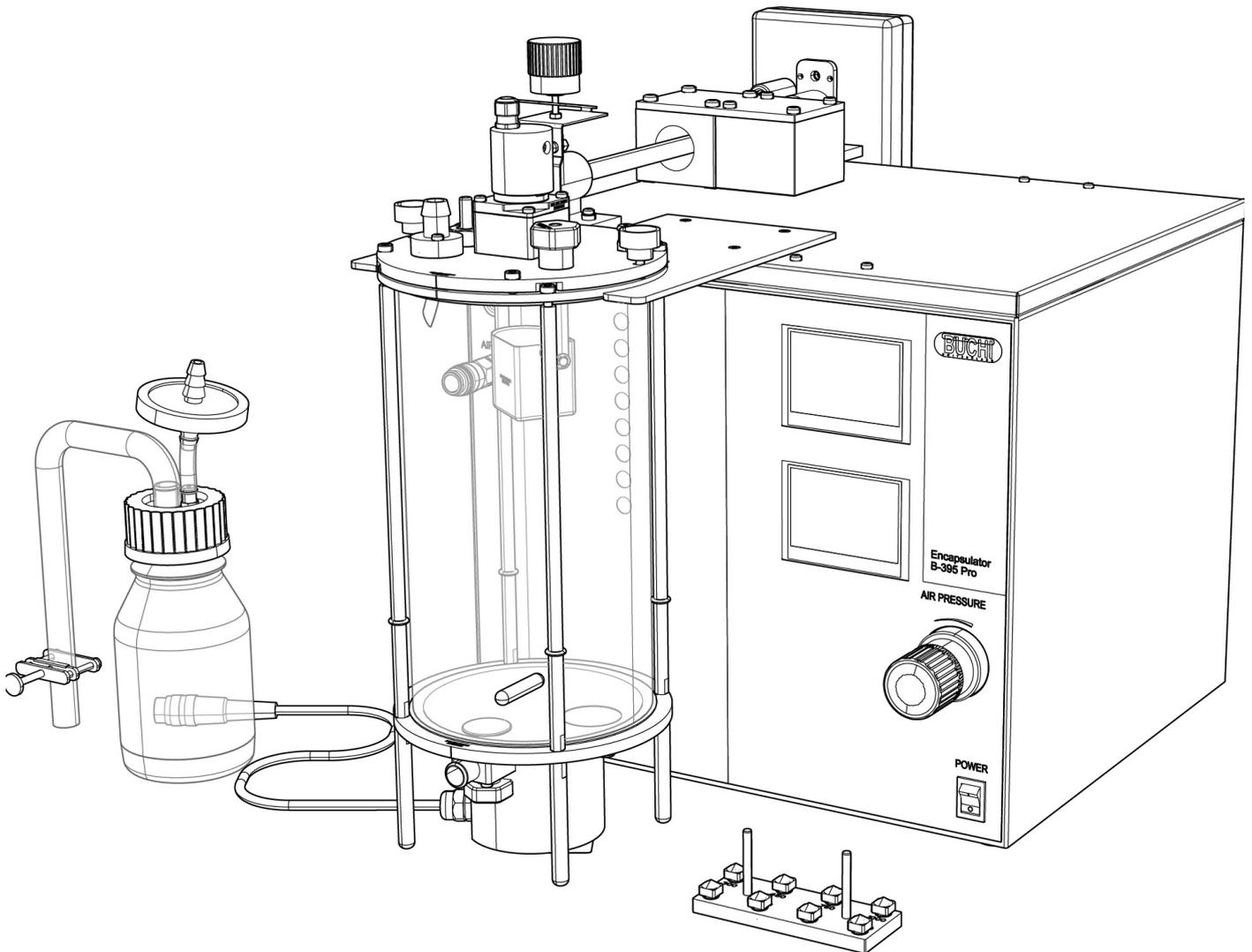




Encapsulator B-395 Pro

Manuale operativo



Note editoriali

Identificazione del prodotto:

Manuale operativo (Originale) Encapsulator B-395 Pro
11593487E it

Data di pubblicazione: 05.2016

BÜCHI Labortechnik AG
Meierseggsstrasse 40
Postfach
CH-9230 Flawil 1

Email: quality@buchi.com

BUCHI si riserva il diritto di apportare modifiche al presente manuale, che si rendessero necessarie in base a future esperienze, soprattutto in relazione alla struttura, alle illustrazioni e ai dettagli tecnici.

Il presente manuale è protetto da copyright. Le informazioni in esso contenute non possono essere riprodotte, distribuite o utilizzate a fini di concorrenza, né essere rese disponibili a terzi. È inoltre vietata la fabbricazione di qualsiasi componente con l'ausilio del presente manuale, senza una preventiva autorizzazione scritta.

Indice

1	Introduzione al manuale	5
2	Sicurezza	6
2.1	Qualifiche degli utenti	6
2.2	Uso corretto	6
2.3	Uso scorretto	6
2.4	Avvertimenti e segnali di sicurezza utilizzati in questo manuale	7
2.5	Sicurezza del prodotto	9
2.5.1	Pericoli generici	9
2.5.2	Misure di sicurezza	10
2.5.3	Componenti e misure di sicurezza integrati	10
2.6	Regole generali di sicurezza	11
2.7	Esclusione di responsabilità	11
3	Dati tecnici	12
3.1	Ambito di applicazione e dotazione di fornitura	12
3.1.1	Strumento standard	12
3.1.2	Accessori standard	13
3.1.3	Accessori opzionali	14
3.1.4	Pezzi di ricambio consigliati	14
3.2	Dati tecnici	15
3.3	Materiali utilizzati	15
4	Descrizione delle funzioni	16
4.1	Principi funzionali	16
4.2	Collegamenti all'Encapsulator B-395 Pro	18
5	Messa in funzione	19
5.1	Luogo di installazione	19
5.2	Installazione dell'Encapsulator B-395 Pro	20
5.3	Collegamenti elettrici	22
5.4	Montaggio del recipiente di reazione	23
5.4.1	Piastra di copertura	24
5.4.2	Piastra di base	28
5.4.3	Beuta di raccolta delle beads	30
5.5	Sistemi di pompaggio	31
5.5.1	Pompa per siringa	31
5.5.2	Bottiglia a pressione	32

Leggere attentamente il presente manuale prima di installare e mettere in funzione il sistema e fare particolare attenzione alle misure di sicurezza riportate nel Capitolo 2. Conservare il manuale nelle immediate vicinanze dello strumento in modo da poterlo consultare in qualsiasi momento.

È vietato apportare modifiche tecniche allo strumento senza una preventiva autorizzazione scritta da parte di BUCHI. Eventuali modifiche non autorizzate possono influire sulla sicurezza del sistema, sulla conformità UE o provocare incidenti.

Il presente manuale è protetto da copyright. Le informazioni in esso contenute non possono essere riprodotte, distribuite o utilizzate a fini di concorrenza, né essere rese disponibili a terzi. È inoltre vietata la fabbricazione di qualsiasi componente con l'ausilio del presente manuale senza una preventiva autorizzazione scritta.

La versione in lingua inglese del manuale è la versione originale ed è alla base di tutte le successive traduzioni in altre lingue.

5.5.3	Installazione della bottiglia a pressione	33
5.6	Opzione: Sistema a ugelli concentrici	34
5.6.1	Montaggio degli ugelli concentrici	36
5.7	Tutti i componenti dell'Encapsulator B-395 Pro	37
5.8	Verifica finale dell'installazione	37
6	Usò	38
6.1	Avvio dello strumento	38
6.2	Schermate principali.	38
6.3	Struttura dei menu dell'unità di controllo.	39
6.4	Funzioni dei menu sullo schermo tattile superiore	40
6.5	Funzioni dei menu sullo schermo tattile inferiore	42
6.5.1	Menu per la calibrazione della pompa per siringa	43
6.5.2	Selezione di una siringa calibrata	44
6.6	Controllo manuale della pressione dell'aria	45
6.7	Uso della pompa per siringa.	46
6.7.1	Calibrazione della pompa per siringa	46
6.7.2	Selezione di una siringa pre-calibrata	46
6.8	Esercitazione pratica con l'Encapsulator utilizzando acqua	47
6.8.1	Uso della pompa per siringa.	47
6.8.2	Uso della bottiglia a pressione.	50
6.9	Esercitazione pratica con l'Encapsulator utilizzando una soluzione di alginati non sterile	53
6.9.1	Preparazione della soluzione di alginato di sodio al 1,5 %	53
6.9.2	Uso della pompa per siringa.	54
6.9.3	Uso della bottiglia a pressione.	57
6.10	Esercitazione pratica con l'Encapsulator con il recipiente di reazione completo	59
6.11	Sterilizzazione a caldo del recipiente di reazione.	61
6.12	Sterilizzazione della bottiglia a pressione.	61
6.13	Processo di incapsulamento per l'immobilizzazione di microrganismi in beads di alginato di calcio.	62
6.14	Protocollo di incapsulamento per membrane alginato-PLL-alginato	64
6.15	Nozioni teoriche	67
6.15.1	Quantità di beads prodotta e densità delle cellule	69
7	Manutenzione e riparazioni.	72
7.1	Assistenza tecnica	72
7.2	Condizioni dell'alloggiamento esterno	72
7.3	Condizioni di tenuta	72
7.4	Pulizia	73
7.4.1	Pulizia dell'ugello dopo ogni ciclo di immobilizzazione	73
7.4.2	Pulizia di un ugello ostruito	74
7.4.3	Pulizia del recipiente di reazione e degli altri recipienti	74
8	Identificazione e soluzione dei problemi	75
8.1	Malfunzionamenti e relative soluzioni	75
9	Smontaggio, conservazione, trasporto e smaltimento	76
9.1	Conservazione e trasporto	76
9.2	Smaltimento.	77
10	Dichiarazioni e requisiti	78
10.1	Requisiti FCC (per USA e Canada)	78
10.2	Dichiarazione in materia di salute e sicurezza	79

1 Introduzione al manuale

Il presente manuale descrive l'Encapsulator B-395 Pro e fornisce tutte le informazioni necessarie per un suo uso sicuro e per mantenerlo in un corretto stato di funzionamento. Il manuale si rivolge soprattutto al personale di laboratorio.

Se lo strumento viene utilizzato con modalità diverse da quelle descritte nel presente manuale, la protezione fornita dallo strumento può essere compromessa.

Abbreviazioni

<i>EPDM</i>	Monomero etilene-propilene-diene
<i>FEP</i>	Fluoroelastomero
<i>PTFE</i>	Politetrafluoroetilene

2 Sicurezza

Il presente capitolo illustra come è stata concepita la sicurezza dello strumento e contiene alcune regole generali di comportamento e le avvertenze relative ai rischi diretti e indiretti connessi all'uso del prodotto.

Per garantire la sicurezza dell'utente, è necessario osservare e attenersi scrupolosamente a tutte le indicazioni di sicurezza e a tutti gli avvisi di sicurezza contenuti nei singoli capitoli. Per questo motivo il presente manuale deve essere sempre a disposizione di tutte le persone che svolgono operazioni in esso descritte.

2.1 Qualifiche degli utenti

Lo strumento può essere utilizzato solo da personale di laboratorio e da persone che, grazie alla formazione ricevuta e all'esperienza professionale, sono a conoscenza dei pericoli che possono verificarsi durante l'uso dello strumento.

Il personale non qualificato o in corso di formazione deve essere sottoposto a una supervisione attenta da parte di un tecnico qualificato. Il presente Manuale Operativo può essere utilizzato come base per la formazione.

2.2 Uso corretto

L'Encapsulator B-395 Pro è stato progettato e prodotto come strumento da laboratorio.

L'Encapsulator B-395 Pro è uno strumento semiautomatico utilizzato per l'incapsulamento polimerico di sostanze chimiche, molecole biologiche, farmaci, aromi e fragranze, pigmenti, estratti, cellule e microrganismi in condizioni operative sterili e non sterili. La formazione delle beads si basa sul fatto che un getto liquido laminare controllato, se sottoposto a vibrazioni a una frequenza ottimale, si suddivide in beads di uguali dimensioni.

L'Encapsulator B-395 Pro è in grado di fornire proprio queste condizioni controllate per creare beads di dimensioni da 0,15 a 2 mm. Lo strumento è particolarmente adatto all'incapsulamento di particelle < 50 µm.

Se lo strumento viene utilizzato con sostanze potenzialmente tossiche o pericolose, deve essere installato all'interno di una cappa aspirante chiusa o di una glove box. In tal caso tutta la lavorazione e la gestione del sistema devono avvenire dentro la camera ventilata, per evitare l'intossicazione e altre situazioni di pericolo per l'utente e l'ambiente.

2.3 Uso scorretto

Le applicazioni non menzionate nel Capitolo 2.2 sono considerate scorrette. Anche le applicazioni non conformi ai dati tecnici (vedi Capitolo 3 del presente manuale) sono considerate scorrette.

La responsabilità per eventuali danni o pericoli provocati dall'uso scorretto ricade esclusivamente sull'operatore.

I seguenti usi sono espressamente vietati:

- Installazione o uso dello strumento in locali che richiedano strumenti a prova di esplosione.

2.4 Avvertimenti e segnali di sicurezza utilizzati in questo manuale

PERICOLO, ATTENZIONE, AVVERTENZA e AVVISO sono indicazioni standard per identificare i livelli di rischio relativi a infortuni alle persone e danni materiali. Tutte le segnalazioni relative agli infortuni alle persone sono accompagnate dal segnale di pericolo generico.

A garanzia della vostra sicurezza è importante leggere e comprendere esattamente la tabella che segue con i diversi segnali e le relative definizioni.

Se- gnale	Tipo di segnalazione	Definizione	Livello di rischio
	PERICOLO	Indica una situazione pericolosa che, se non evitata, provoca la morte o infortuni gravi.	★★★★
	ATTENZIONE	Indica una situazione pericolosa che, se non evitata, potrebbe provocare la morte o infortuni gravi.	★★★☆☆
	AVVERTENZA	Indica una situazione pericolosa che, se non evitata, potrebbe provocare infortuni di entità da lieve a moderata.	★★☆☆☆
no	AVVISO	Indica la possibilità di danni materiali, ma nessuna situazione connessa a infortuni alle persone.	★☆☆☆☆ (solo danni materiali)

È possibile che ulteriori simboli con indicazioni di sicurezza vengano posizionati in un pannello rettangolare a sinistra del tipo di segnalazione e del testo supplementare (vedi esempio seguente).

	 TIPO DI SEGNALAZIONE
Spazio per ulteriori simboli con indicazioni di sicurezza.	Ulteriore testo che descrive il tipo e il livello di pericolo/gravità del rischio. <ul style="list-style-type: none"> • Elenco di misure per evitare il pericolo o la situazione pericolosa qui descritta. • ... • ...

Tabella degli ulteriori simboli con indicazioni di sicurezza

L'elenco di riferimento riportato nel seguito contiene tutti i simboli con indicazioni di sicurezza utilizzati nel presente manuale e il relativo significato.

Simbolo	Significato
	Pericolo generico
	Pericolo elettrico

	Gas esplosivi, ambiente esplosivo
	Dannoso per le forme di vita
	Danni alle apparecchiature
	Gas/aria in pressione
	Indossare un camice da laboratorio
	Indossare occhiali protettivi
	Indossare guanti protettivi

Ulteriori informazioni per gli utenti

I paragrafi con l'intestazione "NOTA" contengono informazioni utili per l'uso dello strumento/software o dei suoi accessori. Le NOTE non sono connesse ad alcun tipo di pericolo o danno (vedi esempio seguente).

NOTA

Suggerimenti utili per facilitare l'uso dello strumento/software.

2.5 Sicurezza del prodotto

Le avvertenze di sicurezza contenute nel presente manuale (descritte nel *Capitolo 2.4*) hanno lo scopo di allertare l'utente e di evitare situazioni pericolose derivanti dal rischio residuo, indicando le contromisure adeguate. Nonostante ciò, se lo strumento è danneggiato o usato in modo scorretto o disattento, possono verificarsi rischi per gli utenti, i beni materiali e l'ambiente.

2.5.1 Pericoli generici

I seguenti avvisi di sicurezza evidenziano i pericoli di natura generica che possono verificarsi quando si utilizza lo strumento. L'utente dovrà attuare tutte le contromisure indicate per raggiungere e mantenere il minore livello di rischio possibile.

Ogni volta che le azioni e le situazioni descritte nel presente manuale sono connesse a determinati pericoli contingenti, verranno forniti ulteriori avvisi di pericolo.

 	 Attenzione
	<p>Morte o infortuni gravi se usato in ambienti esplosivi.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Non utilizzare lo strumento in ambienti esplosivi. • Non utilizzare lo strumento con miscele di gas esplosive. • Prima dell'uso controllare che tutti i collegamenti del gas siano stati installati correttamente. • Eliminare direttamente le fuoriuscite di gas o di sostanze gassose garantendo una ventilazione sufficiente.

 	 Attenzione
	<p>Aumento di pressione nel sistema di alimentazione a causa di ugelli ostruiti.</p> <p>Scoppio del sistema di alimentazione.</p> <p>Morte o avvelenamento grave da contatto o assorbimento delle sostanze pericolose in uso.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pulire gli ugelli immediatamente dopo l'uso, vedi <i>Capitolo 7.4</i>.

	 Attenzione
	<p>Morte o infortuni gravi da contatto con l'alta tensione.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aprire l'alloggiamento esterno del prodotto solo dopo avere spento lo strumento e staccato la spina.

	Avviso
	<p>Rischio di corto circuiti dello strumento e di danni provocati dai liquidi.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Non rovesciare liquidi sullo strumento o su parti di esso. • Asciugare immediatamente qualsiasi liquido. • Assicurarsi che il recipiente dei campioni sia in una posizione sicura. • Non spostare lo strumento mentre è pieno di liquidi. • Proteggere lo strumento da vibrazioni esterne.

 	Avviso
	<p>Rischio di danni allo strumento dovuti ad alimentazione di rete sbagliata.</p> <ul style="list-style-type: none"> • L'alimentazione di rete esterna deve corrispondere alla tensione indicata sulla targhetta del modello. • Controllare che la messa a terra sia sufficiente.

	Avviso
	<p>Rischio di danni alla vetreria e agli utensili da laboratorio durante gli spostamenti dell'unità di pompaggio per la siringa.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Non posare vetreria o altri utensili da laboratorio sull'Encapsulator.

2.5.2 Misure di sicurezza

Indossare sempre i dispositivi di protezione individuale, quali occhiali protettivi, indumenti protettivi e guanti, mentre si lavora con lo strumento.

2.5.3 Componenti e misure di sicurezza integrati

Alta tensione e cariche elettrostatiche

- Limitazione di sicurezza dell'intensità di corrente.
- Collegamento a terra interno per bloccare le cariche elettrostatiche.

Aria/Gas

- Valvola di sovrappressione di sicurezza (si apre a 1,5 bar).

2.6 Regole generali di sicurezza

Responsabilità dell'operatore

Il direttore del laboratorio è responsabile della formazione del personale.

L'operatore dovrà informare tempestivamente il produttore di qualsiasi evento relativo alla sicurezza che si dovesse verificare durante l'uso dello strumento. Attenersi scrupolosamente alle normative di legge, quali norme locali, statali o federali, applicabili allo strumento.

Dovere di cura e manutenzione

L'operatore ha la responsabilità di mantenere lo strumento in uso in buone condizioni e di fare eseguire gli interventi di manutenzione e riparazione tempestivamente e a regola d'arte solo da personale autorizzato.

Pezzi di ricambio da utilizzare

Per la manutenzione utilizzare solo materiali di consumo originali e pezzi di ricambio originali, per garantire buone prestazioni e affidabilità del sistema. Qualsiasi modifica ai pezzi di ricambio utilizzati è ammessa solo previo consenso scritto del produttore.

Modifiche

Qualsiasi modifica allo strumento è ammessa solo previa consultazione e con l'approvazione scritta del produttore. Le modifiche e gli aggiornamenti possono essere eseguiti solo da un tecnico autorizzato BUCHI. Il produttore declina qualsiasi responsabilità per reclami derivanti da modifiche non autorizzate.

2.7 Esclusione di responsabilità

L'uso e la vendita di qualsiasi materiale prodotto con l'Encapsulator è di esclusiva responsabilità dell'operatore.

3 Dati tecnici

Il presente capitolo introduce il lettore allo strumento e alle sue caratteristiche. Contiene la dotazione di fornitura, i dati tecnici, i requisiti e i dati relativi alle prestazioni dello strumento.

3.1 Ambito di applicazione e dotazione di fornitura

L'Encapsulator B-395 Pro è disponibile

- per condizioni operative sterili in un recipiente di reazione chiuso
- con una pompa per siringa integrata.

La dotazione di fornitura può essere verificata solo in base alla singola bolla di consegna e ai numeri d'ordine elencati.

NOTA

Per ulteriori informazioni sui prodotti elencati, consultare il sito www.buchi.com o contattare il rappresentante di zona.

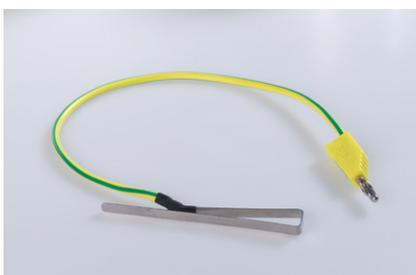
3.1.1 Strumento standard



Tabella 3-1: Strumento standard

Prodotto	N. d'ordine
Encapsulator B-395 Pro 50 – 60 Hz, 100 – 240 V	11058220
Encapsulator B-395 Pro 50 – 60 Hz, 100 – 240 V con documentazione GMP	11058230
Sistema completo Encapsulator B-395 Pro per procedure sterili con pompa per siringa integrata, agitatore magnetico e recipiente di reazione chiuso.	

3.1.2 Accessori standard

**Tabella 3-2: Accessori standard**

Prodotto	N. d'ordine
Recipiente di reazione	11057890
Recipiente di reazione con documentazione GMP	11057879
Reattore completamente sterilizzabile in autoclave in vetro e acciaio inossidabile per la produzione e la raccolta in condizioni sterili di microcapsule, volume operativo 2 litri	
Set di 8 ugelli singoli	11057918
Set di 8 ugelli singoli con foro di alta precisione da 0,08/0,12/0,15/0,20/0,30/0,45/0,75 e 1,00 mm, in acciaio inossidabile 316L, compreso supporto porta-ugelli	
Bottiglia a pressione 500 mL	11058190
Bottiglia a pressione 1.000 mL	11058191
Bottiglie in vetro con accessori, tubi flessibili e filtro dell'aria, pressione operativa fino a 1,5 bar, sterilizzabile in autoclave	
Set di collegamento a terra	11058189
Manuale Operativo in italiano	11593484

3.1.3 Accessori opzionali



Tabella 3-3: Accessori opzionali

Prodotto	N. d'ordine
Set ugelli concentrici	11058051

Set di 7 ugelli esterni con foro di alta precisione da 0,2/0,3/0,4/0,5/0,6/0,7 e 0,9 mm, in acciaio inossidabile, compresa bottiglia a pressione da 1.000 mL

3.1.4 Pezzi di ricambio consigliati

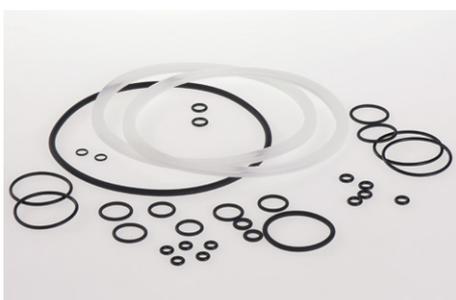
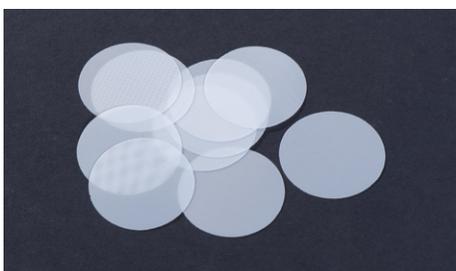


Tabella 3-4: Pezzi di ricambio consigliati

Prodotto	N. d'ordine
Set di guarnizioni (O-ring) per ugelli singoli	11057954
Set di guarnizioni (O-ring) per ugelli concentrici	11057955
Set di guarnizioni (O-ring) per il recipiente di reazione	11057970



Pre-filtri per ugelli, diametro 7 mm (10 pezzi)	11057957
Filtri di drenaggio per recipiente di reazione, diametro 35 mm (10 pezzi)	11057958

3.2 Dati tecnici

Tabella 3-5: Dati tecnici Encapsulator B-395 Pro

Consumo di corrente	max. 150 W	
Tensione allacciata	100 – 240 V AC	
Sbalzi di tensione nell'alimentazione di rete	fino a ± 10 % della tensione nominale	
Frequenza	50/60 Hz	
Fusibile	3,15 A	
Dimensioni (larghezza×altezza×profondità)	32×38×48 cm	
Peso	11 kg	
Diametro ugello per ugelli singoli (= interni)	0,08/0,12/0,15/0,20/0,30/0,45/0,75 e 1,00 mm	
Diametro ugello per ugelli esterni	0,20/0,30/0,40/0,50/0,60/0,70 e 0,90 mm	
Intervallo dimensione beads	da 0,15 a 2,00 mm	
Frequenza della vibrazione	da 40 a 6.000 Hz	
Tensione elettrodo	da 250 a 2.500 V	
Portata pompa per siringa	da 0,01 a 50 mL/min	
Portata pompa aria compressa	da 0,5 a 200 mL/min	
Pressione aria massima ammissibile nel sistema	1,5 bar	
Volume lordo del reattore	4,5 litri	
Volume operativo del reattore	2 litri	
Parti in contatto con il mezzo	sterilizzabili in autoclave	
Condizioni operative sterili	complete	
Categoria di sovratensione	II	
Grado di inquinamento	2	
Condizioni ambientali:		
Temperatura	da 5 a 40 °C	solo per uso in ambienti interni
Altitudine	fino a 2.000 m	
Umidità relativa massima (parametro della curva)	Umidità relativa massima 80 % fino a 31 °C, poi diminuzione lineare al 50 % di umidità relativa a 40 °C	

Tabella 3-6: Materiali e certificazioni

Materiali a contatto con il campione	acciaio inossidabile, silicone, vetro, FEP, PTFE
Certificazioni	CE, CSA

3.3 Materiali utilizzati

Tabella 3-7: Materiali utilizzati

Componente	Descrizione del materiale
Reattore	Acciaio inossidabile, vetro borosilicato 3.3, FEP, PTFE guarnizioni: silicone, EPDM
Ugelli	Acciaio inossidabile, guarnizioni: EPDM
Bottiglia a pressione	Acciaio inossidabile, vetro borosilicato 3.3, FEP, PTFE guarnizioni: silicone, EPDM

4 Descrizione delle funzioni

Il presente capitolo illustra i principi operativi basilari dell'Encapsulator B-395 Pro. Inoltre descrive come è strutturato lo strumento e ne fornisce una descrizione funzionale generale.

4.1 Principi funzionali

Lo strumento fornisce le seguenti funzioni fondamentali:

Condizioni operative sterili in un recipiente di reazione chiuso

- Contenimento sterile in un recipiente di reazione sterilizzabile in autoclave.

Riproducibilità della dimensione delle beads da un ciclo produttivo al successivo

- Alcuni parametri regolabili (dimensione dell'ugello, portata del liquido e frequenza della vibrazione) determinano la dimensione delle beads.

Riproducibilità della formazione delle beads

- Nell'intervallo da 0,15 mm a 2,0 mm.

Elevata uniformità nella dimensione delle beads

- Grazie all'unità di dispersione elettrostatica integrata (*EDU/Electrostatic Dispersion Unit*); deviazione standard relativa del 5 % circa della dimensione delle beads con l'utilizzo di alginati puri.

Controllo del processo immediato

- Monitoraggio visivo tramite lampada a luce stroboscopica.

Elevata vitalità cellulare

- La tecnica di formazione delle beads comporta stress meccanici ridotti e avviene in condizioni fisiologiche, garantendo quindi un'elevata quota di sopravvivenza delle cellule.

Dimensione dei lotti

- Quando si usano le siringhe, la dimensione dei lotti varia tra 2 mL e 60 mL e il volume morto è di circa 0,5 mL. Quando per il pompaggio si usa l'aria compressa, la dimensione dei lotti varia tra 5 mL e 1.000 mL e il volume morto è di circa 2 mL.

Set di 8 ugelli singoli

- Le dimensioni degli 8 ugelli da 0,08/0,12/0,15/0,20/0,30/0,45/0,75 e 1,0 mm permettono di realizzare beads da 0,15 mm a 2,0 mm circa.

Apporto della miscela polimerica

- Tramite pompa per siringa integrata o aria compressa con portate da 70 mL/h (ugello da 0,08 mm) a 2.500 mL/h (ugello da 1,0 mm).

Produzione elevata di beads

- Fino a 6.000 beads prodotte al secondo a seconda delle condizioni di incapsulamento e della miscela polimerica.

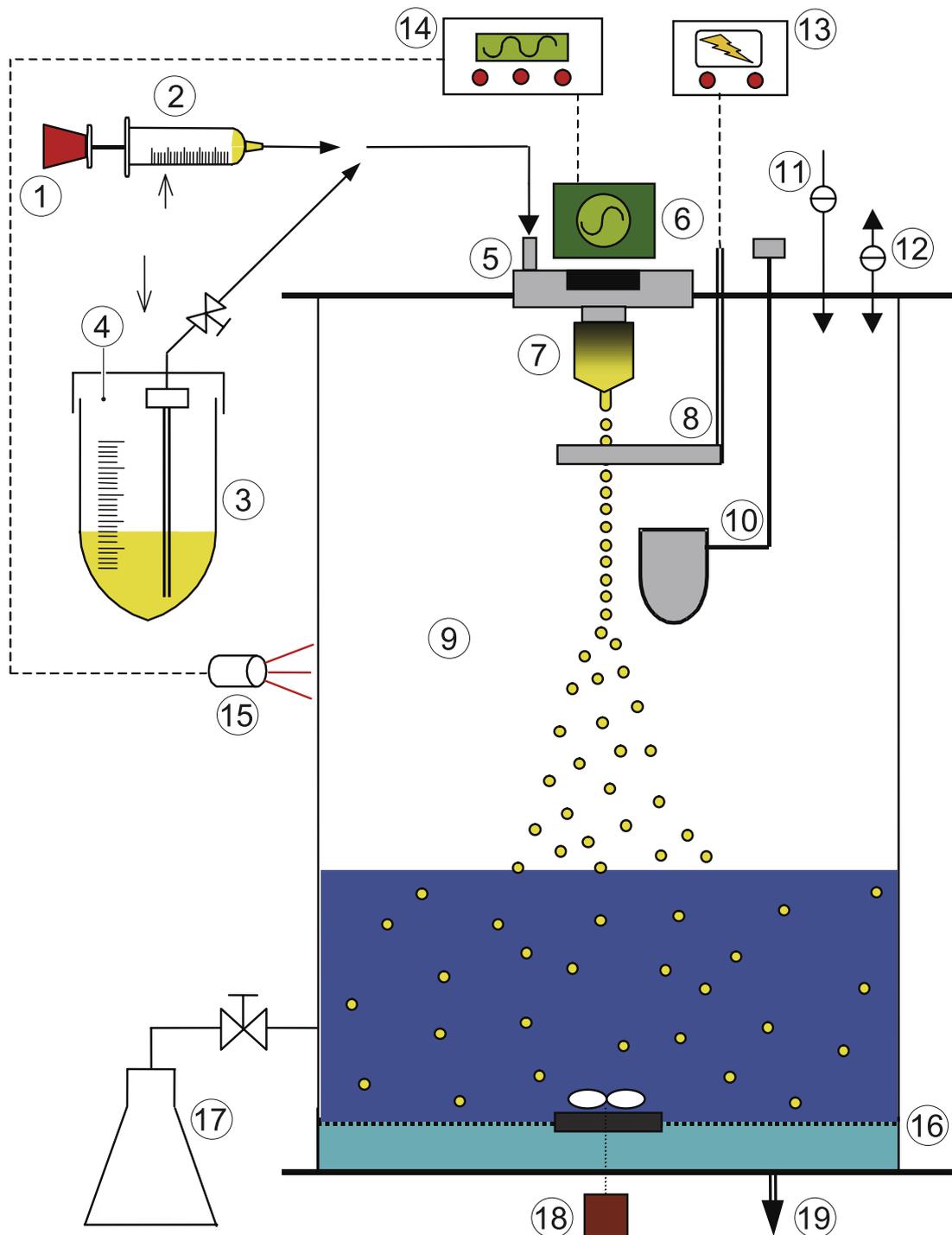


Figura 4-1: Rappresentazione schematica dell'Encapsulator B-395 Pro

- ① Pompa per siringa
- ② Siringa
- ③ Bottiglia a pressione
- ④ Controllo pressione aria
- ⑤ Camera di pulsazione
- ⑥ Sistema di vibrazione
- ⑦ Ugello
- ⑧ Elettrodo
- ⑨ Recipiente di reazione
- ⑩ Vaschetta di bypass

- ⑪ Filtro per liquidi
- ⑫ Filtro dell'aria
- ⑬ Generatore di cariche elettrostatiche
- ⑭ Generatore di frequenza
- ⑮ Lampada stroboscopica
- ⑯ Rete di filtraggio
- ⑰ Beuta di raccolta delle beads
- ⑱ Agitatore magnetico
- ⑲ Scarico

I componenti principali dell'Encapsulator B-395 Pro sono l'unità di controllo, la pompa per siringa, i sistemi elettrico e pneumatico e il recipiente di reazione. Tutti i componenti dello strumento che vengono a contatto diretto con le beads possono essere sterilizzati in autoclave.

Il prodotto da incapsulare (cellule, microrganismi o altre sostanze biologiche e chimiche) viene miscelato con un polimero incapsulante (solitamente alginati), e la miscela viene introdotta in una siringa ② o in una bottiglia a pressione ③, vedi *Figura 4-1*. La miscela polimero/prodotto viene convogliata nella camera di pulsazione ⑤ o tramite la pompa per siringa ① o tramite aria compressa ④. Il liquido passa attraverso un ugello con foro di precisione ⑦ e, all'uscita dall'ugello, si separa in goccioline di uguali dimensioni. Il passaggio di queste goccioline attraverso un campo elettrico tra l'ugello ⑦ e l'elettrodo ⑧ ne carica elettricamente la superficie. Le forze repulsive elettrostatiche disperdono le beads mentre cadono nella soluzione indurente.

Dimensione delle beads

La dimensione delle beads è determinata da diversi parametri, tra i quali la frequenza della vibrazione, l'ampiezza, la dimensione dell'ugello, la portata e le caratteristiche fisiche della miscela polimero/prodotto. In generale il diametro delle beads in alginato di calcio è doppio rispetto al diametro dell'ugello. Variando la velocità del getto e la frequenza della vibrazione, però, l'intervallo può essere regolato di circa $\pm 15\%$.

I parametri ottimali per la formazione delle beads sono indicati tramite visualizzazione in tempo reale della formazione stessa alla luce della lampada stroboscopica ⑮. Quando si raggiungono i parametri ottimali, si vede chiaramente una catena verticale di beads. Una volta stabiliti i parametri ottimali, è possibile preimpostarli per i successivi cicli di produzione di beads con la stessa miscela polimero/prodotto. Le beads non correttamente formate, che si presentano all'inizio e alla fine del ciclo produttivo, vengono intercettate dalla vaschetta di bypass ⑩.

A seconda di una serie di variabili, si possono produrre e raccogliere nella soluzione indurente contenuta nel recipiente di reazione ⑨ da 50 a 5.000 beads al secondo. Le soluzioni nel recipiente di reazione vengono miscelate costantemente con una barra magnetica ⑯ per impedire alle beads di formare dei grumi. Inoltre il recipiente di reazione e/o la soluzione devono essere collegati elettricamente a terra. Al termine del ciclo di produzione la soluzione indurente viene fatta defluire (scarico ⑰), mentre le beads vengono trattenute da una rete di filtraggio ⑱. Altre soluzioni reagenti o di lavaggio vengono aggiunte in condizioni asettiche attraverso un filtro sterile ⑪. Le beads possono essere sottoposte a ulteriori processi produttivi e trasformate in microcapsule o trasferite nell'apposita beuta di raccolta ⑰.

4.2 Collegamenti all'Encapsulator B-395 Pro

Collegamenti sul lato anteriore (vedi *Figura 5-2*)

- Interruttore principale
- Emissione aria
- Tensione
- Collegamento a terra

Collegamenti sul lato posteriore (vedi *Figura 5-1*)

- Alimentazione elettrica
- Immissione aria
- Agitatore magnetico
- Vibrazione
- Presa opzionale

5 Messa in funzione

Il presente capitolo descrive come installare lo strumento e fornisce istruzioni per la prima messa in esercizio.

NOTA

Controllare che lo strumento non presenti danni mentre lo si rimuove dall'imballaggio. Se necessario, predisporre immediatamente un verbale di reclamo per informare l'azienda incaricata del servizio postale, ferroviario o di trasporto. Conservare l'imballaggio originale per eventuali trasporti futuri.

5.1 Luogo di installazione

Posizionare lo strumento su una superficie orizzontale stabile. Tenere in considerazione le dimensioni e il peso massimi del prodotto. Lo strumento deve essere installato in modo che l'interruttore principale e la presa di alimentazione di rete siano facilmente accessibili in qualsiasi momento.

Predisporre le condizioni ambientali descritte al *Capitolo 3.2 "Dati tecnici"*.

 	 Attenzione
	<p>Morte o infortuni gravi se usato in ambienti esplosivi.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Non utilizzare lo strumento in ambienti esplosivi.

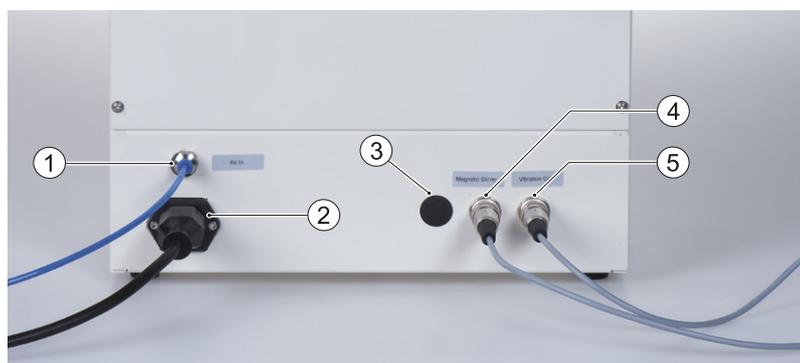
    	 Attenzione
	<p>Morte o avvelenamento grave da contatto o assorbimento di sostanze pericolose.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Indossare occhiali di protezione. • Indossare guanti di protezione. • Indossare un camice da laboratorio. • Pulire accuratamente lo strumento e tutti gli accessori per rimuovere le sostanze potenzialmente pericolose. • Non pulire i componenti impolverati con aria compressa. • Conservare lo strumento e i suoi accessori in un luogo asciutto.

5.2 Installazione dell'Encapsulator B-395 Pro

Posizionare lo strumento sul banco da laboratorio con un comodo accesso alla presa di corrente AC e all'aria compressa. Posizionare lo strumento in modo che sia possibile scollegarlo dalla presa elettrica in qualsiasi momento.

Installazione dell'agitatore magnetico, dell'unità di vibrazione e del cavo di collegamento a terra

Collegare l'agitatore magnetico, l'unità di vibrazione e il cavo di collegamento a terra come indicato nelle *Figure 5-1* e *5-2*.



- ① Immissione aria (tubo blu 2,6×4,0 mm)
- ② Presa alimentazione elettrica con fusibile integrato
- ③ Presa opzionale
- ④ Presa per agitatore magnetico
- ⑤ Presa per l'unità di vibrazione

Figura 5-1: Visuale posteriore dell'unità di controllo

Tutti i sistemi di controllo per la produzione delle beads sono integrati nell'unità di controllo. La frequenza della vibrazione, la velocità della pompa, l'intensità della luce, la dispersione elettrostatica e la velocità dell'agitatore magnetico vengono regolate sui due schermi tattili. La pressione dell'aria è regolata tramite la valvola di regolazione della pressione. La lampada stroboscopica integrata permette di controllare in tempo reale la suddivisione del getto liquido. L'unità di vibrazione è collegata all'unità di controllo sul pannello posteriore tramite un cavo. Il recipiente di reazione è collegato al supporto del reattore con due viti.

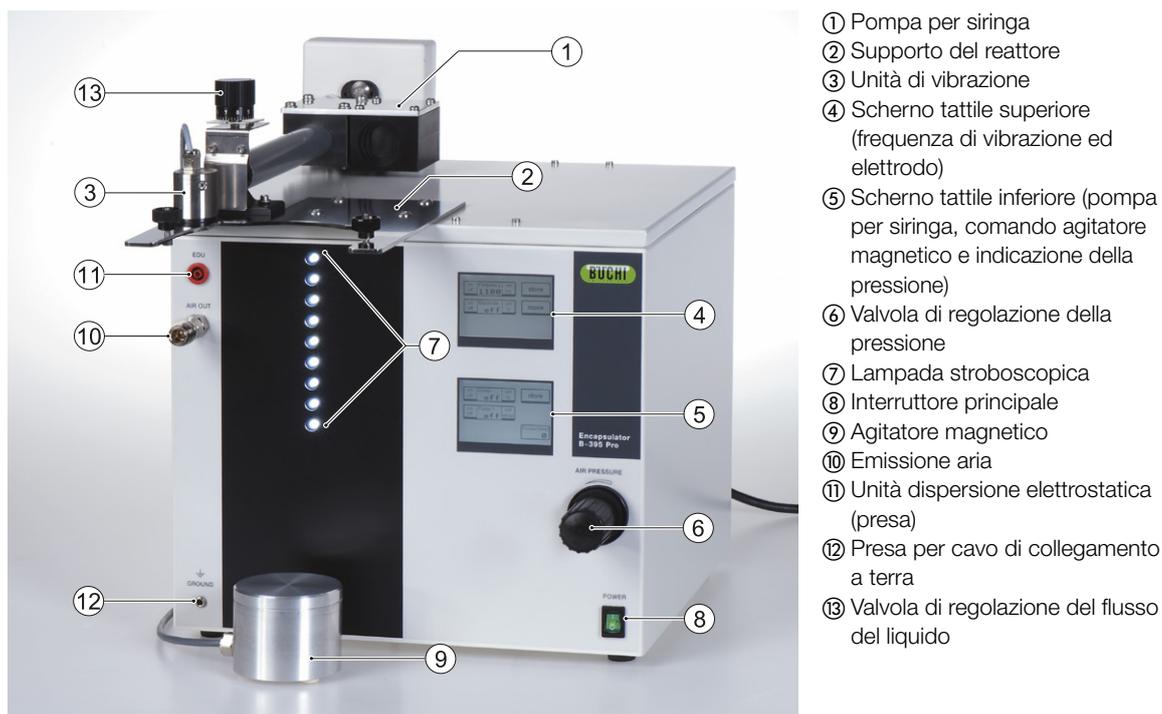


Figura 5-2: Visuale anteriore dell'unità di controllo

Installazione della condotta dell'aria

Ogni Encapsulator è dotato di un tubo flessibile per l'aria da 3 m (2,6×4,0 mm) per il collegamento al sistema esterno dell'aria compressa o azoto.

1. Inserire il tubo dell'aria nella presa di immissione dell'aria.
2. Collegare l'altra estremità del tubo flessibile all'alimentazione esterna del gas.
3. Fornire il gas all'Encapsulator a 1,5 – 2 bar (23 – 30 psi) quando lo strumento è in funzione.

NOTA

Il sistema pneumatico integrato (valvola e accessori) è in grado di sopportare una pressione fino a 7 bar (100 psi) in corrispondenza della presa di immissione dell'aria. Una valvola di sovrappressione di sicurezza, che si apre a 1,5 bar, è integrata a valle della valvola di regolazione della pressione, in modo che la pressione massima dell'aria in uscita sia 1,5 bar. L'intervallo operativo è comunque tra 0 e 1 bar.

5.3 Collegamenti elettrici

Verificare che i requisiti elettrici, indicati sulla targhetta del modello dell'unità di controllo, corrispondano alla tensione della rete elettrica locale. Collegare la presa di alimentazione dell'Encapsulator alla rete elettrica.

 	⚠ Avvertenza
	<p>Rischio di danni allo strumento dovuti ad alimentazione di rete sbagliata.</p> <ul style="list-style-type: none">• L'alimentazione di rete esterna deve corrispondere alla tensione indicata sulla targhetta del modello.• Controllare che la messa a terra sia sufficiente.• Potrebbero essere necessarie ulteriori misure per la sicurezza elettrica, quali interruttori automatici per correnti residue, per soddisfare i requisiti delle normative locali. I collegamenti esterni e le prolunghe devono essere dotati di un conduttore di terra (cavi, spine o accoppiamenti tripolari). Tutti i cavi elettrici utilizzati devono essere dotati di spine pressofuse per evitare rischi dovuti a collegamenti difettosi non a norma.

5.4 Montaggio del recipiente di reazione

Il recipiente di reazione è costituito da un'unità chiusa, sterilizzabile in autoclave, nella quale le beads si formano in condizioni sterili e, se necessario, possono subire ulteriori processi.

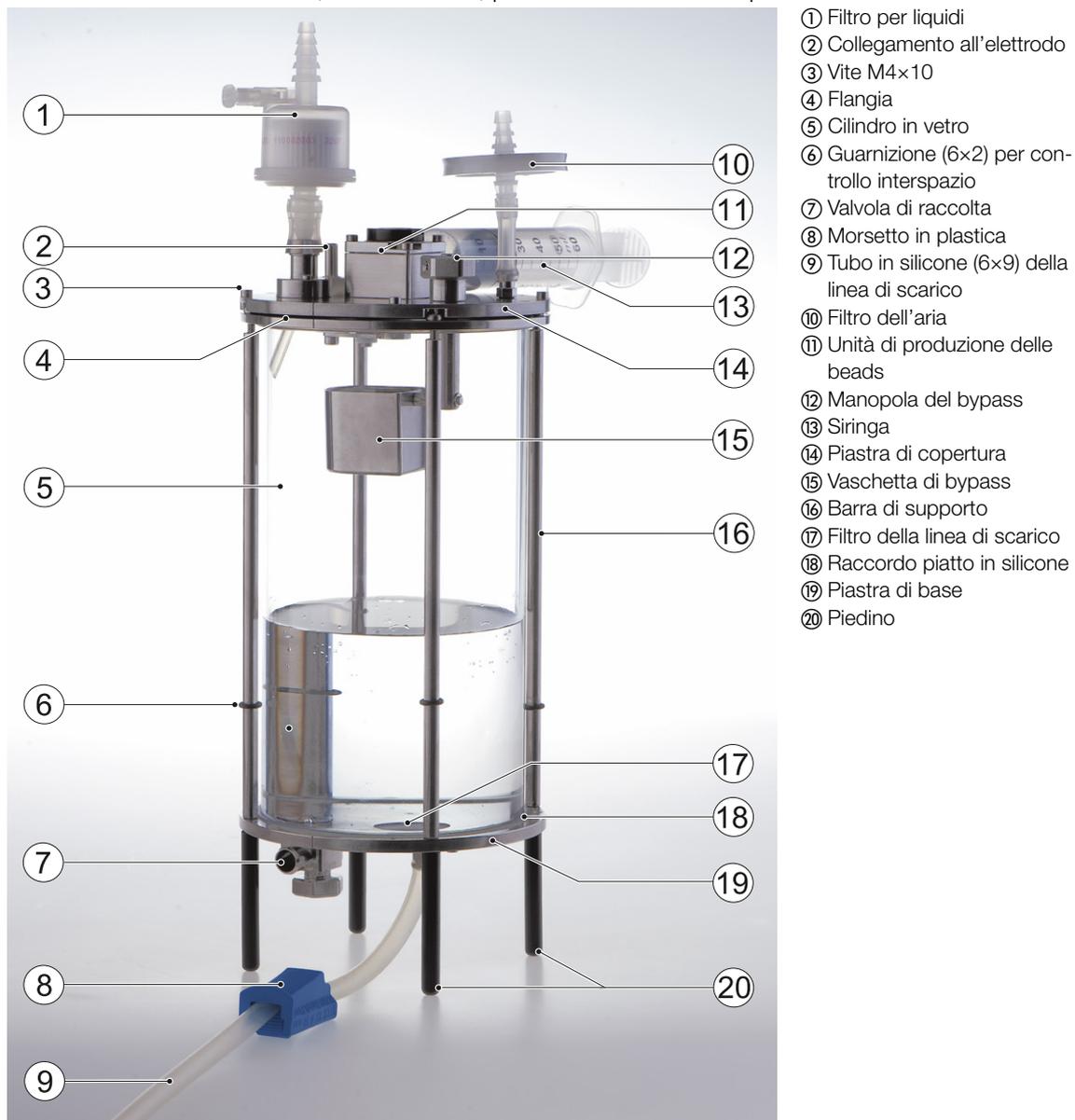


Figura 5-3: Visuale complessiva del recipiente di reazione

I componenti principali del recipiente di reazione sono:

1. Piastra di copertura in acciaio inossidabile con elettrodo, bypass, presa di entrata del liquido e filtro dell'aria
2. Unità di produzione delle beads
3. Ugello
4. Cilindro in vetro
5. Piastra di base in acciaio inossidabile con valvola per beads e di scarico
6. Beuta di raccolta delle beads

5.4.1 Piastra di copertura

La piastra di copertura viene fornita con tutti i componenti già installati. Prima dell'uso lavare accuratamente la piastra di copertura. Dopo ciascun ciclo smontare l'unità di produzione delle beads e l'ugello. Lavare con acqua o con un detergente o solvente adeguato (a seconda del tipo di miscela di immobilizzazione utilizzata), sciacquare con acqua e lasciare asciugare. Fare attenzione a non danneggiare la membrana in PTFE mentre si maneggia l'unità di produzione delle beads.

Gli altri componenti dovrebbero essere smontati solo in caso di necessità. Lavare con un detergente, sciacquare con acqua e lasciare asciugare.

Quando si rimonta, verificare l'integrità dei raccordi piatti e delle guarnizioni ad anello e sostituirli se necessario.

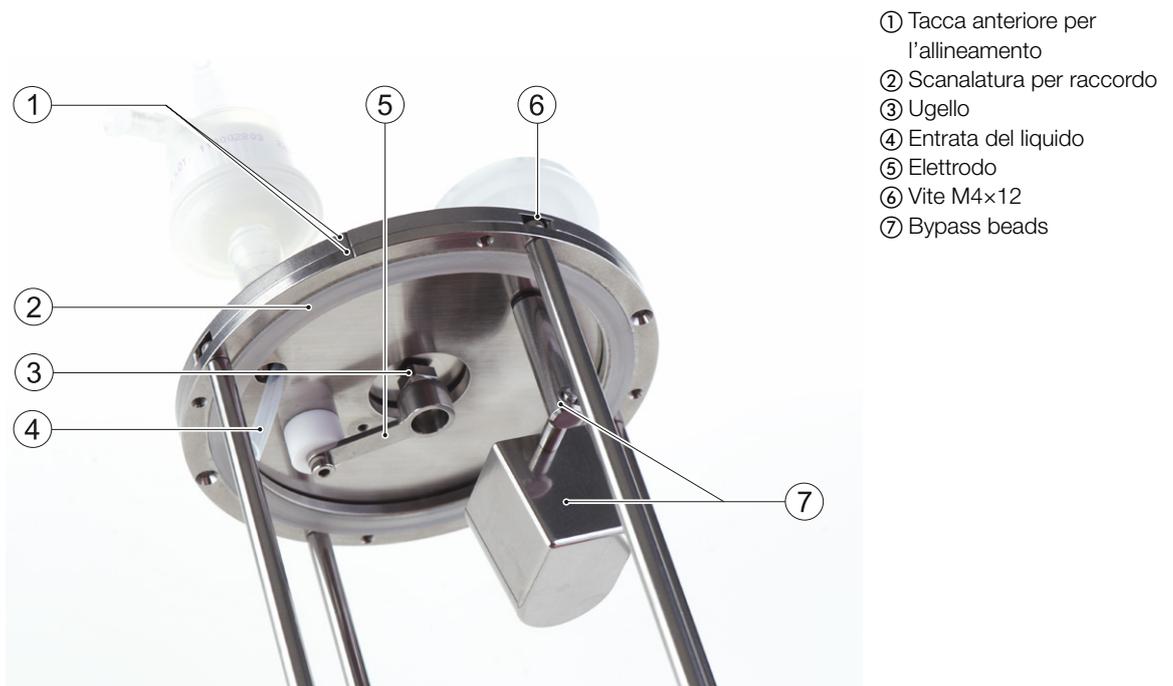


Figura 5-4: Visuale dal basso della piastra di copertura montata

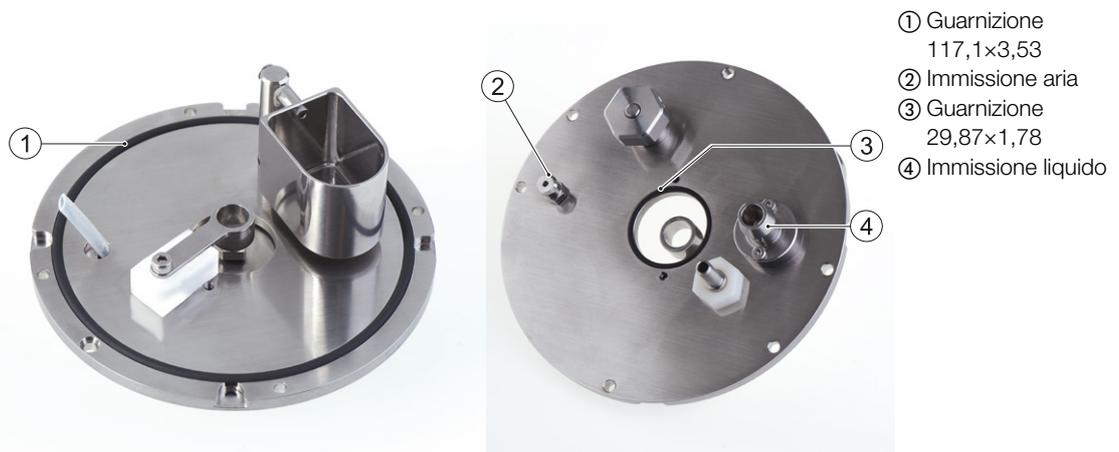
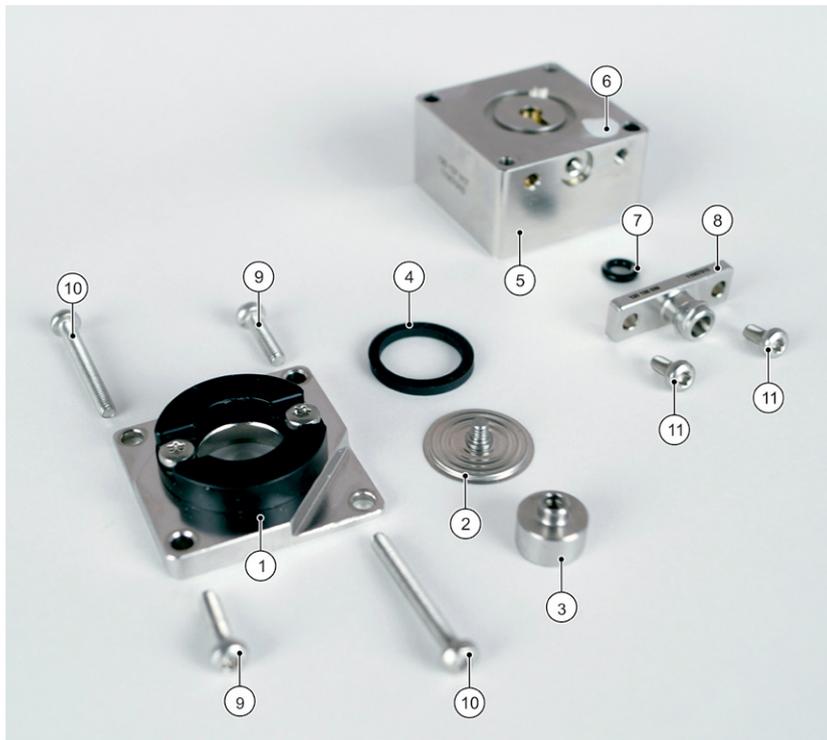


Figura 5-5: Visuale dal basso (sinistra) e dall'alto (destra) della piastra di copertura

5.4.1.1 Unità di produzione delle beads e ugelli



- ① Supporto del magnete *
- ② Membrana
- ③ Magnete
- ④ Guarnizione (14×1,78)
- ⑤ Camera di pulsazione
- ⑥ Pre-filtro con maglia 50 µm
- ⑦ Guarnizione (3,68×1,78)
- ⑧ Raccordo luer lock
- ⑨ Vite M3×8
- ⑩ Vite M3×25
- ⑪ Vite M3×6

*con relativo anello di fissaggio e viti M3×5.
Si può rimuovere l'anello di fissaggio per pulirlo.

Figura 5-6: Componenti dell'unità di produzione delle beads

Un ugello di elevata qualità è un fattore cruciale per garantire l'omogeneità della produzione di beads. I fori negli ugelli dell'Encapsulator sono stati praticati con estrema precisione, utilizzando le tecnologie più avanzate. Ogni Encapsulator B-395 Pro è fornito con un set di 8 ugelli; le dimensioni del foro degli ugelli sono 80, 120, 150, 200, 300, 450, 750 µm e 1,0 mm. Gli ugelli sono interamente in acciaio inossidabile.



Figura 5-7: Set di 8 ugelli sul relativo supporto

Il supporto degli ugelli contiene 8 ugelli (80, 120, 150, 200, 300, 450, 750 µm e 1,0 mm). La dimensione della guarnizione è 4,47×1,78.

5.4.1.2 Elettrodo



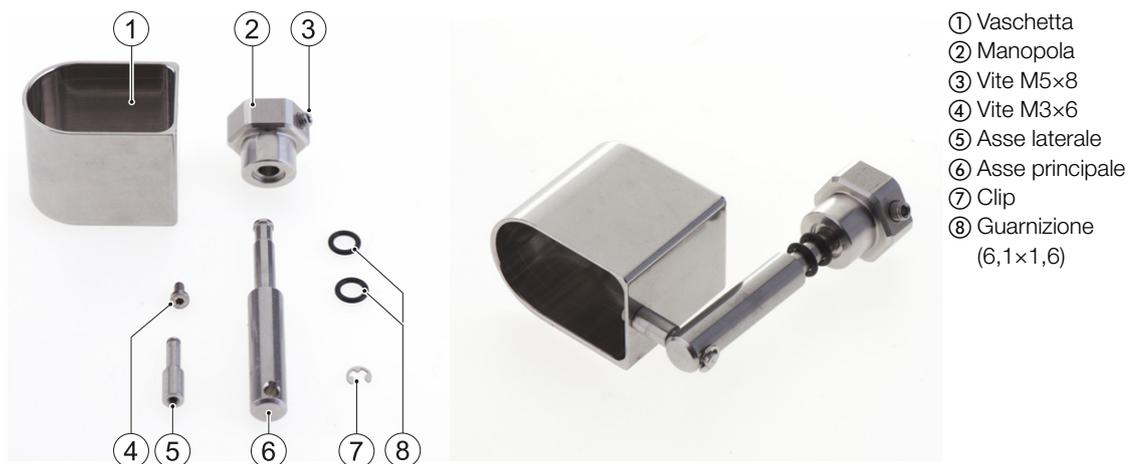
- ① Dado M10 (poliammide)
- ② Guarnizione (10,82×1,78)
- ③ Isolante
- ④ Elettrodo
- ⑤ Elemento di collegamento
- ⑥ Vite M4×12

Figura 5-8: Elettrodo con elementi di collegamento

L'elettrodo è collegato con l'anello allungato rivolto verso il basso o verso l'alto, in modo che la distanza tra l'ugello e l'elettrodo possa essere modificata. Si consiglia la distanza minore tra ugello e elettrodo per la produzione di beads di piccole dimensioni e se si utilizzano soluzioni a bassa viscosità. La distanza maggiore è consigliata per la produzione di beads più grandi (> 800 µm circa). La separazione della bead dal getto liquido dovrebbe avvenire all'interno dell'anello dell'elettrodo, dove il campo elettrostatico è maggiore o, in seconda battuta, nello spazio tra l'elettrodo e l'ugello, a seconda delle caratteristiche del materiale in uso.

5.4.1.3 Sistema di bypass delle beads

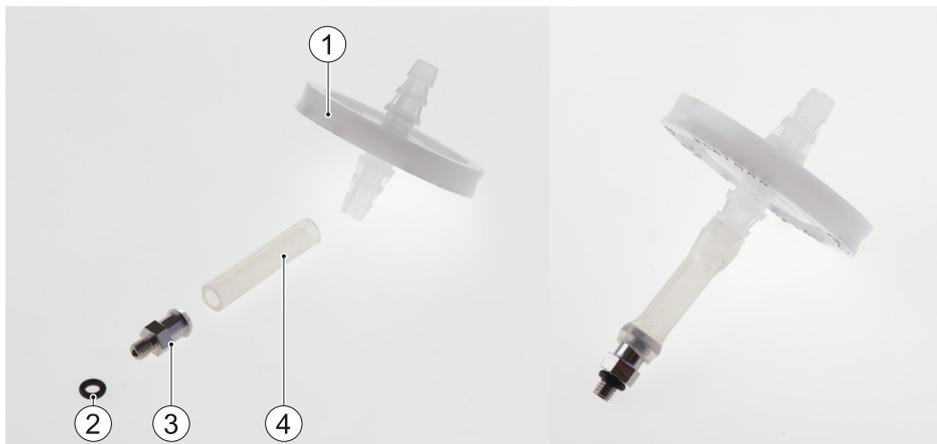
Il sistema di bypass delle beads si usa all'inizio e alla fine del ciclo di incapsulamento, per eliminare le beads scartate prodotte da un flusso instabile.



- ① Vaschetta
- ② Manopola
- ③ Vite M5×8
- ④ Vite M3×6
- ⑤ Asse laterale
- ⑥ Asse principale
- ⑦ Clip
- ⑧ Guarnizione (6,1×1,6)

Figura 5-9: Sistema di bypass delle beads – singoli componenti (a sinistra) e sistema assemblato (a destra)

5.4.1.4 Filtro dell'aria



- ① Filtro dell'aria HEPA
- ② Guarnizione
3,68x1,78
- ③ Nipplo
- ④ Tubo in silicone
5x8 mm

Figura 5-10: Filtro dell'aria – singoli componenti (a sinistra) e assemblato (a destra)

5.4.1.5 Filtro per liquidi



- ① Filtro per liquidi (per es. Sartobran 150)
- ② Immissione liquido
- ③ Tubo in silicone
(3x5) lunghezza
35 mm
- ④ Vite M3x12
- ⑤ Guarnizione
(10,82x1,78)
- ⑥ Tubo in silicone
(10x14), lunghezza
40 mm

Figura 5-11: Filtro per liquidi – singoli componenti (a sinistra) e assemblato (a destra)

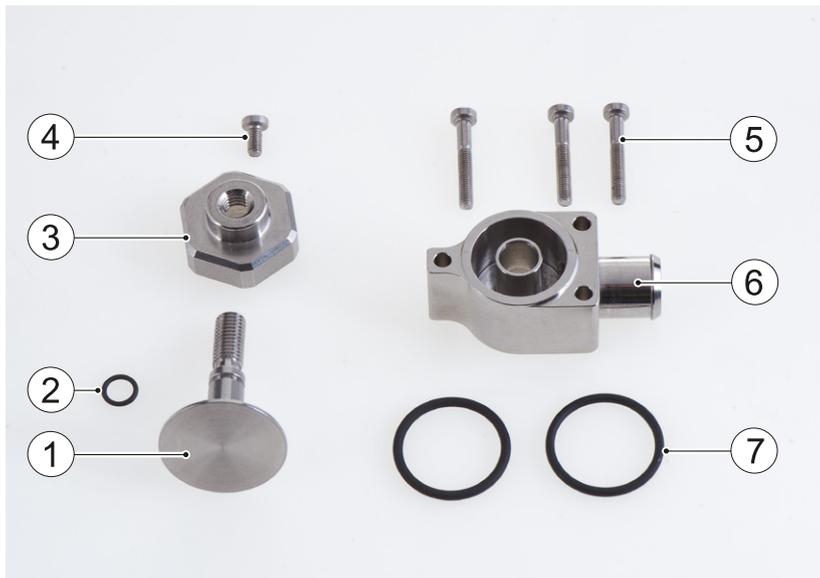
5.4.2 Piastra di base

La piastra di base svolge una doppia funzione, avendo due punti di scarico. Uno è dotato di un filtro per trattenere le beads nel recipiente di reazione mentre si sostituiscono i reagenti di incapsulamento e l'altro è una valvola di scarico per raccogliere le beads senza comprometterne la sterilità.



Figura 5-12: Piastra di base, visuale dall'alto (in alto) e dal basso (in basso)

5.4.2.1 Valvola di scarico delle beads



- ① Stantuffo
- ② Guarnizione (5×1)
- ③ Manopola per la valvola
- ④ Vite M3×6
- ⑤ Vite M3×20
- ⑥ Valvola di raccolta (BT 14)
- ⑦ Guarnizione (18,77×1,78)

Figura 5-13: Componenti della valvola di scarico delle beads

5.4.2.2 Sistema di deflusso dei liquidi



- ① Piastra di deflusso dei liquidi
- ② Guarnizione (34,65×1,78)
- ③ Vite M3×6
- ④ Filtro a rete, diametro 35 mm, maglia da 100 µm

Figura 5-14: Componenti del sistema di scarico dei liquidi

NOTA

La rete del filtro si stringe di 1 % – 2 % durante il primo passaggio in autoclave. In seguito la dimensione rimane stabile.

5.4.3 Beuta di raccolta delle beads

Al termine del ciclo di produzione e di lavorazione, le beads vengono trasferite direttamente, attraverso la *valvola di raccolta delle beads*, nella beuta di raccolta. Successivamente le beads possono essere trasferite in condizioni asettiche in qualsiasi altro contenitore. La *Figura 5-15* presenta la beuta di raccolta delle beads smontata e montata.



Figura 5-15: Beuta di raccolta delle beads per la raccolta e il trasporto in condizioni sterili delle beads e della capsula prodotte. La beuta di raccolta delle beads è collegata alla valvola di raccolta delle beads del recipiente di reazione.

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| ① Beuta da 250 mL | ⑤ Piastra della beuta di raccolta |
| ② Filtro dell'aria, vedi Fig. 5-10 | ⑥ Guarnizione (31,42×2,62) |
| ③ Morsetto per tubo | ⑦ Tappo forato |
| ④ Tubo in silicone 10×14 | |

5.5 Sistemi di pompaggio

L'Encapsulator B-395 Pro è dotato di due sistemi per il pompaggio della miscela di immobilizzazione:

- tramite pompa per siringa volumetrica
- tramite aria compressa dalle bottiglie a pressione

La pompa per siringa è utilizzata principalmente:

1. per piccoli volumi (< 60 mL),
2. se la portata del liquido deve essere controllata molto accuratamente durante ogni ciclo,
3. se è necessario un volume morto molto ridotto (circa 0,5 mL).

Si consiglia il pompaggio con aria compressa:

1. se sono necessari volumi grandi (> 60 mL),
2. se si devono utilizzare portate elevate per produrre beads di grandi dimensioni, come per esempio quando si impiegano ugelli > 300 μm .

Entrambi i sistemi possono essere utilizzati con il sistema a ugelli concentrici. Il liquido interno viene pompato con la pompa per siringa, mentre il liquido esterno viene pompato tramite aria compressa. Ovviamente si possono usare due bottiglie a pressione, dividendo la linea dell'aria che alimenta le bottiglie con un raccordo a "T" o a "Y".

5.5.1 Pompa per siringa

La pompa per siringa viene utilizzata come sistema di alimentazione volumetrico. Si tratta di una pompa che fornisce la miscela di immobilizzazione con estrema precisione. Si può utilizzare la maggior parte delle marche di siringhe in plastica. (È sconsigliato l'uso di siringhe in vetro.) Ciascun tipo di siringa può essere calibrato separatamente utilizzando il sistema integrato di calibrazione (vedi Capitolo 6 "Uso"). La disponibilità di siringhe pre-sterilizzate rende più semplice il lavoro in condizioni asettiche.

La portata di pompaggio può variare da 0,01 mL/min a 50 mL/min a seconda delle dimensioni della siringa.

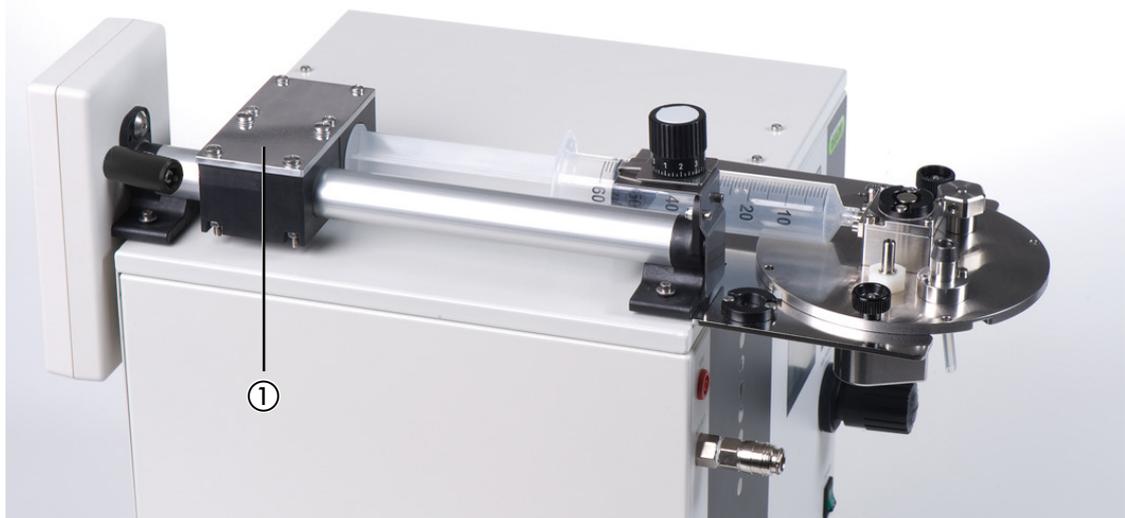


Figura 5-16: Pompa per siringa

La siringa è collegata all'unità di produzione delle beads con il raccordo luer lock. Lo stantuffo della siringa viene spinto dal braccio mobile della pompa ①.

5.5.2 Bottiglia a pressione

La bottiglia a pressione è un contenitore sterilizzabile in autoclave, utilizzato per pompare la miscela di immobilizzazione tramite aria compressa. La Figura 5-17 presenta i diversi componenti della bottiglia a pressione.



Figura 5-17: Bottiglia a pressione con filtro HEPA per pompaggio sterile della miscela di immobilizzazione tramite aria compressa

- | | |
|--|--|
| ① Bottiglia resistente alla pressione da 500 mL o 1.000 mL | ⑥ Raccordo luer lock maschio, diametro interno 4,8 mm |
| ② Filtro dell'aria HEPA | ⑦ Nipplo per innesto rapido |
| ③ Tubo flessibile in PTFE (4x6) | ⑧ Coperchio a due vie |
| ④ Tubo flessibile in silicone per il liquido (4x7) | ⑨ Coperchio con accessorio in PTFE per tubi flessibili da 6 mm |
| ⑤ Tubo flessibile in silicone per l'aria (5x8) | |

L'**aria** passa attraverso un tubo in silicone con diametro interno di 5 mm (5x8 mm). Il filtro HEPA impedisce la contaminazione della miscela di immobilizzazione sterile e dovrebbe essere sostituito in conformità alle istruzioni del produttore o se si notano segni di un passaggio d'aria ridotto.

Il **liquido** passa dall'interno della bottiglia, attraverso un tubo in PTFE (3x6 mm), al tubo in silicone ④ al di fuori della bottiglia. Questo tubo in silicone è collegato all'unità di produzione delle beads con il raccordo luer lock maschio ⑥.

5.5.3 Installazione della bottiglia a pressione



Figura 5-18: Bottiglia a pressione installata

1. Assemblare e – se necessario – sterilizzare in autoclave la bottiglia a pressione.
2. Riempire la bottiglia con la miscela di immobilizzazione.
3. Collegare il tubo in silicone della bottiglia a pressione all'ingresso del raccordo luer lock sull'unità di produzione delle beads.
4. Passare il tubo in silicone nella valvola di regolazione della portata del liquido. Schiacciarlo in modo che non possa passare alcun liquido.
5. Inserire il raccordo ⑦ del tubo dell'aria nell'innesto rapido dell'uscita dell'aria sull'unità di controllo.

5.6 Opzione: Sistema a ugelli concentrici

Il sistema a ugelli concentrici (sistema CN) è un kit opzionale disponibile in aggiunta a quello a ugello singolo ed è progettato per la produzione di capsule in un unico passaggio operativo. Il sistema è costituito da un'unità di produzione di beads CN, da un set di 7 ugelli esterni (0,20/0,30/0,40/0,50/0,60/0,70 e 0,90 mm) e da una bottiglia a pressione da 1.000 mL. Il liquido della parte esterna viene pompato tramite aria compressa utilizzando la bottiglia a pressione.



I componenti principali dell'unità a ugelli concentrici sono i seguenti (vedi *Figura 5-20*):

- la coppia di ugelli con ugello esterno ① e interno ②,
- l'unità di produzione di beads con sistema CN con la relativa camera di pulsazione ③ e supporto per il magnete ④.

Figura 5-19: Formazione delle beads

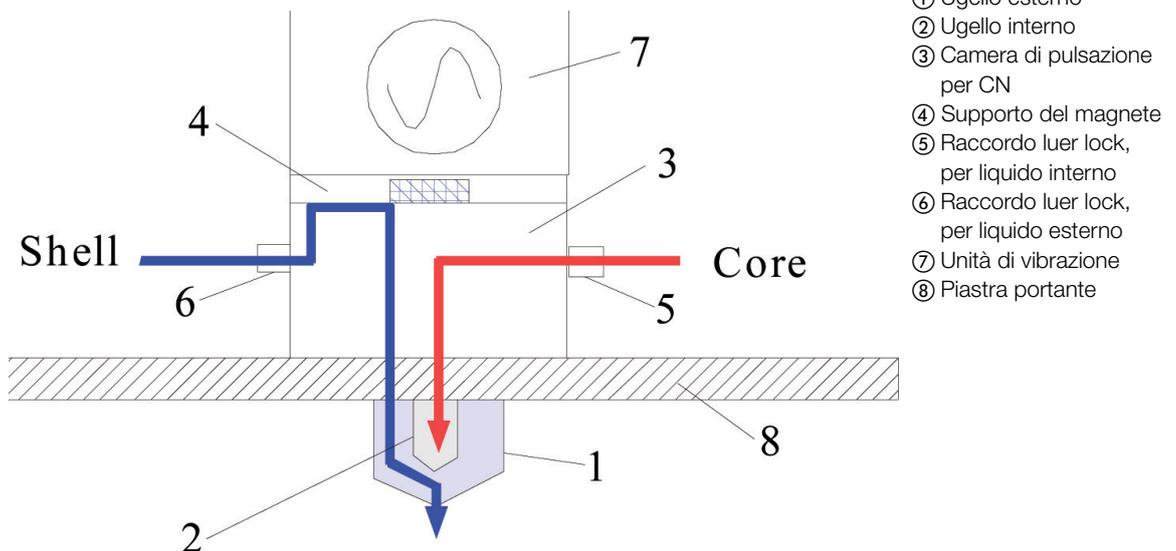


Figura 5-20: Rappresentazione schematica del sistema a ugelli concentrici



Figura 5-21: Unità di produzione di beads con sistema CN con set di 7 ugelli esterni. Gli ugelli sono disponibili con i seguenti fori standard: 0,20/0,30/0,40/0,50/0,60/0,70 e 0,90 mm.

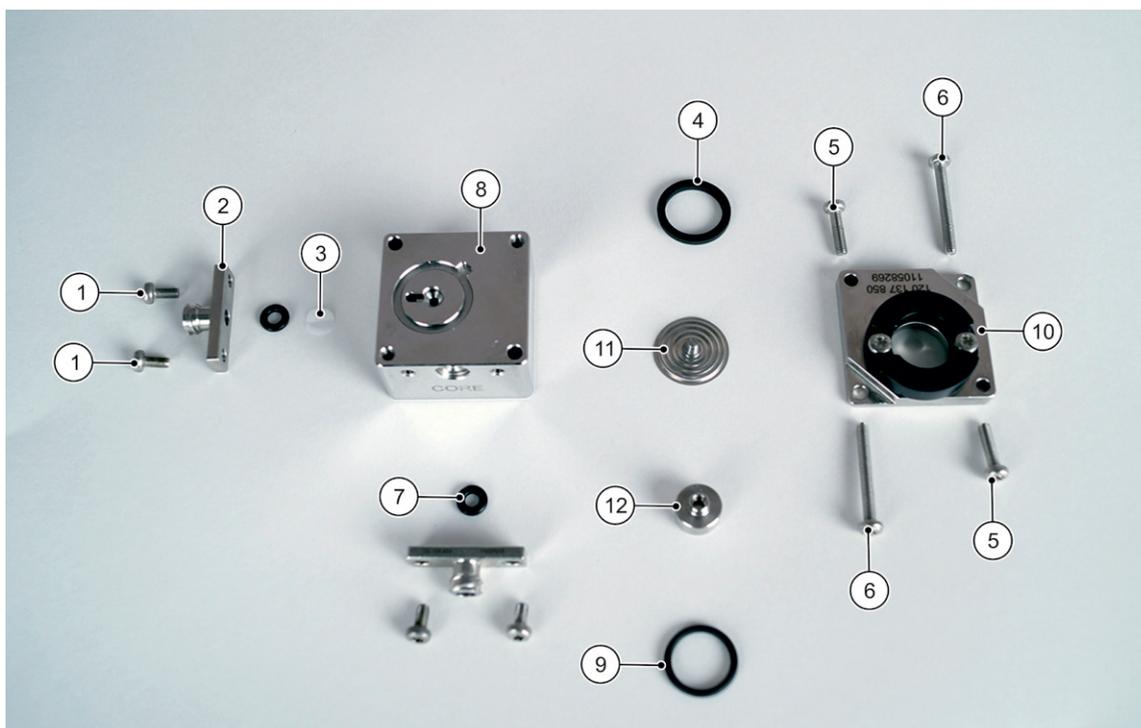
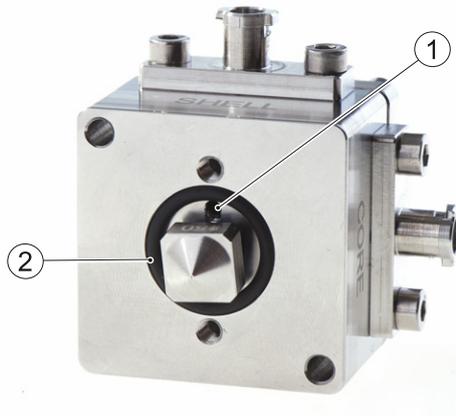


Figura 5-22: Componenti singoli dell'unità di produzione di beads con sistema CN

- | | |
|--|-------------------------------|
| ① Vite M3×6 | ⑦ Guarnizione 3,68×1,78 |
| ② Raccordo luer lock femmina | ⑧ Camera di pulsazione per CN |
| ③ Pre-filtro con maglia 50 µm, D= 7 mm | ⑨ Guarnizione 12,42×1,78 |
| ④ Guarnizione 14,0×1,78 | ⑩ Supporto membrana per CN |
| ⑤ Vite M3×8 | ⑪ Membrana |
| ⑥ Vite M3×25 | ⑫ Magnete |

5.6.1 Montaggio degli ugelli concentrici



Posizionare la guarnizione 12,42×1,78 nella scanalatura dell'unità di produzione di beads con sistema CN. Posizionare l'ugello interno (con la relativa guarnizione) nel foro dell'unità di produzione di beads CN. Non vi è alcuna filettatura. L'ugello interno viene centrato e fissato dall'ugello esterno.

- ① Uscita del liquido esterno
- ② Guarnizione 12,42×1,78

Figura 5-23: Montaggio dell'ugello interno



Inserire con attenzione l'ugello esterno sopra a quello interno. Collegare l'ugello esterno con due viti (M3×6). L'ugello esterno centra e fissa l'ugello interno.

Figura 5-24: Montaggio dell'ugello esterno



Figura 5-25: Installazione del sistema CN con una pompa per siringa e una bottiglia a pressione

5.7 Tutti i componenti dell'Encapsulator B-395 Pro



Figura 5-26: Immagine con tutti i componenti dell'Encapsulator B-395 Pro

5.8 Verifica finale dell'installazione

Questa verifica deve essere effettuata al termine di ciascuna installazione e prima di iniziare il primo processo di incapsulamento. Tutte le fonti di alimentazione (per esempio tensione di rete, pressione del gas) devono corrispondere ai dati tecnici del sistema installato o dell'impostazione del sistema.

- Verificare l'integrità di tutti i componenti in vetro.
- Verificare che tutti gli altri collegamenti elettrici, quali componenti opzionali o esterni, per esempio agitatore magnetico, unità di vibrazione, pompa per siringa, cablaggio, siano connessi correttamente.

6 Uso

Il presente capitolo fornisce una serie di esempi di applicazioni tipiche dello strumento e le istruzioni su come utilizzare lo strumento in modo corretto e sicuro. Vedi anche il *Capitolo 2.5 "Sicurezza del prodotto"* per le avvertenze di carattere generale.

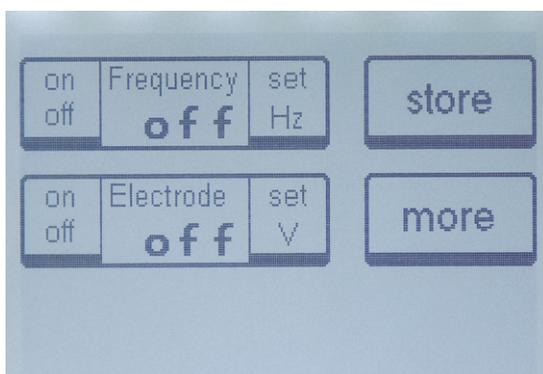
6.1 Avvio dello strumento

- Assicurarsi che l'Encapsulator B-395 Pro sia collegato correttamente all'alimentazione elettrica di rete.
- Effettuare una verifica finale dell'installazione (vedi *Capitolo 5.8*) prima di ciascun ciclo di produzione di beads.
- Accendere l'Encapsulator B-395 Pro. Il sistema esegue un controllo interno.

6.2 Schermate principali

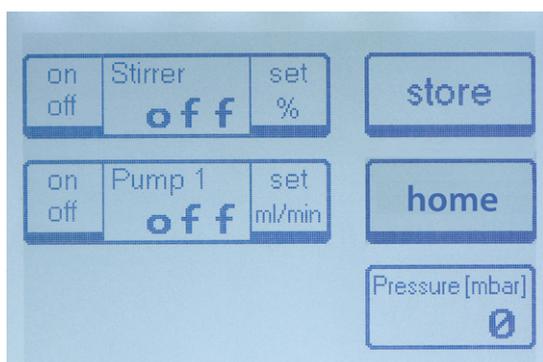
Tutti i sistemi di controllo per la produzione delle beads sono integrati nell'unità di controllo. La vibrazione, la velocità della pompa, l'intensità della luce e la dispersione elettrostatica vengono regolate sui due schermi tattili. La pressione dell'aria è regolata tramite la valvola di regolazione della pressione. La lampada stroboscopica integrata permette di controllare in tempo reale la suddivisione del getto liquido.

Al termine del controllo interno del sistema, i due schermi tattili presentano le seguenti schermate principali:



Schermata 6-1: Schermo tattile superiore

Lo schermo tattile superiore serve per regolare la frequenza della vibrazione e la tensione dell'elettrodo.



Schermata 6-2: Schermo tattile inferiore

Lo schermo tattile inferiore serve per regolare la pompa per la siringa e la velocità dell'agitatore magnetico.

Anche la pressione dell'aria è visualizzata su questa schermata, ma viene regolata manualmente tramite la valvola di regolazione della pressione.

NOTA

Le icone con una barra spessa sul bordo inferiore, per esempio  attivano/disattivano un processo o portano a un'altra schermata.

6.3 Struttura dei menu dell'unità di controllo

La seguente figura presenta una panoramica schematica di tutti i menu dell'Encapsulator B-395 Pro, ciascuno con le funzionalità disponibili.

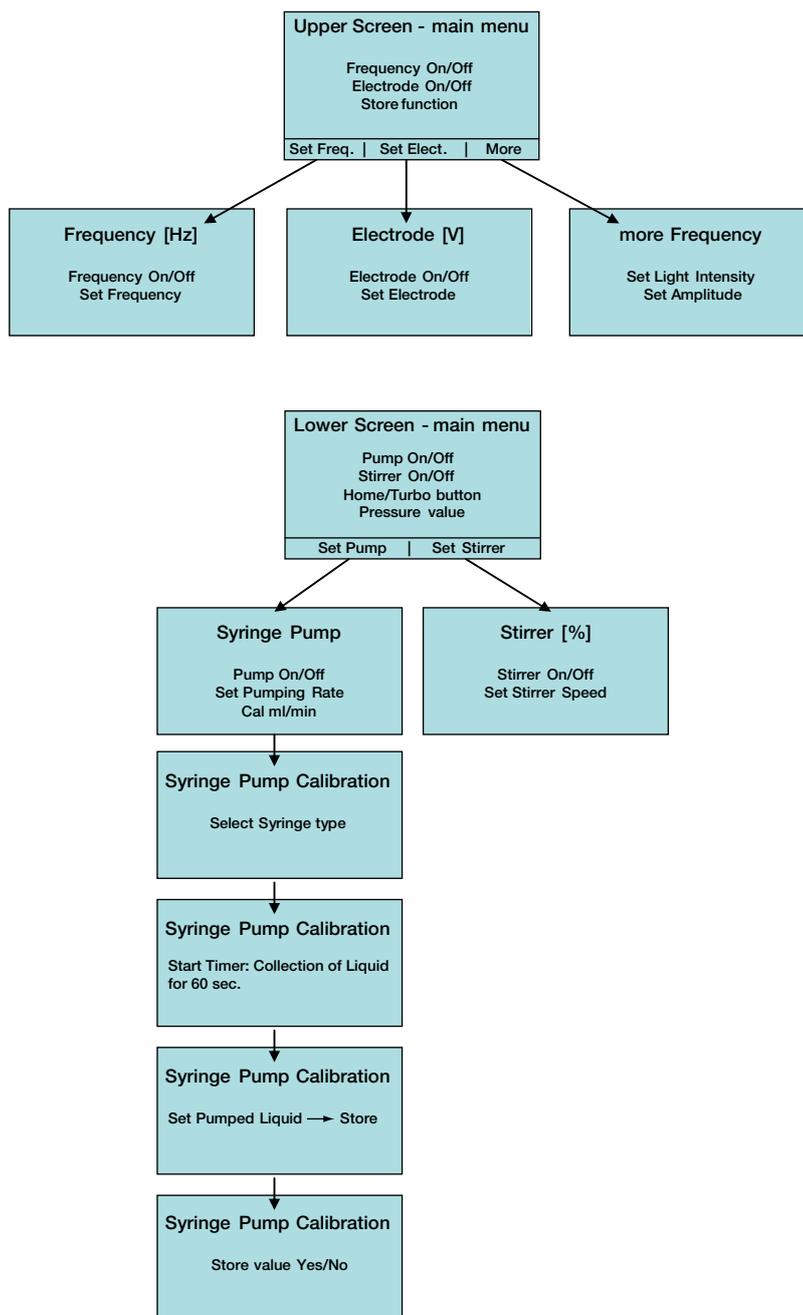
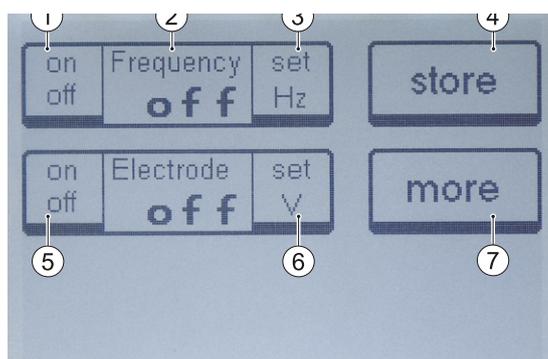


Figura 6-1: Struttura dei menu dell'unità di controllo

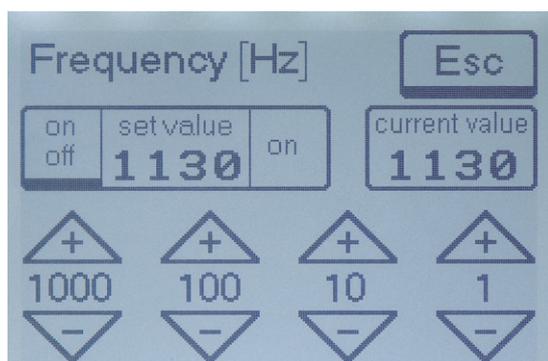
6.4 Funzioni dei menu sullo schermo tattile superiore

Vibrazione (frequenza e ampiezza), dispersione elettrostatica (tensione) e intensità della luce della lampada stroboscopica vengono impostate sullo schermo tattile superiore. Quando si accende l'Encapsulator, lo schermo tattile avvia un programma di inizializzazione della durata di alcuni secondi. Lo schermo visualizza il menu di avvio (*Schermata 6.3*) con tre sottomenu (vedi *Schermate 6-4 – 6-6*) per la frequenza, l'elettrodo e ulteriori opzioni riguardanti la frequenza e l'intensità della luce.



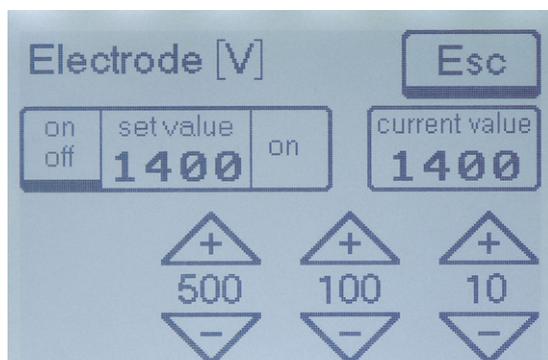
- ① Interruttore on/off per l'impostazione della frequenza.
- ② Indicazione del parametro e dello stato di impostazione (valore o off).
- ③ Pulsante per il passaggio alla schermata 6-4 per l'impostazione dei parametri di frequenza.
- ④ Pulsante per salvare i valori impostati: premere due volte in un secondo. Un segnale acustico indica che i valori sono stati salvati.
- ⑤ Pulsante on/off per l'impostazione dell'elettrodo.
- ⑥ Pulsante per il passaggio alla schermata 6-5 per l'impostazione dei parametri dell'elettrodo.
- ⑦ Pulsante per il passaggio alla schermata 6-6 per l'impostazione di ulteriori parametri di frequenza.

Schermata 6-3: Menu di avvio sullo schermo tattile superiore



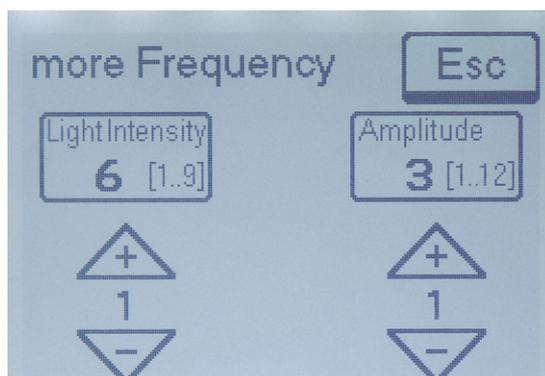
Schermata 6-4: Regolazione della frequenza

La regolazione della frequenza genera le oscillazioni di corrente previste nell'unità di vibrazione. Premendo i pulsanti (+) e (-) si modifica la frequenza. Premendo il pulsante "on/off" si attiva o disattiva la frequenza. Premendo "Esc" si ritorna al menu di avvio e si mantiene il valore impostato.



Schermata 6-5: Unità di dispersione elettrostatica

L'unità di dispersione elettrostatica serve per caricare elettricamente la superficie delle beads. Le forze repulsive indotte dalle superfici con carica uguale impediscono alle beads di scontrarsi le une con le altre, sia mentre si disperdono sia mentre entrano nella soluzione indurente. La tensione applicata varia spesso tra 500 e 2.000 V, principalmente a seconda della dimensione delle beads e della velocità del flusso del liquido. In questo modo l'Encapsulator B-395 Pro è normalmente in grado di produrre lotti di beads con un tasso di omogeneità superiore al 95 %. Premendo i pulsanti (+) e (-) si modifica il parametro della dispersione elettrostatica. Il sistema ha bisogno di alcuni momenti per raggiungere il valore impostato. Premendo "Esc" si ritorna al menu di avvio e si mantiene il valore impostato.

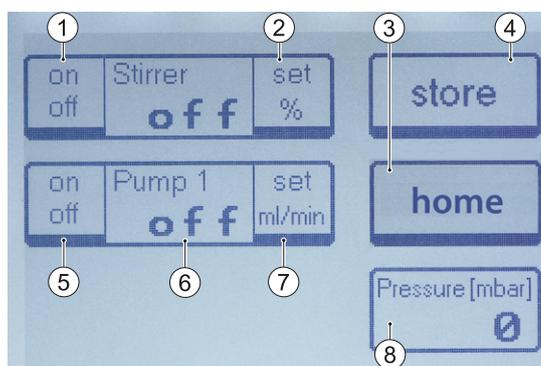


L'intensità della luce della lampada stroboscopica e l'ampiezza (= intensità) della vibrazione possono essere impostate da 1 a 9. Al di sopra della frequenza di 1.500 Hz l'ampiezza può essere impostata da 1 a 12. Aumentando l'ampiezza la vibrazione diventa più forte. I valori superiori a 3 vengono usati solitamente per soluzioni con viscosità > 100 mPa s. Premendo i pulsanti (+) e (-) si modificano immediatamente i parametri. Premendo il pulsante "Esc" si ritorna al menu di avvio e si mantiene il valore impostato.

Schermata 6-6: Ulteriori opzioni riguardanti l'ampiezza della vibrazione e l'Intensità della luce della lampada stroboscopica.

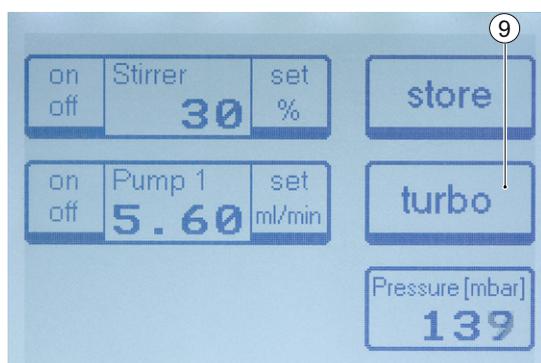
6.5 Funzioni dei menu sullo schermo tattile inferiore

La pompa per siringa (velocità della pompa e calibrazione) e l'agitatore magnetico vengono impostati sullo schermo tattile inferiore. Quando si accende l'Encapsulator, lo schermo tattile avvia un programma di inizializzazione della durata di alcuni secondi. Poi sullo schermo appare il menu di avvio con due sottomenu (vedi *Figure 6-7 – 6-10*).



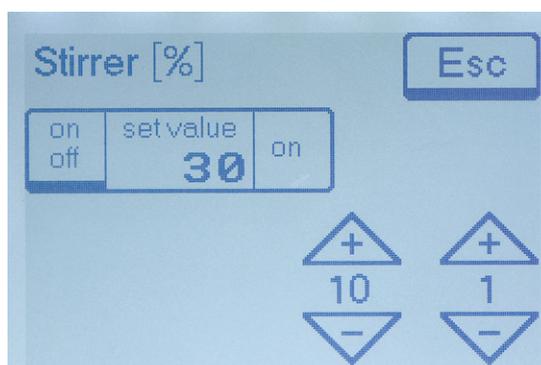
Schermata 6-7: Menu di avvio sullo schermo tattile inferiore

- ① Pulsante on/off per l'impostazione dell'agitatore magnetico.
- ② Pulsante per il passaggio alla *Schermata 6-9* per l'impostazione della velocità dell'agitatore magnetico.
- ③ Pulsante per rimandare indietro il braccio della pompa per la siringa.
Questo pulsante è visibile solo se il braccio non è già in posizione "home". Quando la pompa sta avanzando, questo pulsante diventa il pulsante "turbo", vedi *Schermata 6-8*.
- ④ Pulsante per salvare i valori impostati: premere due volte in un secondo. Un segnale acustico indica che i valori sono stati salvati.
- ⑤ Pulsante on/off per l'impostazione della pompa per siringa.
- ⑥ Indicazione del parametro e dello stato di impostazione (valore o off).
- ⑦ Pulsante per il passaggio alla *Schermata 6-10* per l'impostazione dei parametri della pompa per siringa.
- ⑧ Indicazione della pressione all'uscita dell'aria da 0 a 1.000 mbar.



Schermata 6-8: Schermo tattile inferiore con pulsante turbo

- ⑨ Premendo il pulsante "turbo" si raddoppia la portata di pompaggio attuale.

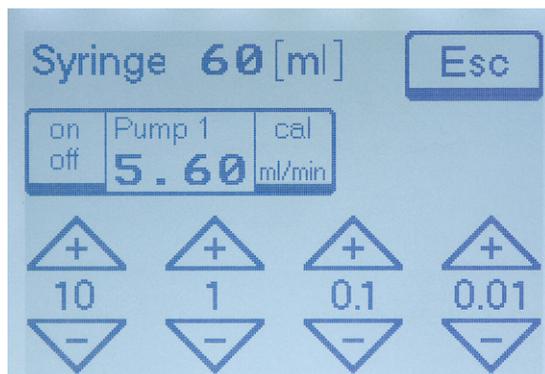


Schermata 6-9: Regolazione della velocità dell'agitatore magnetico

Premendo i pulsanti (+) e (-) si modifica la velocità dell'agitatore. Premendo "Esc" si ritorna al menu di avvio e si mantiene il valore impostato.

NOTA

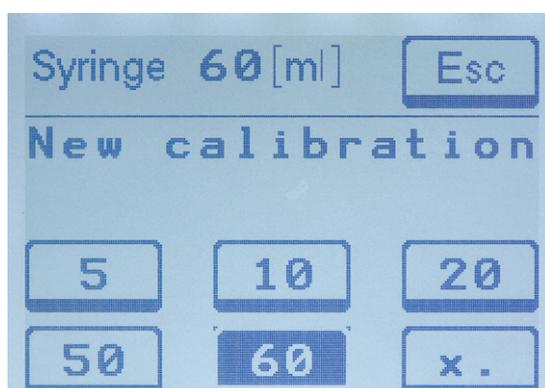
I valori sono arbitrari, ma riproducibili e non corrispondono a giri al minuto.



Schermata 6-10: Regolazione della velocità della pompa per siringa

Premendo i pulsanti (+) e (-) si modifica la portata della pompa. Premendo "Esc" si ritorna al menu di avvio e si mantiene il valore impostato. Premendo il pulsante "cal mL/min" mentre la pompa è in funzione, si apre la *Schermata 6-11*, che permette di calibrare la siringa attuale. Se si ferma la pompa, la schermata chiede di selezionare una siringa calibrata.

6.5.1 Menu per la calibrazione della pompa per siringa



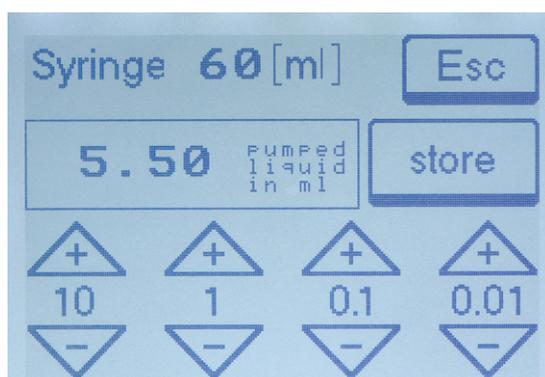
Schermata 6-11: Calibrazione pompa per siringa – selezione del tipo di siringa

Selezionare il volume della siringa premendo il pulsante corrispondente. Appare la *Schermata 6-12* (se la pompa è in funzione) o la schermata principale (se la pompa è ferma).



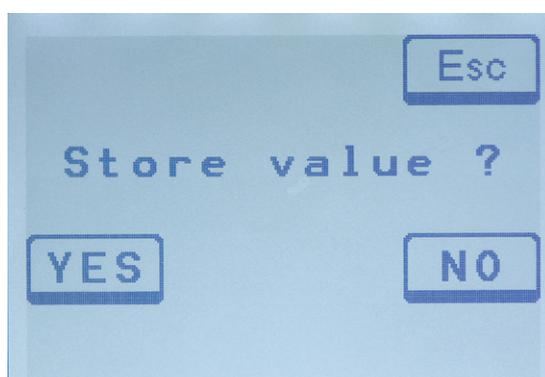
Schermata 6-12: Calibrazione pompa per siringa – timer

Premendo il pulsante "on" si avvia il timer. Il timer inizia il conto alla rovescia di 1 minuto da 60 a 0 secondi, durante il quale il liquido del getto viene raccolto in un recipiente precedentemente pesato. Gli ultimi tre secondi vengono annunciati da un breve segnale acustico. Un secondo più tardi la pompa per siringa si ferma e si passa alla *Schermata 6-13*.



Schermata 6-13: Calibrazione pompa per siringa – impostazione del liquido pompato

Premere i pulsanti (+) e (-) per inserire il liquido pompato per 1 minuto. Poi premere il pulsante “store”. Si passa alla *Schermata 6-14*.

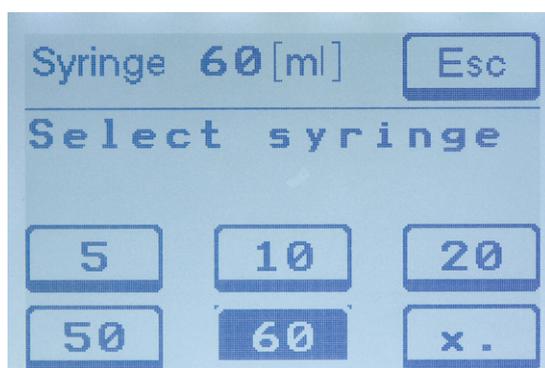


Schermata 6-14: Calibrazione pompa per siringa – salvare il valore

Premere “Sì” per salvare i valori. Si passa al menu di avvio. La pompa per siringa entrerà in funzione con la nuova calibrazione dopo avere premuto il pulsante “on” sul comando della pompa.

6.5.2 Selezione di una siringa calibrata

Fermare la pompa. Premere il pulsante “cal mL/min” sulla *Schermata 6-10*. Si passa alla *Schermata 6-15*.



Schermata 6-15: Selezione della dimensione della siringa

Selezionare la siringa desiderata premendo sul relativo pulsante. La siringa è stata memorizzata e si passa al menu di avvio.

NOTA

Si può accedere a questa schermata dal menu di avvio solo se la pompa è ferma.

6.6 Controllo manuale della pressione dell'aria

Dall'unità di controllo si regola manualmente la pressione tramite la valvola di regolazione della pressione integrata nel pannello anteriore dell'unità di controllo stessa (vedi *Figura 6-2*). Impostare la pressione dell'aria su un valore superiore di 0,2 – 0,3 bar rispetto alla pressione dell'aria massima necessaria durante il processo di incapsulamento, ma non oltre 1 bar. La pressione aumenta se si ruota la manopola della valvola di regolazione della pressione in senso orario e diminuisce se la si ruota in senso antiorario. La manopola della valvola di regolazione della pressione ha due posizioni. Se è spinta verso l'interno è bloccata, se è tirata verso l'esterno è sbloccata. Quando si ruota la manopola in senso antiorario, la pressione viene ridotta tramite il sistema di sfiato automatico presente nella valvola stessa. La pressione è visualizzata sullo schermo tattile (vedi *Schermata 6-7*).

NOTA

- *La pressione dell'aria o dell'azoto all'ingresso dell'unità di controllo sul pannello posteriore dell'Encapsulator dovrebbe essere inferiore a 7 bar (100 psi). L'intervallo suggerito è tra 1,5 e 2 bar (20 – 30 psi).*
- *Prestare attenzione al fatto che il sistema di regolazione della pressione reagisce con relativa lentezza, poiché il passaggio dell'aria in ingresso o in uscita attraverso la valvola di compressione subisce un ritardo.*
- *Non lasciare allacciata la linea di alimentazione del gas quando l'Encapsulator non è in uso. Il sistema di sfiato automatico della valvola svuoterebbe il serbatoio del gas.*
- *La pressione massima dell'aria in uscita è di 1,5 bar (20 psi). Questo valore viene tenuto sotto controllo da una valvola di sovrappressione di sicurezza integrata, che si apre a 1,5 bar. L'intervallo operativo è comunque tra 0 e 1 bar.*



Figura 6-2: Sistema di regolazione della pressione dell'aria per il controllo manuale della pressione – la pressione **aumenta** quando si ruota la valvola di regolazione in senso orario.

6.7 Uso della pompa per siringa

Quando si utilizza per la prima volta la pompa per siringa dopo avere acceso l'unità di controllo, premere il pulsante "home" sullo schermo tattile inferiore per portare indietro il braccio della pompa. Lasciare che il braccio torni completamente indietro finché non tocca il micro-interruttore di finecorsa (vedi *Figura 6-3*), dove si ferma. In questo modo il computer dell'unità di controllo rileva la posizione esatta del braccio della siringa. Collegare la siringa piena (si consiglia di utilizzare siringhe in plastica con raccordo luer lock) all'unità di produzione delle beads.

Fare muovere in avanti il braccio della siringa avviando la pompa (vedi *Schermata 6-10*). Premendo il pulsante "turbo" il braccio si muove a velocità doppia. Si può aumentare la velocità di movimento in avanti impostando temporaneamente valori di portata maggiori della pompa. Ridurre la velocità mentre il braccio della pompa si avvicina allo stantuffo della siringa. Fermare la pompa quando il braccio tocca lo stantuffo della siringa. Impostare la portata del liquido desiderata (vedi *Schermata 6-10*). Iniziare a pompare premendo il pulsante on/off. Per portare a regime il sistema, premere il pulsante "turbo" – la pompa si muove a velocità doppia – finché in corrispondenza dell'ugello si forma un getto liquido continuo, poi premere di nuovo il pulsante "turbo" per riportarsi sul valore preimpostato. Se necessario, regolare la velocità di pompaggio per ottenere delle beads nettamente separate alla luce della lampada stroboscopica.

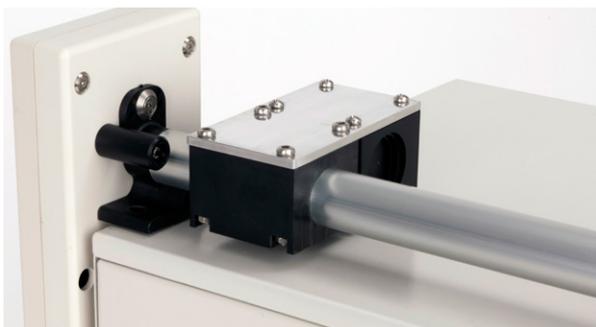


Figura 6-3: Finecorsa della pompa per siringa

6.7.1 Calibrazione della pompa per siringa

Riempire la siringa con acqua o con la miscela di immobilizzazione e collegarla all'unità di produzione delle beads. Pesare un contenitore per la raccolta del liquido pompato per 1 minuto e iniziare a pompare. Impostare la portata della pompa in modo da ottenere una buona formazione di beads. Iniziare la procedura di calibrazione premendo il pulsante "cal mL/min" (vedi *Schermata 6-10*). Scegliere una siringa di dimensione adeguata (vedi *Schermata 6-11*).

Premere il pulsante "on/off" (vedi *Schermata 6-12*) e raccogliere il liquido in uscita dall'ugello nel contenitore precedentemente pesato per 60 secondi. Gli ultimi tre secondi vengono annunciati da un segnale acustico. Un secondo dopo l'ultimo segnale acustico la pompa si ferma automaticamente. Pesare il liquido pompato. Inserire il valore (vedi *Schermata 6-13*) e salvarlo. Questo tipo di siringa ora è calibrato.

6.7.2 Selezione di una siringa pre-calibrata

I tipi di siringhe calibrati possono essere richiamati in qualsiasi momento. Fermare la pompa, premere il pulsante "cal mL/min" (vedi *Schermata 6-10*) e appare la *Schermata 6-15*. Selezionare la siringa adeguata e appare il menu di avvio. La selezione è completata.

6.8 Esercitazione pratica con l'Encapsulator utilizzando acqua

Prima di iniziare a lavorare con polimeri di incapsulamento, utilizzare l'acqua per fare pratica con l'Encapsulator e familiarizzare con gli effetti dei vari comandi. Prendere la piastra di copertura del recipiente di reazione e collegarvi l'unità di produzione delle beads e un ugello da 200 μm o 300 μm . Posizionare la piastra di copertura assemblata sull'unità di controllo. Fissarla con le due viti a testa piatta. Posizionare l'unità di vibrazione sull'unità di produzione delle beads. Posizionare un bicchiere di grandi dimensioni (circa 600 mL) sotto l'ugello. Collegare l'elettrodo con il cavo rosso all'unità di dispersione elettrostatica (EDU).

6.8.1 Uso della pompa per siringa

1. Riempire una siringa da 60 mL con acqua distillata e installarla come descritto al *Capitolo 5.5*. Impostare la velocità di pompaggio della siringa su 4 mL/min. Attivare il sistema di controllo della vibrazione e impostare la vibrazione su 1.500 Hz. Attivare la pompa per siringa. L'acqua inizierà a fluire dall'ugello in gocce di grandi dimensioni. Aumentare la velocità di pompaggio finché non si forma un getto liquido continuo. Modificare la velocità di pompaggio e osservare la catena di beads alla luce della lampada stroboscopica. Le condizioni operative giuste si hanno quando le beads all'interno della catena sono nettamente separate le une dalle altre su una lunghezza di parecchi centimetri, da 3 a 5 mm al di sotto dell'ugello. Prendere nota della vibrazione, della tensione e delle impostazioni della pompa prima di fermare la pompa.

NOTA

Se si hanno difficoltà nel vedere la catena di beads, ridurre la quantità di luce intorno all'Encapsulator e osservare il getto liquido da una distanza di 20 – 30 cm (8" – 12"), in modo che la forma scura dello stroboscopio si trovi direttamente dietro il flusso.

2. Fare ripartire la pompa e tenere premuto il pulsante "turbo" – la pompa si muoverà a velocità doppia e si formerà un getto liquido continuo. Quando si rilascia il pulsante "turbo" il getto si stabilizza rapidamente sulla portata impostata. Il pulsante "turbo" è molto utile per portare a regime il sistema quando si utilizzano soluzioni polimeriche viscosi e per smuovere piccole occlusioni che compromettono il flusso.
3. Aumentare la frequenza della vibrazione finché la catena di beads non diventa instabile e poi aumentare la velocità di pompaggio finché non si ripristina una catena di beads di buona qualità. Ripetere questa procedura nella direzione opposta diminuendo la velocità di pompaggio e poi diminuendo la frequenza della vibrazione. Dopo avere eseguito questa operazione per alcune volte, si acquisisce familiarità con il rapporto tra questi due parametri. Inserire i valori che avete determinato per la catena di beads ottimale nella *Tabella 6-1*.

NOTA

La velocità di pompaggio e la frequenza della vibrazione si influenzano a vicenda entro un determinato intervallo operativo. L'intervallo operativo, a sua volta, è soprattutto determinato dal diametro dell'ugello e dalla viscosità della miscela polimerica.

Regole generali:

- **Con frequenze più elevate si producono beads di dimensioni più piccole.**
- **Con portate del liquido più basse si producono beads di dimensioni più piccole.**
- **Minore è la dimensione delle beads, minore è la tensione elettrostatica necessaria per ottenerne la separazione.**
- **Gli ugelli più piccoli producono beads di dimensioni più piccole. Il diametro finale delle beads è circa due volte la dimensione dell'ugello.**

4. Impostare la velocità di pompaggio e la frequenza della vibrazione sui valori già determinati, con i quali si ottiene una buona catena di beads distinta. Attivare l'unità di dispersione elettrostatica a 300 V e aumentare la tensione gradualmente di 100 V alla volta, finché il getto liquido monodimensionale si trasforma in un flusso multiplo a forma di imbuto. Maggiore è la carica elettrostatica, prima si separa la catena di beads. Ciò impedisce alle beads di scontrarsi le une con le altre, sia mentre si disperdono sia mentre entrano nella soluzione indurente, poiché ora sono come particelle cariche che si respingono l'una con l'altra. Grazie a questa caratteristica esclusiva l'Encapsulator è normalmente in grado di produrre lotti di beads con un tasso di omogeneità superiore al 95 %.
5. Modificare la frequenza della vibrazione e la velocità di pompaggio e osservare come influiscono sulla tensione elettrostatica necessaria per produrre la separazione delle beads. L'uso dell'unità di dispersione elettrostatica permette di ampliare l'intervallo operativo.
Può accadere che, dopo un certo tempo, le beads non entrino più o che saltino addirittura fuori dal recipiente. Ciò è dovuto al fatto che le cariche elettrostatiche si sono accumulate all'interno del recipiente, isolato elettricamente. Per evitare questo fenomeno, posizionare la clip in acciaio inossidabile del cavo di messa a terra sul bordo del recipiente, in modo che raggiunga il liquido e collegare l'altra estremità del cavo verde e giallo alla presa di collegamento a terra sul pannello anteriore dell'unità di controllo (vedi Figura 6-4). Se si lavora con il recipiente di reazione completo, le cariche elettrostatiche vengono eliminate automaticamente, senza la necessità del cavo di collegamento a terra.



Figura 6-4: Collegamento a terra del bagno di polimerizzazione aperto

6. Se si modifica l'ampiezza della vibrazione, si potranno osservare solo lievi cambiamenti nella catena di beads. In generale i valori tra 1 e 3 risultano ottimali per soluzioni a bassa viscosità. Se si utilizzano miscele di immobilizzazione con viscosità elevata ($> 150 \text{ mPa s}$), potrebbero essere più adeguati valori superiori a 3.
7. Ripetere questo esperimento con un ugello di misura diversa.

6.8.2 Uso della bottiglia a pressione

1. Assemblare l'unità di produzione delle beads, avvitare l'ugello singolo da 0,30 mm all'unità di produzione delle beads e collegare il tutto alla piastra di copertura con la vite (M3×25). Posizionare l'unità di vibrazione sull'unità di produzione delle beads. Collegare l'elettrodo con il cavo rosso dell'unità di dispersione elettrostatica (EDU).
2. Riempire la bottiglia a pressione con 200 – 300 mL di acqua distillata e avvitarsi sopra il coperchio assemblato. Passare il tubo flessibile in silicone (4×7 mm) tra le lamine della valvola di regolazione del flusso e collegare il raccordo luer lock maschio del tubo in silicone al raccordo luer lock femmina dell'unità di produzione delle beads. Schiacciare la valvola ruotando la manopola in senso orario in modo che il tubo in silicone si chiuda.
3. Aprire l'alimentazione esterna dell'aria compressa. La pressione ottimale dell'aria in entrata varia tra 1,5 e 2 bar (20 – 30 psi). Comunque il sistema può sopportare livelli di pressione dell'aria in entrata fino a 7 bar (100 psi).
4. Impostare la pressione dell'aria in uscita a 0,2 bar tramite la valvola di regolazione della pressione. Controllare periodicamente il valore visualizzato per accertarsi che la pressione dell'aria continui a corrispondere al valore impostato. Attivare il sistema di controllo della vibrazione e impostare la frequenza a 800 Hz.
5. Aprire la valvola di regolazione del flusso ruotando la manopola in senso antiorario finché l'acqua non scorre attraverso il tubo in silicone e l'unità di produzione delle beads fino all'ugello, dove si dovrà formare un getto continuo. Regolare il flusso e/o la frequenza per ottenere una catena di beads di buona qualità, verificabile alla luce della lampada stroboscopica. L'impostazione ottimale si ha quando le beads all'interno della catena sono nettamente separate le une dalle altre su una lunghezza di parecchi centimetri, a partire da 3 – 5 mm al di sotto dell'ugello. Registrare la posizione della valvola di regolazione del flusso per l'impostazione desiderata.
6. Aumentare la frequenza della vibrazione finché la catena di beads non diventa instabile. A questo punto aumentare la portata del liquido aumentando lentamente la pressione dell'aria, finché non si ripristina una catena uniforme di beads. Ripetere questo passaggio nella direzione opposta, diminuendo la portata e compensando diminuendo la frequenza della vibrazione. Continuare finché non si acquisisce familiarità con il rapporto tra queste due impostazioni. Registrare i valori nella *Tabella 6-2*.

NOTA

- *La portata del liquido e la frequenza della vibrazione si influenzano a vicenda entro un determinato intervallo operativo. L'intervallo operativo, a sua volta, è soprattutto determinato dal diametro dell'ugello e dalla viscosità della miscela polimerica.*
- *Un'impostazione della pressione dell'aria tra 0,05 e 0,15 bar è sufficiente per pompare acqua distillata. **Eventuali valori più elevati della pressione operativa indicano la presenza di problemi, quali un ugello ostruito.***

Regole generali:

- **Con frequenze più elevate si producono beads di dimensioni più piccole.**
- **Con portate del liquido più basse si producono beads di dimensioni più piccole.**

7. Impostare la portata del liquido e la frequenza della vibrazione su un valore che permetta di ottenere una catena di beads distinta. Attivare l'unità di dispersione elettrostatica a 300 V e aumentare la tensione gradualmente di 100 V alla volta, finché il getto liquido monodimensionale si trasforma in un flusso multiplo a forma di imbuto. Maggiore è la carica elettrostatica, prima si separa la catena di beads. Ciò impedisce alle beads di scontrarsi le une con le altre sia mentre si disperdono sia mentre entrano nella soluzione indurente. Per questo motivo l'Encapsulator è normalmente in grado di produrre lotti di beads con un tasso di omogeneità superiore al 95 %. Se non accade nulla, controllare che l'elettrodo sia collegato all'unità di controllo.
8. Modificare la frequenza della vibrazione e la portata e osservare come influiscono sulla tensione elettrostatica necessaria per produrre una separazione del getto liquido. L'uso della tensione elettrostatica permette di ampliare l'intervallo operativo.
Può accadere che, dopo un certo tempo, le beads non entrino più o che saltino addirittura fuori dal recipiente. Ciò è dovuto al fatto che le cariche elettrostatiche si sono accumulate all'interno del recipiente, isolato elettricamente. Per evitare questo fenomeno, posizionare la clip in acciaio inossidabile del cavo di messa a terra sul bordo del recipiente, in modo che raggiunga il liquido e collegare il cavo verde e giallo alla presa di collegamento a terra sul pannello anteriore dell'unità di controllo. Se si lavora con il recipiente di reazione completo, le cariche elettrostatiche vengono eliminate automaticamente, senza la necessità del cavo di collegamento a terra.

Regola generale:

Maggiori sono le dimensioni delle beads, maggiore è la tensione elettrostatica necessaria per separare il getto.

9. Modificare l'ampiezza della vibrazione. Si osserveranno solo lievi cambiamenti nella catena di beads. Molto spesso i valori tra 1 e 3 risultano ottimali per soluzioni a bassa viscosità. Se si utilizzano miscele di immobilizzazione con viscosità abbastanza elevata (> 150 mPa s), potrebbero essere più adeguati valori superiori a 3.
10. Ripetere questa procedura con un ugello di misura diversa.

Regola generale:

- ***Gli ugelli più piccoli producono beads di dimensioni più piccole.***
- ***Il diametro finale delle beads è circa due volte la dimensione dell'ugello.***

6.9 Esercitazione pratica con l'Encapsulator utilizzando una soluzione di alginati non sterile

Dopo avere familiarizzato con i comandi per la formazione delle beads, eseguire dei cicli di prova con soluzioni di alginati non sterili. L'alginato di sodio è il polimero maggiormente utilizzato, ma ne sono disponibili altri con caratteristiche diverse. Si consiglia un alginato a bassa viscosità. La concentrazione dell'alginato influisce fortemente sulla viscosità e ciò, a sua volta, influisce sul calo di pressione nell'ugello. Per questo motivo la concentrazione della soluzione di alginati dipende dal diametro dell'ugello (vedi tabella seguente).

Tabella 6-3: Concentrazione di alginati consigliata (in base al peso secco) per ugelli di diverso diametro

Diametro dell'ugello	Concentrazione dell'alginato a bassa viscosità	
	Intervallo operativo	Concentrazione consigliata
80 – 120 µm	0,75 – 1,4 %	1,1 – 1,2 %
120 – 200 µm	1,0 – 1,6 %	1,3 – 1,4 %
200 – 300 µm	1,2 – 1,8 %	1,5 – 1,6 %
300 – 500 µm	1,5 – 2,5 %	1,8 – 2,0 %

NOTA

In condizioni di conservazione normali l'alginato in polvere contiene il 10 – 12 % d'acqua. Per questo motivo si fa riferimento alla concentrazione dell'alginato in base al peso secco.

6.9.1 Preparazione della soluzione di alginato di sodio al 1,5 %

1. Prendere un bicchiere da 400 mL e pesare 3,3 g di alginato di sodio in polvere a bassa viscosità.
2. Aggiungere 200 mL di acqua deionizzata e miscelare vigorosamente con un miscelatore da laboratorio per 1 – 2 minuti.
3. L'alginato tende a formare dei grumi. Rimuovere i grumi di alginato dal bicchiere e dalle lame del miscelatore con una spatola e miscelare per altri 1 – 2 minuti. Se nel liquido rimangono dei grumi, ripetere la miscelazione.
4. Lasciare riposare la miscela per permettere alle bolle d'aria rimaste intrappolate di essere espulse dal liquido.
5. Se necessario scaricare il gas dalla miscela a pressione ridotta.
6. La dissoluzione dell'alginato con un agitatore magnetico richiede tempi molto più lunghi e dovrebbe essere effettuata per tutta la durata della notte.

NOTA

Le soluzioni di alginati permettono la crescita di microrganismi e rimangono stabili per circa 2 settimane, se conservate in frigorifero. Un'indicazione di contaminazione microbica è la riduzione della viscosità della miscela. Le soluzioni di alginati possono essere conservate molto più a lungo, addirittura a temperatura ambiente, se vengono sterilizzate o con l'aggiunta di conservanti, quali NaN_3 allo 0,05 %.

6.9.2 Uso della pompa per siringa

1. Collegare un ugello da 200 μm o 300 μm all'unità di produzione delle beads. Posizionare la piastra di copertura assemblata sull'unità di controllo. Fissarla con le due viti a testa piatta. Posizionare l'unità di vibrazione sull'unità di produzione delle beads. Collegare l'elettrodo con il cavo rosso dell'unità di dispersione elettrostatica (EDU). Posizionare l'agitatore magnetico sotto all'ugello e un bicchiere di grandi dimensioni sull'agitatore. Riempire il bicchiere con 100 mM CaCl_2 in modo che almeno 2 cm (circa $\frac{3}{4}$ ") siano riempiti con il liquido di polimerizzazione. Inserire la barra dell'agitatore magnetico nel bicchiere e regolare l'agitatore in modo che risulti visibile un leggero vortice. Un vortice all'interno del liquido può creare forze di taglio, che possono deformare le beads. La soluzione migliore è utilizzare una barra di agitazione senza anello rotante (fornita), poiché l'anello solleva la barra di agitazione e potrebbe schiacciare le beads sotto di essa. Posizionare anche la clip di collegamento a terra sul bordo del bicchiere e dentro il liquido. A questo punto coprire il bicchiere con una piastra (capsula di Petri) o spostare bicchiere e agitatore da un'altra parte e sostituirlo sotto all'ugello con un altro bicchiere riempito d'acqua (con la clip di collegamento a terra).
2. Riempire una siringa da 60 mL con la soluzione di alginati al 1,5 % di cui sopra e installarla sull'Encapsulator.
3. Attivare il sistema di controllo della vibrazione e impostare la frequenza di vibrazione su 1.200 Hz per l'ugello da 200 μm o su 900 Hz per l'ugello da 300 μm . Attivare la pompa per siringa e impostare la velocità di pompaggio su 5 mL/min per l'ugello da 200 μm o su 8 mL/min per l'ugello da 300 μm . Tenere premuto il pulsante "turbo" finché non si forma un getto liquido continuo. Quando si rilascia il pulsante "turbo" il getto si stabilizza rapidamente sulla portata impostata. Regolare la velocità di pompaggio e/o la frequenza per ottenere una catena di beads di buona qualità al di sotto dell'elettrodo.
4. Attivare l'unità di dispersione elettrostatica a 500 V. Aumentare gradualmente la tensione di 100 V alla volta, fino ad ottenere una dispersione circolare del flusso di beads da 3 a 10 cm (1" – 4") dopo l'elettrodo. La distanza ottimale è di circa 5 cm (circa 2") al di sotto dell'elettrodo. Se non accade nulla, verificare che l'elettrodo sia collegato all'unità di controllo.

NOTA

Con l'aumento della dispersione circolare del flusso di beads, migliora l'omogeneità delle beads. Ciò non dipende solo dalla tensione elettrostatica, ma anche dalla portata del liquido e dalla frequenza della vibrazione. Questi valori influiscono sul modo in cui la bead si separa dal getto liquido dentro il campo elettrostatico, tra l'ugello e l'estremità dell'elettrodo. Le beads più piccole si separano spesso dal getto liquido più vicino all'ugello delle beads più grandi.

5. Appena si ottiene una dispersione simmetrica e stabile, sostituire il bicchiere con quello contenente la soluzione di polimerizzazione. Raccogliere le beads per circa 1 minuto. Registrare i parametri di processo nella *Tabella 6-4* mentre si accumulano le beads. Coprire il bicchiere (o sostituirlo con il bicchiere precedente contenente gli scarti) e fermare la produzione di beads disinserendo la pompa per siringa, la vibrazione e la tensione elettrostatica.

NOTA

Pulire accuratamente l'ugello con acqua distillata immediatamente dopo ogni ciclo, per evitare l'ostruzione dell'ugello o una sua occlusione parziale dovuta a miscela polimerica seccata.

Tabella 6-4: Scheda operativa per ciclo di prova dell'Encapsulator (pompa per siringa)

Dimensione della siringa [mL]					
Dimensione dell'ugello [μm]					
Concentrazione alginato [%]					
Velocità di pompaggio [mL/min]					
Frequenza della vibrazione [Hz]					
Ampiezza					
Dimensione approssimata beads [μm]					
Omogeneità [%]					
Commenti					

6. Verificare le beads al microscopio con un oculare a scala micrometrica e registrare le proprie osservazioni relative a diametro, uniformità e forma nella *Tabella 6-4*.
7. Ripetere questa procedura ogni volta che si modificano i parametri di processo.

NOTA

Quando si producono beads piccole, con diametro $< 500 \mu\text{m}$, può succedere che la loro forma non sia sferica, ma leggermente ovale. Ciò è dovuto principalmente alla tensione superficiale della soluzione di polimerizzazione. Un punto estremamente critico per la bead è la sua entrata nella soluzione di polimerizzazione. Se la tensione superficiale è elevata, la bead viene parzialmente trattenuta in corrispondenza della superficie e la polimerizzazione inizia prima che la bead possa riprendere una forma rotonda. Si può risolvere questo problema aggiungendo una piccola quantità di tensioattivo, per esempio Tween 20, alla miscela di polimerizzazione.

8. Confrontare l'influsso dell'unità di dispersione elettrostatica raccogliendo le beads alla stessa frequenza di vibrazione e velocità di pompaggio con la funzione elettrostatica inserita e disinserita.
9. Determinare il campo operativo modificando gradatamente la velocità di pompaggio, dalla portata minima del liquido, che riesce appena a produrre un getto continuo, fino a una portata con la quale non è più visibile una catena distinta di beads indipendentemente dalla frequenza di vibrazione. Registrare i relativi dati della frequenza minima a massima nella *Tabella 6-5*.

6.9.3 Uso della bottiglia a pressione

1. Collegare un ugello da 200 μm o 300 μm all'unità di produzione delle beads. Posizionare la piastra di copertura assemblata sull'unità di controllo. Fissarla con le due viti a testa piatta. Posizionare l'unità di vibrazione sull'unità di produzione delle beads. Collegare l'elettrodo con il cavo rosso dell'unità di dispersione elettrostatica (EDU). Posizionare l'agitatore magnetico sotto all'ugello e un bicchiere di grandi dimensioni sull'agitatore. Riempire il bicchiere con 100 mM CaCl_2 in modo che almeno 2 cm (circa $\frac{3}{4}$ ") siano riempiti con il liquido di polimerizzazione. Inserire la barra dell'agitatore magnetico nel bicchiere e regolare l'agitatore in modo che risulti visibile un leggero vortice. Posizionare anche la clip di collegamento a terra sul bordo del bicchiere e dentro il liquido. A questo punto coprire il bicchiere con una piastra (capsula di Petri) o spostare bicchiere e agitatore da un'altra parte e sostituirlo sotto all'ugello con un altro bicchiere riempito d'acqua (con la clip di collegamento a terra).
2. Riempire la bottiglia a pressione con la soluzione di alginati al 1,5 % sopra descritta e avvitare il tappo già assemblato. Passare il tubo flessibile in silicone (4x7 mm) tra le lamine della valvola di regolazione del flusso e collegare il raccordo luer lock maschio del tubo in silicone al raccordo luer lock femmina dell'unità di produzione delle beads. Schiacciare la valvola ruotando la manopola in senso orario in modo che il tubo in silicone si chiuda.
3. Aprire l'alimentazione esterna dell'aria compressa. La pressione ottimale dell'aria in entrata varia tra 1,5 e 2 bar (20 – 30 psi). Comunque il sistema può sopportare livelli di pressione dell'aria in entrata fino a 7 bar (100 psi).
4. Impostare la pressione dell'aria a 0,4 bar sul sistema di regolazione della pressione. Controllare periodicamente il valore visualizzato per accertarsi che la pressione dell'aria continui a corrispondere al valore impostato. Attivare il sistema di controllo della vibrazione e impostare la frequenza di vibrazione su 1.100 Hz per l'ugello da 200 μm e su 800 Hz per l'ugello da 300 μm .
5. Aprire la valvola di regolazione del flusso ruotando la manopola in senso antiorario, finché il liquido non scorre attraverso il tubo in silicone e l'unità di produzione delle beads fino all'ugello, dove si dovrà formare un getto continuo. Regolare il flusso e/o la frequenza per ottenere una catena di beads di buona qualità, verificabile alla luce della lampada stroboscopica. L'impostazione ottimale si ha quando le beads all'interno della catena sono nettamente separate le une dalle altre su una lunghezza di parecchi centimetri, a partire da 3 – 5 mm al di sotto dell'ugello. Registrare la posizione della valvola di regolazione del flusso per l'impostazione desiderata.
6. Aumentare la frequenza della vibrazione finché la catena di beads non diventa instabile. A questo punto aumentare la portata del liquido, aumentando lentamente la pressione dell'aria o aprendo lentamente la valvola di regolazione del flusso, finché non si ripristina una catena uniforme di beads. Ripetere questo passaggio nella direzione opposta, diminuendo la portata e compensando diminuendo la frequenza della vibrazione. Continuare finché non si acquisisce familiarità con il rapporto tra queste due impostazioni. Registrare i valori nella *Tabella 6-5*.

NOTA

Un'impostazione della pressione dell'aria tra 0,1 e 0,8 bar è generalmente sufficiente per pompare la miscela polimerica. Si dovrebbero evitare valori della pressione operativa superiori a 1,0 bar, che indicano la presenza di problemi, quali:

- *ugello ostruito,*
 - *miscela polimerica eccessivamente viscosa,*
 - *ugello sottodimensionato per la miscela polimerica utilizzata.*
7. Attivare l'unità di dispersione elettrostatica a 500 V. Aumentare gradualmente la tensione di 100 V alla volta, fino ad ottenere una dispersione circolare del flusso di beads da 3 a 10 cm (1" – 4") dopo l'elettrodo. La distanza ottimale è di circa 5 cm (circa 2") al di sotto dell'elettrodo.

NOTA

Con l'aumento della dispersione circolare del flusso di beads, migliora l'omogeneità delle beads. Ciò non dipende solo dalla tensione elettrostatica, ma anche dalla portata del liquido e dalla frequenza della vibrazione. Il caso ideale prevede che la bead si separi dal getto liquido dentro il campo elettrostatico, tra l'ugello e l'estremità dell'elettrodo.

- Appena si ottiene una dispersione simmetrica e stabile, rimuovere la piastra dal bicchiere riempito con la soluzione di polimerizzazione o sostituire il bicchiere d'acqua con il bicchiere con la soluzione di polimerizzazione e la piastra di agitazione (con la clip di collegamento a terra) e raccogliere le beads per circa 1 minuto. Registrare i parametri di processo nella *Tabella 6-5* mentre si accumulano le beads. Coprire o sostituire il bicchiere e fermare la produzione di beads disinserendo la tensione elettrostatica e i comandi dell'aria compressa e della vibrazione.

NOTA

Pulire accuratamente con acqua distillata l'ugello immediatamente dopo ogni ciclo, per evitare l'ostruzione dell'ugello o una sua occlusione parziale dovuta a miscela polimerica seccata.

- Controllare le beads al microscopio con un oculare a scala micrometrica e registrare le proprie osservazioni relative a diametro, uniformità e forma nella *Tabella 6-6*.
- Ripetere questa procedura ogni volta che si modificano i parametri di processo.

Tabella 6-6: Scheda operativa per ciclo di prova dell'Encapsulator (bottiglia a pressione)

Dimensione dell'ugello [μm]					
Concentrazione alginato [%]					
Posizione valvola regolazione flusso					
Frequenza della vibrazione [Hz]					
Ampiezza					
Dimensione approssimata beads [μm]					
Omogeneità [%]					
Commenti					

NOTA

Quando si producono beads piccole, con diametro $< 500 \mu\text{m}$, può succedere che la loro forma non sia sferica, ma leggermente ovale. Ciò è dovuto principalmente alla tensione superficiale della soluzione di polimerizzazione. Un punto estremamente critico per la bead è la sua entrata nella soluzione di polimerizzazione. Se la tensione superficiale è elevata, la bead viene parzialmente trattenuta in corrispondenza della superficie e la polimerizzazione inizia prima che la bead possa riprendere una forma rotonda. Si può risolvere questo problema aggiungendo una piccola quantità di tensioattivo, per esempio Tween 20, alla miscela di polimerizzazione.

- Confrontare l'influsso della tensione elettrostatica raccogliendo le beads alla stessa frequenza di vibrazione e velocità di pompaggio con la funzione della tensione elettrostatica inserita e disinserita.

6.10 Esercitazione pratica con l'Encapsulator con il recipiente di reazione completo

Dopo avere familiarizzato con la formazione di beads in alginato di calcio, effettuare alcuni cicli di prova con il recipiente di reazione completo per simulare l'uso in condizioni sterili, ma utilizzando una soluzione di alginati non sterile.

Le operazioni in condizioni sterili presentano l'ulteriore difficoltà che è spesso impossibile modificare qualcosa nel recipiente di reazione sterilizzato in autoclave senza compromettere la sterilità, per esempio se si è dimenticato un pezzo o se è stato montato in modo errato. Per questo motivo è importante predisporre accuratamente il recipiente di reazione prima della sterilizzazione. Seguire le istruzioni fornite al *Capitolo 5* per il montaggio e la sterilizzazione del recipiente di reazione. Se si modifica qualcosa, prenderne nota in una procedura separata.

1. Predisporre tutti i reagenti di incapsulamento necessari (per esempio, per l'incapsulamento di cellule animali, vedi il *Capitolo 6.14*).

Per questo ciclo:

60 mL	soluzione di alginati 1,5 %
500 mL	soluzione di polimerizzazione 100 mM CaCl ₂
600 mL	soluzione di lavaggio NaCl 0,9 % + 10 mM CaCl ₂

Assemblare una bottiglia a pressione.

2. Prendere il recipiente di reazione sterilizzato in autoclave e collegarlo all'unità di controllo. Verificare che il tubo in silicone dello scarico del liquido sulla piastra di base del reattore sia chiuso con un morsetto. Assicurarsi che la valvola di raccolta delle beads sul recipiente di reazione sia chiusa, che l'agitatore magnetico si trovi al di sotto del reattore e che la barra di agitazione si trovi al di sopra dell'agitatore magnetico.
 - Collegare l'unità di dispersione elettrostatica al recipiente di reazione con il cavo rosso.
 - Portare la vaschetta di raccolta del bypass delle beads al di sotto dell'ugello.
3. Mettere 500 mL di soluzione di polimerizzazione nella bottiglia a pressione. Collegare il tubo in silicone al filtro a membrana del liquido. Collegare la bottiglia a pressione all'uscita dell'aria dell'unità di controllo. Inserire l'unità di controllo. Impostare la pressione dell'aria tra 0,3 e 0,7 bar (4 – 10 psi). Appena viene pompata la quantità di liquido desiderata, rilasciare l'aria compressa.

NOTA

La quantità di soluzione indurente dovrebbe essere da 8 a 10 volte il volume della miscela polimerica. Nel recipiente di reazione la miscela di polimerizzazione dovrebbe raggiungere un'altezza di almeno 2 cm (circa 3/4") (minimo 200 mL).

4. Impostare la frequenza della vibrazione, la tensione elettrostatica e – se viene utilizzata la pompa per siringa – la portata della pompa sui valori adeguati, determinati in precedenza. Impostare la velocità dell'agitatore magnetico in modo che risulti appena visibile un vortice.

5. Riempire una siringa da 60 mL con la soluzione di alginati/campione e installarla sull'Encapsulator. Attivare il sistema di controllo della vibrazione e impostare la frequenza della vibrazione sui valori precedentemente determinati al *Capitolo 6-9*. Attivare la pompa per siringa e impostare la velocità di pompaggio determinata in precedenza. Premere il pulsante "turbo" finché non si forma un getto liquido continuo. Attivare il sistema di dispersione elettrostatica. Se necessario, regolare la velocità di pompaggio e/o la frequenza per ottenere una catena di beads di buona qualità che scenda fino alla vaschetta di raccolta.
6. Appena la catena di beads risulta stabile, allontanare la vaschetta di raccolta dal getto liquido per iniziare il processo di produzione delle beads vero e proprio. Il flusso di beads dovrebbe disperdersi da 3 a 10 cm (circa 1" – 4") al di sotto dell'elettrodo. La distanza ottimale è di circa 5 cm (circa 2") al di sotto dell'elettrodo. Per ottenere questo risultato sarà necessario regolare la tensione elettrostatica e probabilmente mettere leggermente a punto la frequenza della vibrazione e la velocità di pompaggio.
7. Osservare e registrare i parametri esatti di processo. Controllare la produzione effettiva di beads alla luce della lampada stroboscopica per verificare le impostazioni.
8. Poco prima che lo stantuffo della siringa abbia completato la sua corsa, spostare nuovamente la vaschetta del bypass sotto al flusso di beads. Ciò impedisce che le gocce più grosse, che si formano alla fine del processo produttivo, possano compromettere l'omogeneità delle beads raccolte. Fermare la pompa. Spegnerne l'unità di dispersione elettrostatica e il sistema di controllo della vibrazione o premere "home" per riportare indietro il braccio della pompa. Anche questo comando disattiva l'unità di dispersione elettrostatica e la vibrazione.
9. Lasciare indurire le beads per 5 minuti.
10. Per scaricare la soluzione indurente dal recipiente di reazione, aprire lentamente il morsetto in modo che siano necessari da 1 a 2 minuti per fare defluire 500 mL. Spegnerne l'agitatore magnetico quando sono stati fatti defluire circa $\frac{3}{4}$ del liquido. Chiudere il morsetto appena il livello del liquido raggiunge le beads depositate sul fondo.

NOTA

Lasciare sempre le beads leggermente coperte di soluzione per evitare la formazione di grumi.

11. Riempire la bottiglia del set per il trasferimento del liquido con 400 mL di soluzione di lavaggio e pomparla nel recipiente di reazione. Riavviare l'agitatore magnetico appena la relativa barra risulta coperta di liquido, in modo che le beads non si danneggino. Lavare le beads per 5 minuti e poi fare defluire il liquido come descritto in precedenza (punto 10).
12. Pompate gli ultimi 200 mL di soluzione di lavaggio nel recipiente di reazione. Riportare in sospensione le beads accendendo l'agitatore magnetico.
13. Aprire la valvola di raccolta delle beads e lasciare che le beads defluiscano nella relativa beuta di raccolta. Se nel recipiente di reazione rimangono delle beads, fare defluire nuovamente del liquido dalla beuta di raccolta delle beads nel recipiente di reazione, sollevando la beuta al di sopra dello scarico del recipiente di reazione. Con questo liquido, riportare in sospensione le beads rimaste e trasferirle nella beuta di raccolta abbassandola al di sotto del recipiente di reazione.
14. Chiudere con un morsetto il tubo in silicone in uscita dal recipiente di reazione verso la beuta di raccolta delle beads. Scollegare la beuta di raccolta delle beads dal recipiente di reazione e verificare la qualità delle beads al microscopio.
15. Immediatamente dopo il termine del processo di produzione, riempire una siringa di acqua distillata, collegarla all'unità di produzione delle beads e sciacquare l'ugello, per evitare che il polimero si secchi e ostruisca il sistema, creando così un problema di manutenzione. Pulire accuratamente il recipiente di reazione, compresi i diversi dispositivi di ingresso e uscita.

6.11 Sterilizzazione a caldo del recipiente di reazione

1. Predisporre il recipiente di reazione come descritto al Capitolo 5.4.
2. Aggiungere da 2 a 5 mL di acqua al recipiente di reazione.
3. Verificare che i seguenti elementi siano collegati o predisposti correttamente.
 - L'ugello è della dimensione corretta.
 - L'elettrodo è centrato al di sotto dell'ugello.
 - Il raccordo luer lock chiude l'unità di produzione delle beads?
 - I filtri dell'aria e del liquido sono stati collegati?
 - Nel recipiente di reazione è stata inserita una barra di agitazione magnetica?
 - La beuta di raccolta delle beads è stata collegata?
 - Il passaggio tra il recipiente di reazione e la beuta di raccolta delle beads è aperto (valvola di scarico delle beads aperta)?
 - Il tubo di scarico è chiuso con un morsetto?
 - Il raccordo luer lock dell'unità di produzione delle beads è chiuso con il relativo tappo?
4. Mettere il recipiente di reazione assemblato in autoclave e sterilizzarlo in flusso di vapore a 121 °C per 20 minuti o in conformità al proprio protocollo.
5. Dopo la sterilizzazione in autoclave, appena possibile rimuovere il recipiente di reazione ancora caldo dall'autoclave, per evitare la condensazione dell'acqua nel filtro dell'aria. Poiché un filtro dell'aria completamente bagnato non lascia più passare l'aria, sarà difficile scaricare i liquidi dal recipiente di reazione, a causa della pressione negativa che si crea nel recipiente di reazione stesso. Per verificare le condizioni del filtro dell'aria, collegare al filtro una siringa da 60 mL. Quando si porta avanti e indietro lo stantuffo della siringa, si dovrebbe sentire solo una leggera resistenza.
6. Chiudere la valvola di raccolta delle beads solo dopo che il recipiente di reazione si è raffreddato fino a temperatura ambiente.

6.12 Sterilizzazione della bottiglia a pressione

1. Assemblare la bottiglia a pressione e chiudere il raccordo luer lock con il relativo tappo.
2. Aggiungere da 1 a 2 mL di acqua alla bottiglia a pressione. Mettere la bottiglia a pressione assemblata in autoclave e sterilizzarla in flusso di vapore a 121 °C per 20 minuti o in conformità al proprio protocollo.

6.13 Processo di incapsulamento per l'immobilizzazione di microrganismi in beads di alginato di calcio

Nel presente capitolo viene descritto un metodo semplice, ma ben consolidato per l'immobilizzazione di microrganismi in beads di alginato di calcio. La stabilità di queste beads dipende non solo dal tipo di alginato utilizzato, ma anche dalle successive condizioni di coltura. Gli ioni di calcio nella soluzione indurente sostituiscono gli ioni di sodio nelle beads, con conseguente indurimento delle beads di alginato (si tratta di una reazione reversibile). Se occorrono beads più resistenti, poiché alcuni mezzi di coltura possiedono ingredienti che dissolvono lentamente le beads, gli ioni di calcio possono essere sostituiti con ioni di bario, che hanno una maggiore affinità con gli alginati rispetto agli ioni di calcio: le beads di alginato di bario che ne derivano sono più stabili.

Il metodo migliore per ottenere la sterilizzazione delle soluzioni di alginati è la filtrazione attraverso una membrana sterile (0,2 µm). La sterilizzazione a caldo tende a degradare parzialmente l'alginato e a modificare in modo imprevedibile la viscosità e la capacità di polimerizzazione.

Per l'incapsulamento di cellule animali si consiglia di seguire un protocollo diverso, poiché la struttura tridimensionale dell'alginato di calcio ostacola la formazione della nuova membrana cellulare durante la divisione delle cellule. Per le cellule che devono dividersi è più adatta una capsula. Una procedura per la produzione di capsule in alginato-PLL è descritta al *Capitolo 6-14*.

1. Predisporre tutti i materiali occorrenti come descritto al *Capitolo 6-10*: recipiente di reazione, bottiglia a pressione, siringa da 60 mL, bicchieri, cilindri graduati, ecc. Sterilizzare in autoclave il recipiente di reazione.
2. Preparare tutti i reagenti di incapsulamento necessari.

Per questo ciclo:	50 mL	soluzione di alginato 1,5 %, a bassa viscosità, filtrato sterile
	500 mL	soluzione di polimerizzazione (non sterile) 100 mM CaCl ₂
	600 mL	soluzione di lavaggio (non sterile) NaCl 0,9 % + 10 mM CaCl ₂
3. Inserire l'unità di controllo. Impostare la frequenza della vibrazione, la tensione elettrostatica e la portata della pompa sui valori determinati in precedenza.
4. Mettere 500 mL di soluzione di polimerizzazione nella bottiglia a pressione e chiuderla. Collegare il tubo in silicone al filtro a membrana. Pompate la soluzione di polimerizzazione nel recipiente di reazione.
5. Staccare il tubo in silicone dal filtro a membrana e posizionare il recipiente di reazione in una cappa biologica sterile.
6. Preparare 10 mL di sospensione concentrata di microrganismi. La sospensione dovrebbe essere priva di cationi bi- o trivalenti (per es. Ca, Mg, Al, Fe) o contenerne in concentrazione molto bassa, per evitare reazioni di polimerizzazione anticipata con l'alginato. Scegliere la concentrazione di microrganismi desiderata in modo che nella miscela polimerica finale sia < 1.010 cellule/mL (per cellule animali < 107 cellule/mL). Miscelare delicatamente 10 mL di sospensione di microrganismi con 50 mL di soluzione di alginati sterile al 1,5 % per minimizzare la formazione di bolle d'aria.
7. Riempire una siringa sterile da 60 mL con la soluzione polimero/prodotto in condizioni asettiche. Collegare la siringa all'unità di produzione delle beads. Collegare il recipiente di reazione (con la siringa collegata) all'unità di controllo. Fare avanzare il braccio della pompa in modo che arrivi a toccare lo stantuffo. Avviare l'agitatore magnetico in modo che sia visibile un leggero vortice. Attivare la vibrazione e la pompa per siringa. Premere il pulsante "turbo" finché non si forma un getto liquido continuo. Attivare l'unità di dispersione elettrostatica. Se necessario, modificare la velocità di pompaggio e/o la frequenza per ottenere una catena di beads di buona qualità che scenda fino alla vaschetta di raccolta.

8. Appena la catena di beads risulta stabile, allontanare la vaschetta di raccolta dal getto liquido per iniziare il processo di produzione delle beads vero e proprio. Verificare che il flusso di beads si disperda da 3 a 10 cm (circa 1" – 4") al di sotto dell'elettrodo. La distanza ottimale è di circa 5 cm (circa 2") al di sotto dell'elettrodo. Regolare la tensione elettrostatica per raggiungere questo obiettivo.
9. Registrare i parametri di processo esatti mentre si controlla la produzione di beads.
10. Poco prima che lo stantuffo della siringa si sia abbassato del tutto, spostare nuovamente la vaschetta di raccolta sotto al flusso di beads. Fermare la pompa. Spegnerne l'unità di dispersione elettrostatica e il sistema di controllo della vibrazione.
11. Lasciare indurire le beads per 5 minuti.
12. Per scaricare la soluzione indurente dal recipiente di reazione, aprire lentamente il morsetto in modo che siano necessari da 1 a 2 minuti per fare defluire 500 mL. Spegnerne l'agitatore magnetico quando sono defluiti circa $\frac{3}{4}$ del liquido. Chiudere il morsetto appena il livello del liquido raggiunge le beads depositate sul fondo.

NOTA

Lasciare sempre le beads leggermente coperte di soluzione per evitare la formazione di grumi.

13. Riempire la bottiglia a pressione con 400 mL di soluzione di lavaggio e pomparla nel recipiente di reazione. Riavviare l'agitatore magnetico appena la relativa barra risulta coperta di liquido, in modo che le beads non si danneggino. Lavare le beads per 5 minuti e poi fare defluire il liquido come descritto in precedenza (punto 12).
14. Pompare gli ultimi 200 mL di soluzione di lavaggio nel recipiente di reazione. Riportare in sospensione le beads accendendo l'agitatore magnetico.
15. Aprire la valvola di raccolta delle beads e lasciare che le beads defluiscano nella relativa beuta di raccolta.
16. Chiudere con un morsetto il tubo in silicone in uscita dal recipiente di reazione verso la beuta di raccolta delle beads. Scollegare la beuta di raccolta delle beads dal recipiente di reazione e verificare la qualità delle beads al microscopio.
17. Immediatamente dopo il termine del processo di produzione, riempire una siringa di acqua distillata, collegarla all'unità di produzione delle beads e sciacquare l'ugello, per evitare che il polimero si secchi e ostruisca il sistema, creando così un problema di manutenzione. Pulire il recipiente di reazione.

6.14 Protocollo di incapsulamento per membrane alginato-PLL-alginato

L'uso della membrana in alginato-poli-L-lisina-alginato è un sistema ben consolidato per l'incapsulamento di cellule animali, descritto per la prima volta da Lim e Sun¹. Nel seguito è riportato un protocollo ben sperimentato.

Soluzioni necessarie

1. Soluzione di alginati 1,5 %: alginato a bassa viscosità 1,5 % in tampone di lavaggio MOPS
regolare il pH a 7,0 a 25 °C
filtrazione sterile attraverso un filtro da 0,2 µm
2. Soluzione di polimerizzazione: 10 mM MOPS (acido morfolino-propansulfonico)
100 mM CaCl₂
pH = 7,2 a 25 °C
3. Soluzione di PLL: Poli-L-lisina 0,05 % MG 15.000-30.000 in tampone di lavaggio MOPS
4. Tampone di lavaggio MOPS: 10 mM MOPS (acido morfolino-propansulfonico)
NaCl 0,85 %
pH = 7,2 a 25 °C
5. Soluzione di alginati 0,03 %: 2 mL di soluzione di alginati 1,5 %.
+ 98 mL tampone di lavaggio MOPS.
6. Soluzione di depolimerizzazione: 50 mM citrato trisodico
NaCl 0,45 %
10 mM MOPS
pH = 7,2 a 25 °C

Per un incapsulamento di 12 mL di miscela polimero/prodotto occorre quanto segue:

- 12 mL soluzione di alginati 1,5 % (filtrato sterile)
- 100 mL soluzione di alginati 0,03 % (non sterile)
- 225 mL soluzione di polimerizzazione (non sterile)
- 75 mL soluzione di PLL (non sterile)
- 900 mL tampone di lavaggio MOPS (non sterile)
- 200 mL soluzione di depolimerizzazione (non sterile)

¹Lim F. e Sun A.M. 1980. Microencapsulated Islets as Bioartificial Pancreas. Science 210: p.908-910.

Procedura

1. Predisporre il recipiente di reazione e sterilizzarlo in autoclave come descritto al *Capitolo 6.10* e *6.11*.
2. Preparare tutte le soluzioni e le attrezzature di laboratorio.
3. Riempire il recipiente di reazione sterilizzato in autoclave con 225 mL di soluzione di polimerizzazione.
4. Una coltura cellulare con circa 6×10^6 cellule (o in base alle esigenze personali) viene centrifugata e il granulato (pellet) viene riportato in sospensione in 2 mL di tampone di lavaggio sterile MOPS e miscelato con 10 mL di soluzione di alginato di sodio al 1,5 %. Fare attenzione che durante la miscelazione non vengano introdotte bolle d'aria o ne vengano introdotte solo poche.
5. Riempire una siringa da 20 mL con la sospensione cellule/alginato e collegare la siringa al recipiente di reazione sotto una cappa a flusso d'aria laminare.
6. Fissare il recipiente di reazione all'unità di controllo dell'Encapsulator, posizionata sul banco.
7. Avviare la formazione delle beads con i parametri stabiliti in precedenza.
8. Lasciare indurire le beads per 5 minuti, poi fermare l'agitatore e fare defluire la soluzione di polimerizzazione.

NOTA

Le beads e successivamente la capsula dovrebbero essere sempre ricoperte da una piccola quantità di liquido per impedire la formazione di grumi, altrimenti la risospensione delle beads e della capsula diventerebbe difficile e la membrana potrebbe danneggiarsi.

9. Pompate 75 mL di soluzione di PLL allo 0,05 % e lasciare che si formi la membrana PLL-alginato per 10 minuti.
10. Fare defluire la soluzione di PLL allo 0,05 %.
11. Pompate 150 mL di tampone di lavaggio MOPS, miscelare per 1 minuto e poi fare defluire.
12. Pompate altri 150 mL di tampone di lavaggio MOPS, miscelare per 5 minuti e poi fare defluire il tampone.
13. Pompate 100 mL di soluzione di alginato allo 0,03 % e miscelare per 5 minuti per permettere la formazione della membrana esterna di alginato, poi fare defluire la soluzione di alginato.
14. Pompate 150 mL di tampone di lavaggio MOPS, miscelare per 1 minuto e poi fare defluire il tampone.
15. Pompate 150 mL di soluzione di depolimerizzazione e miscelare per circa 10 minuti per fare dissolvere l'alginato del nucleo della bead. I tempi necessari per la dissoluzione dipendono dal peso molecolare e dalla purezza dell'alginato, oltre che dalla sensibilità del prodotto di incapsulamento nei confronti della soluzione di depolimerizzazione.
16. Fare defluire la soluzione di depolimerizzazione.
17. Pompate 150 mL di tampone di lavaggio MOPS, riportare in sospensione la capsula e trasferirla nella beuta di raccolta.
18. Trasferire la capsula nel mezzo di coltura per la successiva coltura.

NOTA

L'alginato dissolto si disperde lentamente. A seconda del tipo di alginato utilizzato e dello spessore della membrana incapsulante, possono occorrere fino a 2 ore perché dalla capsula fuoriescano delle quantità significative. Per massimizzare la rimozione del nucleo si può:

- *Estendere il tempo di estrazione in un tampone MOPS o in un mezzo di coltura senza ioni bivalenti.*
- *Coltivare le cellule in un mezzo contenente < 50 mg/l di ioni Ca.*
- *Coltivare le cellule in un mezzo con un rapporto tra ioni monovalenti (Na^+ , K^+) e ioni bivalenti (Ca^{2+} , Mg^{2+}) tra 20:1 e 50:1.*

Consigli particolari per le cellule

Per cellule soggette a divisione – dissolvere il nucleo di alginato, poi mantenere il rapporto $\text{Na}/\text{Ca} > 20:1$ nel mezzo di coltura, in modo che il nucleo non possa risolidificarsi.

Per cellule stabili – si può mantenere gelificata la struttura del nucleo di alginato e si può anche usare Ba^{2+} , uno ione maggiormente gelificante del Ca^{2+} . L'alginato di bario è estremamente stabile e resiste per giorni alla dissoluzione da parte di una soluzione di 50 mM di citrato.

Vedi anche: Gröhn P. et al. 1994. Large-scale production of Ba^{2+} alginate-coated islets of Langerhans for immunoisolation. *Exp. Clin. Endocrinol.* 102: p.380-387.

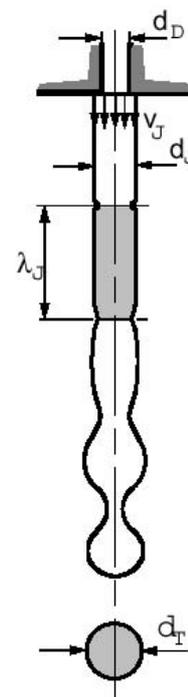
6.15 Nozioni teoriche

Equazione 1:
$$f = \frac{v}{\lambda} [Hz]$$

Quando un getto laminare viene disturbato meccanicamente alla frequenza f , si formano beads di dimensione uniforme¹. La lunghezza d'onda ottimale λ_{opt} per questa suddivisione, secondo Weber², è data dalla seguente equazione:

Equazione 2:
$$\lambda_{opt} = \pi \sqrt{2} D \cdot \sqrt{1 + \frac{3\eta}{\sqrt{\rho\sigma D}}} [m]$$

dove: D = diametro dell'ugello
 η = viscosità dinamica [Pa s]
 ρ = densità [kg/m³]
 (circa 1.000 kg/m³ per soluzioni di alginati)
 σ = tensione superficiale [N/m]
 (circa 55×10^{-3} N/m per soluzioni di alginati)



λ_{opt} è la lunghezza d'onda ottimale per ottenere la formazione migliore di beads per il diametro dell'ugello e la viscosità della miscela di incapsulamento previsti. È possibile modificare λ_{opt} del 30 % e ottenere comunque una buona formazione di beads.

Il diametro di una bead = d [m] può essere calcolato tramite la portata = V' [m³/s] e la frequenza della pulsazione f in base alla seguente equazione:

Equazione 3:
$$d = \sqrt[3]{\frac{6V'}{\pi f}} [m]$$

La velocità del getto = v [m/s] e il diametro dell'ugello = D [m] sono correlati alla portata (V') in base alla seguente equazione:

Equazione 4:
$$V' = \frac{\pi v D^2}{4} [m^3/s]$$

La Figura 6-5 indica come, in base all'Equazione 4, la portata varia in funzione della velocità del getto e del diametro dell'ugello. Poiché il liquido deve fluire in modo laminare, l'intervallo operativo della velocità del getto si trova normalmente tra 1,5 e 2,5 m/s, a seconda della viscosità del liquido e del diametro dell'ugello.

¹Lord Rayleigh 1878. Proc. London Math. Soc. 10:4.

²Weber C. 1936. Zeitschrift für angewandte Mathematik und Mechanik. 11:136.

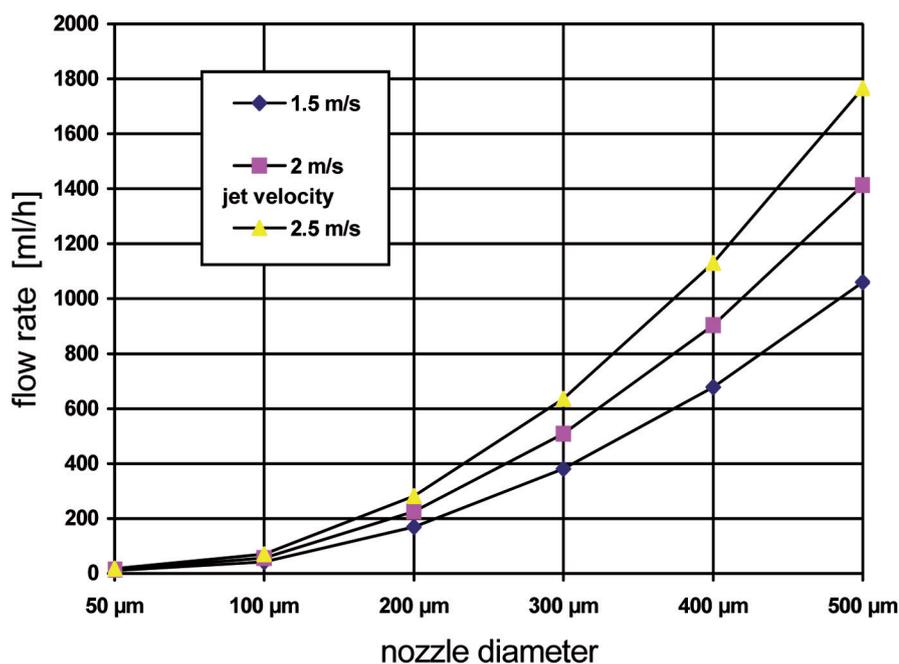


Figura 6-5: Effetto della velocità del getto liquido e del diametro dell'ugello sulla portata, calcolato in base all'Equazione 4.

La Figura 6-6 presenta la correlazione tra la frequenza della vibrazione e il diametro delle beads per cinque valori diversi di portata, calcolati in base all'Equazione 4. Con portate più basse, che corrispondono a velocità di pompaggio minori, si producono beads più piccole. Anche le frequenze di vibrazione più elevate producono beads più piccole.

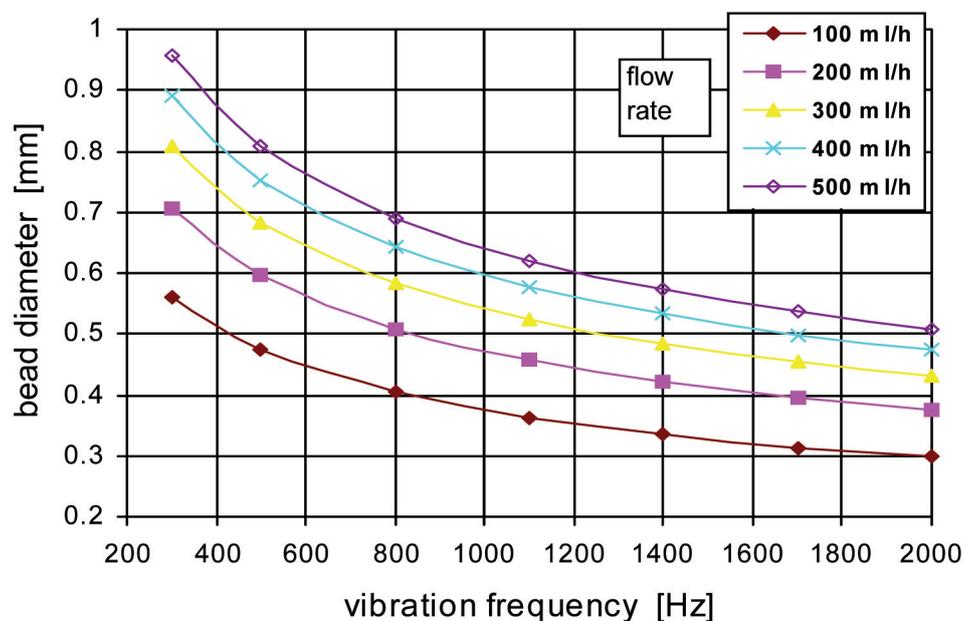


Figura 6-6: Effetto della frequenza di vibrazione e della portata sul diametro della bead, calcolato in base all'Equazione 4.

Tabella 6-7: Condizioni operative ottimali per l'Encapsulator, determinate con soluzione di alginati

Diametro dell'ugello [μm]	Portata * [mL/min]	Intervallo di frequenza **	Ampiezza	Pressione dell'aria [bar]
1,0 mm	30 – 40	40 – 220 Hz	2 – 6	0,3 – 0,6
750 μm	19 – 25	40 – 300 Hz	2 – 5	0,3 – 0,5
450 μm	9 – 14	150 – 450 Hz	2 – 5	0,3 – 0,5
300 μm	5,5 – 7	400 – 800 Hz	1 – 3	0,3 – 0,5
200 μm	3,5 – 4,5	600 – 1.200 Hz	1 – 3	0,4 – 0,6
150 μm	2,3 – 2,8	800 – 1.800 Hz	1 – 3	0,4 – 0,6
120 μm	1,5 – 1,8	1.000 – 2.500 Hz	1 – 4	0,5 – 0,7
80 μm	1,1 – 1,3	1.300 – 3.000 Hz	1 – 4	0,5 – 0,7

* Sperimentato con soluzione di alginati al 2 % a bassa viscosità per ugelli da 750 μm e 1,0 mm, con soluzione di alginati al 1,5 % per ugelli tra 150 e 500 μm e con soluzione di alginati al 1,2 % per ugelli da 80 e 120 μm.

**Valori superiori con applicazione di tensione elevata.

NOTA

Per soluzioni con una viscosità diversa da quella sperimentata, si può affermare che:

- *maggiore è la viscosità, maggiore è la velocità minima del getto*
- *maggiore è la viscosità, maggiore è la portata operativa*
- *maggiore è la viscosità, minore è la frequenza ottimale*
- *maggiore è la viscosità, maggiore è la dimensione delle beads*

6.15.1 Quantità di beads prodotta e densità delle cellule

Le *Figure 6-7 e 6-8* indicano la quantità di beads prodotta con 1 mL di liquido. Si possono formare circa 30.000 beads con un diametro di 0,4 mm, ma solo 2.000 con un diametro di 1 mm.

Le *Figure 6-9 e 6-10* indicano il numero di cellule che vengono incapsulate in una bead, in base alla densità delle cellule e al diametro delle beads previsti. Queste figure possono essere utili per scegliere la densità delle cellule adeguata nella miscela di immobilizzazione. Per esempio, se la miscela di immobilizzazione contiene 1×10^6 cellule per mL, in media ci saranno circa 33 cellule in ogni bead da 0,4 mm, mentre ci saranno circa 520 cellule in ogni bead da 1 mm.

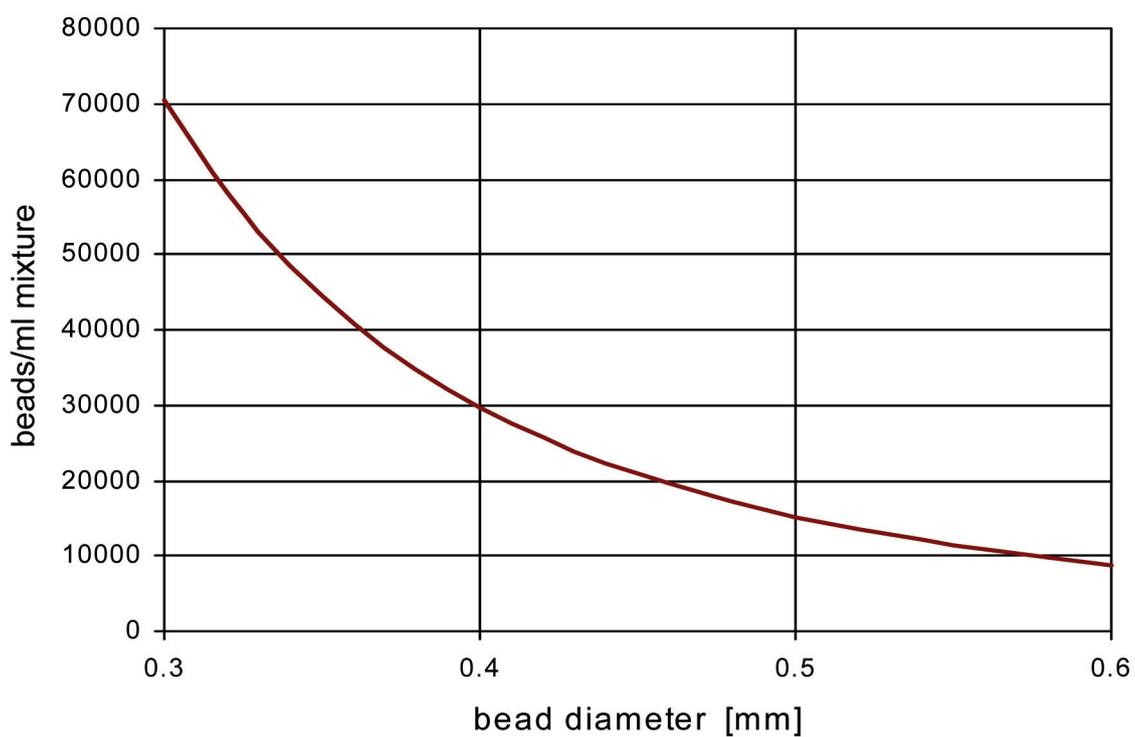


Figura 6-7: Quantità di beads con un diametro tra 0,3 e 0,6 mm prodotta con 1 mL di miscela di immobilizzazione.

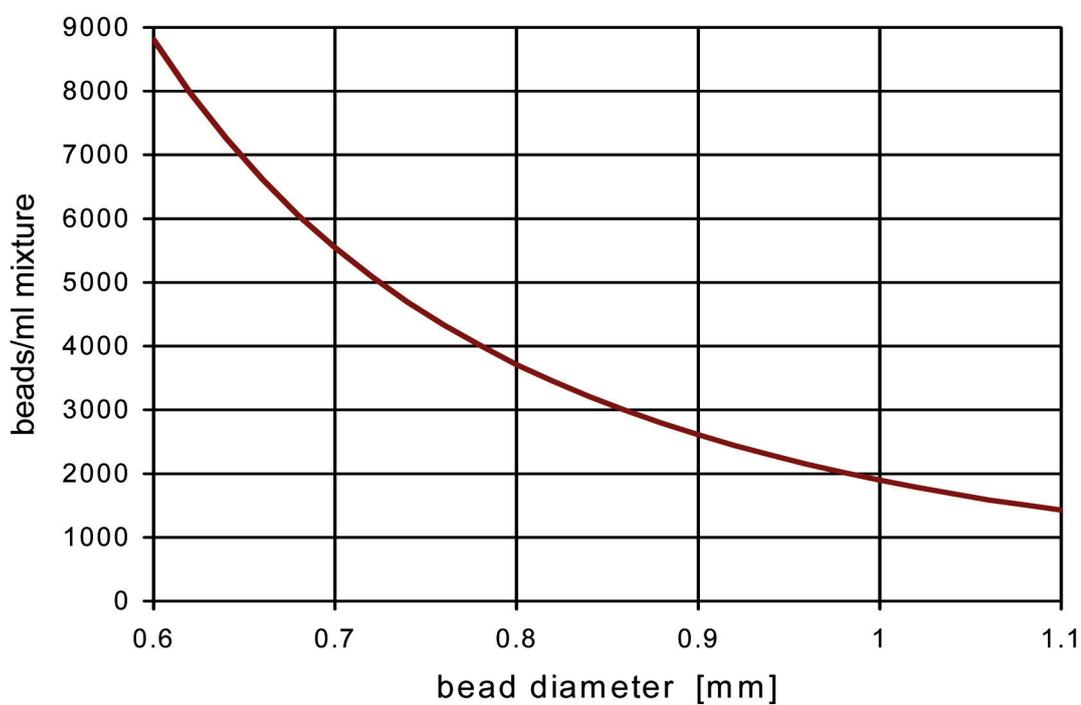


Figura 6-8: Quantità di beads con un diametro tra 0,6 e 1,1 mm prodotta con 1 mL di miscela di immobilizzazione.

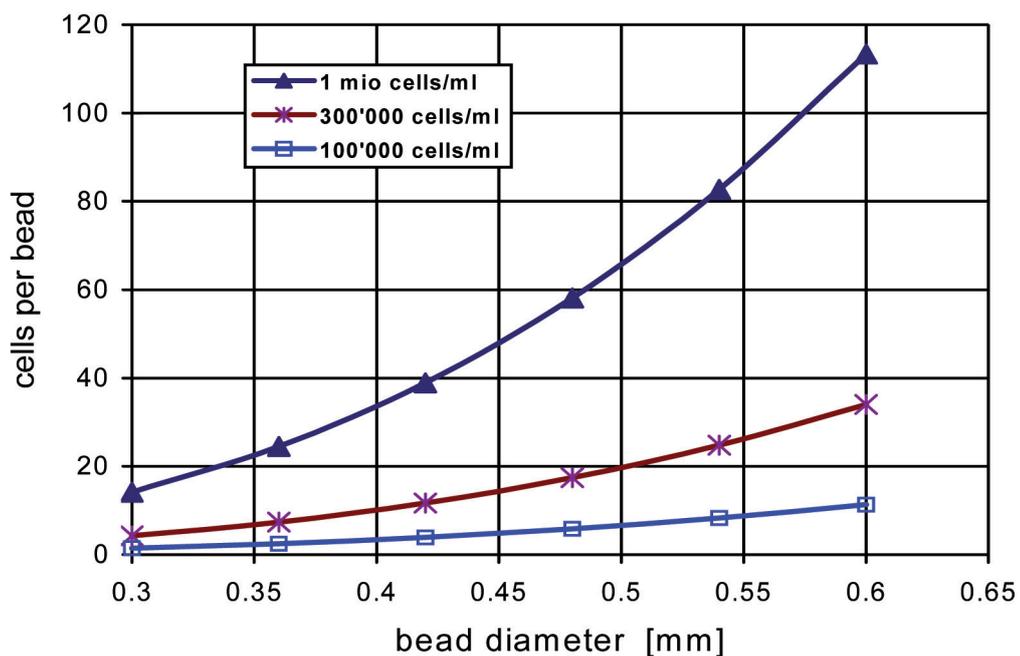


Figura 6-9: Quantità di cellule per bead prodotta con diverse concentrazioni di cellule per diametro della bead tra 0,3 e 0,6 mm.

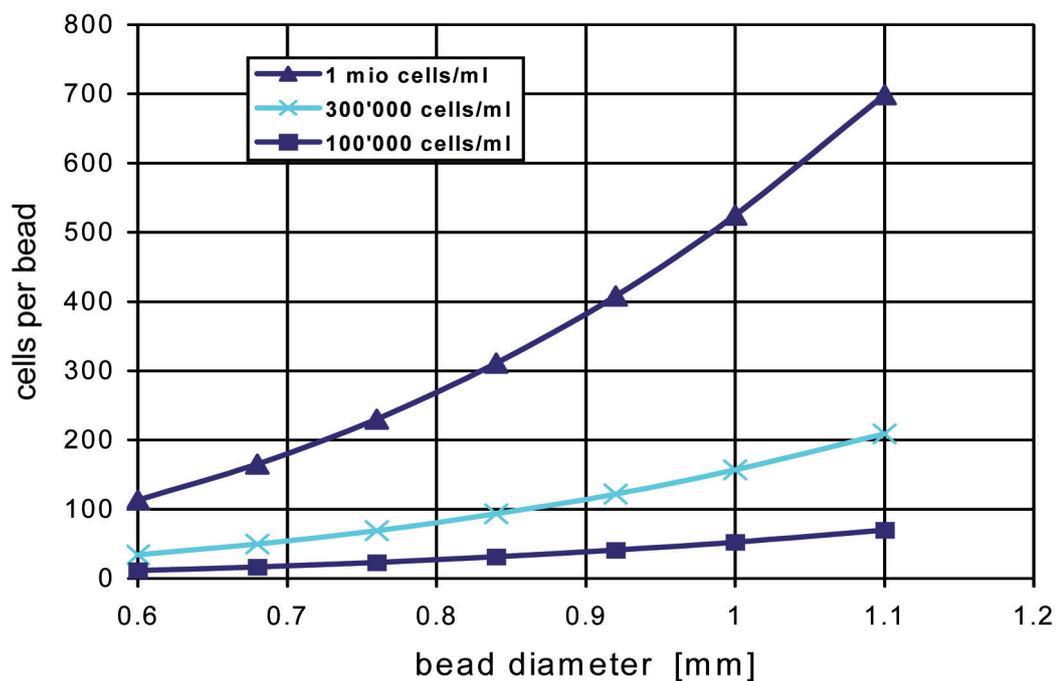


Figura 6-10: Quantità di cellule per bead prodotta con diverse concentrazioni di cellule per diametro della bead tra 0,6 e 1,1 mm.

7 Manutenzione e riparazioni

Il presente capitolo fornisce istruzioni sugli interventi di manutenzione da effettuare per mantenere lo strumento in condizioni operative buone e sicure. Tutti gli interventi di manutenzione e riparazione che richiedono l'apertura o la rimozione dell'alloggiamento esterno dello strumento devono essere effettuati da personale specializzato e solo con gli utensili previsti a tale scopo.

NOTA

Per qualsiasi intervento di manutenzione e riparazione utilizzare solo materiali di consumo e pezzi di ricambio originali, per assicurarsi la copertura della garanzia e la continuità nelle prestazioni del sistema. Qualsiasi modifica all'Encapsulator B-395 Pro o a parti di esso richiede la preventiva autorizzazione scritta da parte del produttore.

7.1 Assistenza tecnica

Solo il personale autorizzato addetto all'assistenza tecnica può eseguire interventi di riparazione sullo strumento. L'autorizzazione comporta un'approfondita formazione tecnica e la conoscenza dei possibili pericoli che possono insorgere quando si lavora con lo strumento. Tale formazione e tali conoscenze possono essere fornite solo da BUCHI.

Gli indirizzi degli uffici autorizzati di assistenza tecnica BUCHI sono disponibili sul sito web BUCHI all'indirizzo: www.buchi.com. Se sul vostro strumento si verificano malfunzionamenti o se avete domande di tipo tecnico o problemi con le applicazioni, contattate uno di questi uffici.

L'assistenza tecnica fornisce i seguenti servizi:

- fornitura di pezzi di ricambio
- riparazioni
- consulenza tecnica

7.2 Condizioni dell'alloggiamento esterno

Verificare che l'alloggiamento esterno non presenti difetti visibili (interruttori, prese, fessure) e pulirlo regolarmente con un panno umido.

L'unità di controllo dell'Encapsulator deve essere maneggiata come qualsiasi altra apparecchiatura elettrica. Il pannello anteriore è protetto da uno strato in poliammide e quindi può essere pulito con una soluzione detergente delicata o con alcol.

7.3 Condizioni di tenuta

Si consiglia di verificare regolarmente l'integrità dei dispositivi di tenuta. Guarnizioni, o-ring e tubi in silicone dovrebbero essere sostituiti periodicamente (circa una volta all'anno). Controllare tutti i componenti prima dell'uso e, se necessario, sostituirli.

7.4 Pulizia

  	! Attenzione
	<p>Aumento di pressione nel sistema di alimentazione a causa di ugelli ostruiti.</p> <p>Scoppio del sistema di alimentazione.</p>
	<p>Morte o avvelenamento grave da contatto o assorbimento delle sostanze pericolose in uso.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pulire gli ugelli immediatamente dopo l'uso, vedi capitolo seguente.

	<p>Indossare un camice da laboratorio</p>
	<p>Indossare occhiali protettivi</p>
	<p>Indossare guanti protettivi</p>

7.4.1 Pulizia dell'ugello dopo ogni ciclo di immobilizzazione

È assolutamente fondamentale pulire l'ugello immediatamente dopo l'uso in modo che il mezzo incapsulante (alginato, ecc.) non possa seccare e ostruire il sistema.

1. Lasciare l'ugello installato sull'unità di produzione delle beads.
2. Collegare una siringa da 20 mL o 60 mL all'unità di produzione delle beads e iniettare da 20 a 60 mL di acqua distillata o del solvente utilizzato per il polimero di incapsulamento.
3. Se necessario, svitare l'ugello dall'unità di produzione delle beads, sciacquarlo con acqua deionizzata (vedi *Figura 7-1*) o con un solvente adeguato e asciugarlo con un getto d'aria.

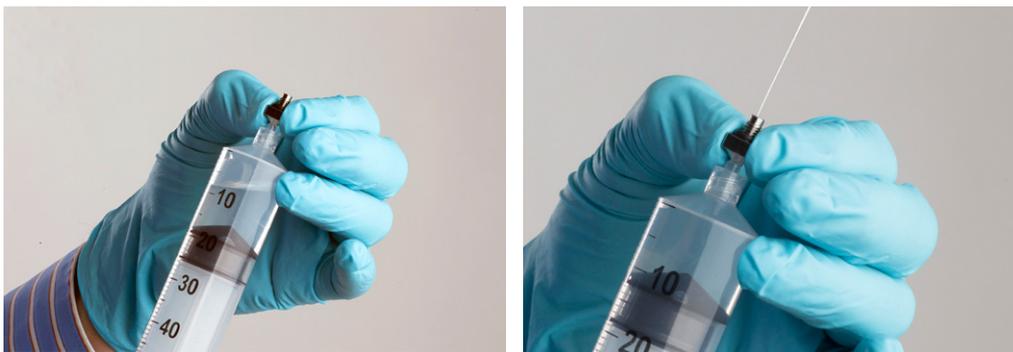


Figura 7-1: Procedura di pulizia dell'ugello

- Prendere una siringa che contenga aria alla sommità e acqua in basso.
- Iniettare l'aria attraverso l'ugello (figura a sinistra).
- Immediatamente dopo iniettare anche l'acqua attraverso l'ugello (figura a destra).
- Esaminare la punta dell'ugello al microscopio stereoscopico per assicurarsi che il passaggio sia libero e pulito.

NOTA

Se sono state utilizzate soluzioni di immobilizzazione lipofile, effettuare la pulizia con solventi adeguati. Non utilizzare soluzioni acide per gli alginati, poiché si verrebbe a creare un precipitato.

7.4.2 Pulizia di un ugello ostruito

Svitare l'ugello. Fare passare aria o acqua attraverso l'ugello come indicato nella *Figura 7-1*.

Se la punta dell'ugello non è libera, immergere l'ugello in acqua, nel solvente adeguato, in 1N NaOH o 1N acido solforico (non usare mai HCl), a seconda della miscela di incapsulamento, per 1 ora a temperatura ambiente, agitando periodicamente. In caso di ugelli in acciaio inossidabile, una procedura utile può essere la sonicazione. Indossare i dispositivi di protezione adeguati. Sciacquare con acqua distillata, con getto d'aria e lasciare asciugare.

Esaminare la punta dell'ugello al microscopio stereoscopico per assicurarsi che il passaggio sia libero e pulito.

NOTA

Se sono state utilizzate soluzioni di immobilizzazione lipofile, effettuare la pulizia con solventi adeguati. Non utilizzare soluzioni acide per gli alginati, poiché si verrebbe a creare un precipitato.

7.4.3 Pulizia del recipiente di reazione e degli altri recipienti

Smontare il recipiente di reazione. Attenzione: non si deve smontare il supporto del magnete!

Smontare il sistema di trasferimento dei liquidi.

Lavare tutti i componenti, tranne i filtri dell'aria, con una soluzione detergente delicata, 0,01N NaOH o 0,01N acido solforico (non usare mai HCl), a seconda dei casi.

Sciacquare abbondantemente con acqua calda, poi con acqua distillata e lasciare asciugare.

8 Identificazione e soluzione dei problemi

8.1 Malfunzionamenti e relative soluzioni

La tabella che segue fornisce un elenco di possibili errori operativi e delle relative cause. Per risolverli, impostare il parametro gradatamente in direzione opposta o adeguare la parte mancante.

Tabella 8-1: Possibile causa

Problema	Possibile causa
Flusso del liquido instabile	La portata del liquido è troppo bassa.
	L'ugello non è stato pulito adeguatamente (causa frequente).
	La frequenza è troppo elevata.
Catena di beads instabile	L'ampiezza è troppo elevata.
	La frequenza è troppo elevata o troppo bassa.
	La portata del liquido è troppo elevata o troppo bassa.
Distribuzione non omogenea della dimensione delle beads	L'ugello non è stato pulito adeguatamente.
	L'ampiezza è troppo bassa o troppo elevata.
	La portata del liquido è troppo elevata.
	La frequenza è troppo elevata.
La catena di beads non si separa	La tensione elettrostatica è troppo bassa.
	La miscela di immobilizzazione è un fluido non newtoniano ed è difficile da estrarre o da ridurre in granuli.
	L'elettrodo non è collegato all'unità di controllo.
Le beads non sono visibili alla luce stroboscopica	La tensione elettrica è troppo bassa.
	L'elettrodo non è inserito.
	L'unità di vibrazione non è attivata.
	L'unità di vibrazione non è posizionata sull'unità di produzione delle beads.
	La frequenza della vibrazione è troppo bassa o troppo elevata.
	La viscosità della miscela di immobilizzazione è troppo elevata.

9 Smontaggio, conservazione, trasporto e smaltimento

Il presente capitolo fornisce le istruzioni per smontare e imballare lo strumento per la conservazione o il trasporto. Vengono inoltre elencate le indicazioni per la conservazione e le condizioni di trasporto.

9.1 Conservazione e trasporto

Spegnere lo strumento e staccare il cavo di alimentazione. Per smontare l'Encapsulator B-395 Pro, seguire le istruzioni di installazione fornite al Capitolo 5 in ordine inverso. Rimuovere tutti i liquidi e i residui di polvere prima di imballare lo strumento.

	<p>⚠ Attenzione</p>
	<p>Morte o avvelenamento grave da contatto o assorbimento di sostanze pericolose.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Indossare occhiali di protezione • Indossare guanti di protezione • Indossare un camice da laboratorio • Pulire accuratamente lo strumento e tutti gli accessori per rimuovere le sostanze potenzialmente pericolose • Non pulire i componenti impolverati con aria compressa • Conservare lo strumento e i suoi accessori in un luogo asciutto, nell'imballaggio originale

9.2 Smaltimento

Per smaltire lo strumento in modo eco-compatibile, consultare l'elenco dei materiali fornito al Capitolo 3.3, per assicurarsi che i componenti vengano separati e riciclati correttamente. Attenersi alla normativa vigente a livello regionale e locale in materia di smaltimento. Per ulteriori informazioni, contattare le autorità locali.

NOTA

In caso di restituzione dello strumento al produttore per interventi di riparazione, si prega di copiare e compilare il modulo di dichiarazione in materia di salute e sicurezza (Capitolo 10.2) e di allegarlo allo strumento.

10 Dichiarazioni e requisiti

10.1 Requisiti FCC (per USA e Canada)

English:

This equipment has been tested and found to comply with the limits for a Class A digital device, pursuant to both Part 15 of the FCC Rules and the radio interference regulations of the Canadian Department of Communications. These limits are designed to provide reasonable protection against harmful interference when the equipment is operated in a commercial environment.

This equipment generates, uses and can radiate radio frequency energy and, if not installed and used in accordance with the instruction manual, may cause harmful interference to radio communications. Operation of this equipment in a residential area is likely to cause harmful interference in which case the user will be required to correct the interference at his own expense.

Français:

Cet appareil a été testé et s'est avéré conforme aux limites prévues pour les appareils numériques de classe A et à la partie 15 des réglementations FCC ainsi qu'à la réglementation des interférences radio du Canadian Department of Communications. Ces limites sont destinées à fournir une protection adéquate contre les interférences néfastes lorsque l'appareil est utilisé dans un environnement commercial.

Cet appareil génère, utilise et peut irradier une énergie à fréquence radioélectrique, il est en outre susceptible d'engendrer des interférences avec les communications radio, s'il n'est pas installé et utilisé conformément aux instructions du mode d'emploi. L'utilisation de cet appareil dans les zones résidentielles peut causer des interférences néfastes, auquel cas l'exploitant sera amené à prendre les dispositions utiles pour palier aux interférences à ses propres frais.

10.2

Dichiarazione in materia di salute e sicurezza

Health and Safety Clearance

Declaration concerning safety, potential hazards and safe disposal of waste.

For the safety and health of our staff, laws and regulations regarding the handling of dangerous goods, occupational health and safety regulations, safety at work laws and regulations regarding safe disposal of waste, e.g. chemical waste, chemical residue or solvent, require that this form must be duly completed and signed when equipment or defective parts were delivered to our premises.

Instruments or parts will not be accepted if this declaration is not present.

Equipment

Model:

Part/Instrument no.:

1.A Declaration for non dangerous goods

We assure that the returned equipment

- has not been used in the laboratory and is new
- was not in contact with toxic, corrosive, biologically active, explosive, radioactive or other dangerous matters.
- is free of contamination. The solvents or residues of pumped media have been drained.


1.B Declaration for dangerous goods

List of dangerous substances in contact with the equipment:

Chemical, substance	Danger classification

We assure for the returned equipment that

- all substances, toxic, corrosive, biologically active, explosive, radioactive or dangerous in any way which have pumped or been in contact with the equipment are listed above.
- the equipment has been cleaned, decontaminated, sterilized inside and outside and all inlet and outlet ports of the equipment have been sealed.

2. Final Declaration

We hereby declare that

- we know all about the substances which have been in contact with the equipment and all questions have been answered correctly
- we have taken all measures to prevent any potential risks with the delivered equipment.

Company name or stamp: _____

Place, date: _____

Name (print), job title (print): _____

Signature: _____

Distributors

Quality in your hands

Filiali BUCHI:

BÜCHI Labortechnik AG
CH – 9230 Flawil 1
T +41 71 394 63 63
F +41 71 394 65 65
buchi@buchi.com
www.buchi.com

BUCHI Italia s.r.l.
IT – 20010 Cornaredo (MI)
T +39 02 824 50 11
F +39 02 57 51 28 55
italia@buchi.com
www.buchi.it

BUCHI Russia/CIS
United Machinery AG
RU – 127787 Moscow
T +7 495 36 36 495
F +7 495 981 05 20
russia@buchi.com
www.buchi.ru

Nihon BUCHI K.K.
JP – Tokyo 110-0008
T +81 3 3821 4777
F +81 3 3821 4555
nihon@buchi.com
www.nihon-buchi.jp

BUCHI Korea Inc
KR – Seoul 153-782
T +82 2 6718 7500
F +82 2 6718 7599
korea@buchi.com
www.buchi.kr

BÜCHI Labortechnik GmbH
DE – 45127 Essen
FreeCall 0800 414 0 414
T +49 201 747 490
F +49 201 747 492 0
deutschland@buchi.com
www.buechigmbh.de

BÜCHI Labortechnik GmbH
Branch Office Benelux
NL – 3342 GT
Hendrik-Ido-Ambacht
T +31 78 684 94 29
F +31 78 684 94 30
benelux@buchi.com
www.buchi.be

BUCHI China
CN – 200052 Shanghai
T +86 21 6280 3366
F +86 21 5230 8821
china@buchi.com
www.buchi.com.cn

BUCHI India Private Ltd.
IN – Mumbai 400 055
T +91 22 667 75400
F +91 22 667 18986
india@buchi.com
www.buchi.in

BUCHI Corporation
US – New Castle,
Delaware 19720
Toll Free: +1 877 692 8244
T +1 302 652 3000
F +1 302 652 8777
us-sales@buchi.com
www.mybuchi.com

BUCHI Sarl
FR – 94656 Rungis Cedex
T +33 1 56 70 62 50
F +33 1 46 86 00 31
france@buchi.com
www.buchi.fr

BUCHI UK Ltd.
GB – Oldham OL9 9QL
T +44 161 633 1000
F +44 161 633 1007
uk@buchi.com
www.buchi.co.uk

BUCHI (Thailand) Ltd.
TH – Bangkok 10600
T +66 2 862 08 51
F +66 2 862 08 54
thailand@buchi.com
www.buchi.co.th

PT. BUCHI Indonesia
ID – Tangerang 15321
T +62 21 537 62 16
F +62 21 537 62 17
indonesia@buchi.com
www.buchi.co.id

BUCHI Brasil Ltda.
BR – Valinhos SP 13271-570
T +55 19 3849 1201
F +41 71 394 65 65
latinoamerica@buchi.com
www.buchi.com

Centri di assistenza BUCHI:

South East Asia
BUCHI (Thailand) Ltd.
TH-Bangkok 10600
T +66 2 862 08 51
F +66 2 862 08 54
bacc@buchi.com
www.buchi.com

Latin America
BUCHI Latinoamérica Ltda.
BR – Valinhos SP 13271-570
T +55 19 3849 1201
F +41 71 394 65 65
latinoamerica@buchi.com
www.buchi.com

Middle East
BUCHI Labortechnik AG
UAE – Dubai
T +971 4 313 2860
F +971 4 313 2861
middleeast@buchi.com
www.buchi.com

BÜCHI NIR-Online
DE – 69190 Walldorf
T +49 6227 73 26 60
F +49 6227 73 26 70
nir-online@buchi.com
www.nir-online.de

Siamo rappresentati da oltre 100 partner distributori in tutto il mondo.
Cercate il contatto più vicino sul sito: www.buchi.com