PREMIO RICERCA & INNOVAZIONE X EDIZIONE

Il Comune di Monteroni e l'Università del Salento, per la sua brillante carriera universitaria in Materials Engineering and Nanotechnology hanno conferito alla Dott.ssa Serena Cortazzi il premio "Ricerca & Innovazione: X edizione". Laureatasi nell'ottobre 2020 con il massimo dei voti e la lode, ha concluso il percorso accademico con una tesi in bioingegneria dal titolo "Scaffold bioattivi per la rigenerazione di tessuto osseo". Il lavoro è stato selezionato dal comitato scientifico nominato dal Rettore dell'Università del Salento come miglior tesi di ricerca per il positivo contributo nel settore healthcare nel territorio salentino. L'attività, svolta presso il laboratorio di Biomateriali del Dipartimento di Ingegneria dell'Innovazione dell'Università del Salento, sotto la supervisione del Prof. Ing. Christian Demitri e della Dott.ssa Paola Nitti, si è focalizzata sullo sviluppo di un innovativo medical device per il miglioramento dell'osteointegrazione negli impianti dentali, applicando le conoscenze della scienza dei materiali nel campo della medicina rigenerativa. Con una tecnica all'avanguardia sono stati realizzati scaffold bioattivi compositi per la crescita di nuovo tessuto osseo in seguito a fenomeni degenerativi o traumi.



SCAFFOLDS BIOATTIVI PER LA RIGENERAZIONE OSSEA

Serena Cortazzi, Paola Nitti, Sanosh Kunjalukkal Padmanabhan, Antonio Licciulli, Christian Demitri*

Dipartimento di Ingegneria dell'Innovazione, Università del Salento, Via Monteroni 73100 - Lecce

* christian.demitri@unisalento.it

SOMMARIO

L'ingegneria tissutale è uno degli approcci più innovativi per favorire la rigenerazione di un tessuto danneggiato e il ripristino delle sue funzionalità. Non tutti i tessuti del nostro corpo sono in grado di rigenerarsi in modo spontaneo dopo un trauma, in particolare a seguito di grandi lesioni come il caso traumi che creano ampi difetti ossei. A supporto di ciò si utilizzano dei dispositivi medici, gli scaffold, che in combinazione con cellule e/o molecole bioattive e impiantati nel sito d'interesse, supportano la formazione di nuovo tessuto. Lo scopo di questo lavoro è stato la realizzazione e caratterizzazione di scaffold bioattivi per la rigenerazione del tessuto osseo a base di idrossiapatite (pura e modificata con magnesio e silicio) e collagene di tipo I. La scelta di tale composizione è stata effettuata rispettando un requisito primario per il trattamento delle lesioni tissutali: mimare le proprietà del tessuto da rigenerare. Per incrementare le caratteristiche di bioattività, è stato messo in atto un approccio innovativo di liofilizzazione, in cui gli scaffold compositi sono stati immersi in acqua fredda, congelati e poi liofilizzati, creando così una struttura con pori aperti, una caratteristica essenziale per il ruolo di tali dispositivi. Inoltre, le caratteristiche di stabilità meccanica e degradabilità degli scaffold 3D sono essenziali per il loro utilizzo, motivo per cui sono stati analizzate le proprietà meccaniche a compressione e la durabilità dei campioni in soluzione tampone Tris-HCI. L'analisi della microstruttura, della perdita di peso e della resistenza meccanica per differenti tempi di incubazione, ha rivelato una moderata perdita di peso e una riduzione delle prestazioni meccaniche dovute alla dissoluzione del collagene. Al contempo, si è osservato che la presenza del collagene, prima che esso si degradi, protegge la struttura ceramica in ambiente fisiologico.

INTRODUZIONE

Gli scaffold per l'ingegneria tissutale, per esplicare il loro funzione rigenerativa, devono possedere alcune proprietà come la biocompatibilità, favorire la crescita cellulare, la proliferazione, la deposizione di nuovo tessuto, e contemporaneamente, fungere da supporto strutturale al nuovo tessuto [1]. Per eseauire ciò, ali scaffold devono avere caratteristiche biomimetiche е bioattive. In particolare, devono avere proprietà meccaniche simili a quelle del sito di riparazione, adeguata biocompatibilità biodegradabilità, е una dimensione dei pori adeguata (200-800 µm per il porosità una tessuto osseo) е aperta е interconnessa, maggiore del 90% [2]. L'elevata porosità consente un apporto adeguato di nutrienti, lo smaltimento di rifiuti metabolici, e un'opportuna vascolarizzazione per la crescita dei tessuti [3].

Numerosi sono gli studi che prevedono l'utilizzo di scaffold per la rigenerazione del tessuto osseo a base di idrossiapatite (HA), che conferisce ad essi tenacità e resistenza meccanica. Mentre gli scaffold a base di collagene sono ampiamente utilizzati per la presenza di stimoli biomimetici che inducono proliferazione cellulare. Questi, mostrano un'elevata porosità e permeabilità, ma scarse proprietà meccaniche e una rapida degradazione enzimatica, che ne limita l'utilizzo quando è richiesta un'elevata resistenza meccanica [4]. Pertanto, per superare gli aspetti negativi di entrambi i materiali, in questo studio si sono realizzati scaffold compositi a base

di HA e collagene. Inoltre, sebbene l'HA sia biocompatibile e osteoconduttivo, ha una scarsa riassorbibilità che potrebbe comprometterne il processo rigenerativo [5]; per migliorare tale aspetto, si è modificata la polvere di HA introducendo ioni attivi biologici. L'apatite ossea ha una struttura cristallina che consente la sostituzione degli ioni ossei costitutivi (Ca²⁺, PO₄³⁻ e OH⁻) con altri ioni presenti nel tessuto osseo naturale (come CO₃²⁻, Mg²⁺, SiO₄⁴⁻). Queste sostituzioni causano cambiamenti nella cristallinità, solubilità nell'omeostasi ossea portando a una più veloce osteogenesi, angiogenesi e degradazione [6]. Sulla base di queste considerazioni, nel lavoro di ricerca condotto, l'idrossiapatite è stata valutata sia nella sua forma pura che drogata con magnesio (Mg) e silicio (Si). Per migliorare l'osteointegrazione, gli scaffold bioceramici, a partire dalle polveri a base di HA, sono stati sintetizzati utilizzando il metodo Sponge Replica, ottenendo una porosità aperta e interconnessa maggiore del 90% [7]. Successivamente i campioni sono stati impregnati in una matrice di collagene e liofilizzati, utilizzando un nuovo approccio. Questo ha determinato una migliore porosità superficiale e incremento della bioattività dei dispositivi. I due approcci di liofilizzazione (nuovo e tradizionale) e i tre tipi di scaffold compositi (HA-Coll, HA-Mg Coll, HA-Si_Coll) sono stati confrontati da un punto di vista morfologico, meccanico e di stabilità. La velocità di degradazione degli scaffold ossei è fondamentale per: la crescita cellulare, la risposta da corpo estraneo e la rigenerazione dei tessuti. Idealmente, affinché il processo rigenerativo vada a buon fine,

gli scaffold dovrebbero presentare una velocità di degradazione pari alla velocità di formazione del nuovo tessuto osseo [8]. Per tale ragione, si sono simulate le condizioni fisiologiche, incubando gli scaffold in soluzione tampone, per poi analizzarne le variazioni strutturali e la resistenza meccanica.

SINTESI DEGLI SCAFFOLD CERAMICI

Le polveri di HA pura e sostituita (con magnesio e silicio) sono stati sintetizzate mediante reazione di precipitazione acquosa utilizzando Ca(NO₃)₂·4H₂O, H₃PO₄ (85 w/v), Mg(NO₃)₂·6.H2O, Si(CH₃CH₂O)₄ (TEOS) e precursori di NH₄OH. Le quantità di reagenti sono state calcolate considerando che il calcio sarebbe stato sostituito dal magnesio e il fosforo dal silicio. Si è considerato un rapporto stechiometrico Ca/P=1.67, valore per cui l'apatite preserva le sue proprietà osteoinduttive e di biocompatibilità nell'organismo. Per ottenere le tre tipologie di polveri (pura HA, HA-Mg e HA-Si), si è seguito la stessa tecnica; per ottenere la precipitazione si è portato il pH=10 aggiungendo NH₄OH, dopodiché la soluzione è stata mantenuta in agitazione per 2 ore e poi posta in forno a 400 ° C. Dopo l'essiccazione, i grumi di polvere sono stati macinati e calcinati a 900 ° C in un forno elettrico per ottenere le tre tipologie di polveri (HA, HA-Mg, HA-Si) in forma semicristallina.

Una volta sintetizzate, le polveri sono state utilizzate nel metodo *Sponge Replica* per ottenere gli scaffold bioceramici porosi. Sono stati prodotti tre diversi composti con le tipologie di polveri di apatite (HA, HA-Mg, HA-Si). Come schematizzato in figura 1, per ottenere i tre composti, è stata







Fig. 2 - Tecnica di liofilizzazione innovativa messa in atto

aggiunta la polvere fino a una concentrazione finale del 70% in peso e un legante il polivinilalcol (PVA) all'1%. Come agente deflocculante è stato polielettrolita (Dolapix utilizzato un CE64, Zschimmer-Schwarz, Germania). Successivamente, dei cubetti di spugna di poliuretano (PU) (1 cm³, densità 30 kg/m³) sono stati immersi nella sospensione per l'impregnazione, poi strizzati delicatamente per rimuovere il materiale in eccesso ed asciugati a 60° C per 12h. Infine, le spugne impregnate sono state sottoposte a processo di sinterizzazione a T=1300°C, secondo il profilo di temperatura.

LIOFILIZZAZIONE CON COLLAGENE

La liofilizzazione è una delle tecnica più cumuni per ottenere gli scaffold porosi.

Il processo consiste in tre fasi: (i) congelamento della soluzione acquosa, (ii) primo riscaldamento per rimuovere il ghiaccio mediante sublimazione e (iii) riscaldamento secondario per rimuovere l'acqua non congelata o assorbita mediante desorbimento [9]. La fase di congelamento influenza alcuni parametri critici, come: la porosità e la superficie specifica dello scaffold finale. I cristalli di ghiaccio fungono da tamplate per la struttura finale, motivo per cui è necessario un processo di congelamento controllato per ottenere pori con dimensioni e orientamento adeguato. Le dimensioni dei cristalli di ghiaccio sono strettamente correlate alla velocità di raffreddamento, а basse velocità di raffreddamento si formano pochi cristalli di ghiaccio e di dimensioni maggiori rispetto a velocità di raffreddamento più elevate, dove si formano cristalli di ghiaccio più piccoli.

Solitamente, durante la cristallizzazione del ghiaccio, si forma sulla superficie superiore dei campioni liofilizzati un sottile strato. Questo può impedire il trasferimento del vapore acqueo durante la sublimazione e rallentare la velocità di sublimazione, provocando la formazione di pori chiusi sulla superficie degli scaffold [11]. Per evitare tale inconveniente, in questo studio, si è messo in atto un nuovo approccio di liofilizzazione. Creare una struttura con una porosità superficiale adeguata è un aspetto fondamentale per la migrazione e la proliferazione cellulare. Gli scaffold impregnati di collagene sono stati prima immersi in acqua fredda e poi congelati. Questo per favorire la nucleazione dei cristalli di ghiaccio sul bordo tra la superficie esterna e quella interna dei campioni, portando alla formazione di pori più aperti e interconnessi.

La matrice di collagene (0,5% p/v) è stata preparata sciogliendo il collagene di tipo I di origine equina

(fornito da Typeone srl, Lecce, IT) [10] in una soluzione acquosa di acido acetico a pH 3,8; poi è stata utilizzata per impregnare sottovuoto gli scaffold di idrossiapatite. Gli scaffold impregnati sono stati liofilizzati (LIO-5P, Cinquepascal, Italia) secondo diversi approcci: (i) metodo tradizionale in cui i campioni sono stati raffreddati a T = -20 ° C e (ii) metodo innovativo, figura 2, in cui sono stati posizionati scaffold piastre di ghiaccio, immerse in acqua distillata fredda (0 ° C) e raffreddate a T = -20 ° C. Dopo la liofilizzazione, gli scaffold compositi sono stati sottoposti a reticolazione con tecnica deidrotermica (DHT) per 24 ore a 121 ° C.

ANALISI E CARATTERIZZAZIONE

Morfologia superficiale

La morfologia superficiale degli scaffold è stata valutata con microscopio elettronico a scansione (SEM) con una tensione d'accelerazione di 20kV. Una volta acquisite le immagini, e mediante software ImageJ, è stato determinato il diametro medio dei pori, considerando 20 misurazioni scelte casualmente nelle immagini di ogni campione. Nella tabella 1 i diametri sono stati riportati come media ± SEM (errore standard della media).

Proprietà meccaniche

Le proprietà meccaniche degli scaffold sono state determinate mediante prove di compressione, utilizzando una macchina di prova universale (strumento Lloyd LR5K, Fareham Hants, UK), dotata di una cella di carico da 1 kN. Gli scaffold, posti tra due strati di parafilm, sono stati compressi a una velocità di deformazione di 0,5 mm / min. Tali prove sono state condotte per ottenere lo stress massimo a rottura (omax), calcolato come rapporto tra il carico massimo di rottura raggiunto e l'area della sezione trasversale dei campioni. I risultati degli scaffold compositi, espressi come media ± SEM (errore standard della media), sono riportati nella tabella 1.

Tab. 1 – Dimensione media dei pori e tensione massimaa rottura degli scaffold compositi

Tipo campione	Diametro dei pori (µm)	σ (MPa)
HA_Coll	602 ± 0.04	0.05 ± 0.01
HA-Mq_Coll	482 ± 0.03	0.22 ± 0.07
HA-Si_Coll	524 ± 0.06	0.09 ± 0.02

TEST DI STABILITÀ

Per andare a simulare le condizioni fisologiche in cui tali dispositivi verranno a trovarsi, questi sono stati posti in soluzione tampone Tris-HCL a pH=7,4 e T=37°C. A intervalli di tempo programmati (3, 7, 14 e 28 giorni), gli scaffold sono stati rimossi dalla soluzione, lavati con acqua ed etanolo e, infine, essiccati in stufa a 60 ° C per 24 ore. Fatto ciò sono stati pesati e calcolate le percentuali di perdita di peso secondo tale formula [8]:

% Weight loss =
$$\frac{W_0 - W_{Tris}}{W_0}$$

Dove W_0 è il peso iniziale del campione e W_{Tris} il peso finale dopo l'immersione in soluzione Tris-HCl.

Dopo i test di degradazione, gli scaffold sono stati sottoposti a analisi morfologica (acquisizione SEM) e a test di compressione, come i medesimi non sottoposti a prove di degradazione.

RISULTATI MORFOLOGICI E MECCANICI

La figura 3 mostra le immagini SEM degli scaffold realizzati con i 2 approcci di liofilizzazione, guello tradizionale e quello innovativo. L'utilizzo di questo nuovo approccio sembra confermare la presenza di una superficie con porosità più aperte. La nucleazione dei cristalli di ghiaccio sulla superficie dello scaffold aumenta la presenza di pori aperti sullo strato esterno dello scaffold, parte che sarà a contatto con i tessuti (Fig. 3 d, e, f). Ciò un aspetto vantaggioso rappresenta non trascurabile rispetto a quanto si ottiene con una liofilizzazione tradizionale in cui la formazione di uno strato di collagene sulla superficie chiude i pori presenti, limitandone l'ingresso cellulare (Fig. 3 a, b, c).

Una superficie con pori aperti promuove la migrazione delle cellule dall'esterno all'interno dello scaffold, ciò potrebbe determinare *in vivo* una

migliore crescita del tessuto osseo. Inoltre, l'infiltrazione e l'adesione cellulare sarà favorita dalla dimensione adeguata dei diametri dei pori sulla superficie degli scaffold (tra 200 μ m e 600 μ m) (Tab.1) e dalla porosità media intorno al 92% degli scaffold ceramici[12].

I risultati dei test di compressione sforzodeformazione, condotti in accordo con la letteratura [7], hanno riportato un comportamento compressione fragile, tipico dei materiali in ceramici. La resistenza meccanica degli scaffold è valutata considerando la massima stata sollecitazione a rottura (omax) per tutti i campioni. Tutti i campioni hanno mostrato valori di stress medio bassi (Tab.1), probabilmente a causa della scarsa resistenza a compressione delle fibrille di collagene di tipo I, perché l'elevato rapporto tra lunghezza e diametro le rende più instabili all'aumentare del carico a cui sono sottoposte. Tuttavia, tra le tre tipologie, gli scaffold HA-Mg_Coll hanno mostrato più alta resistenza a compressione, grazie alla presenza dello ione Mg²⁺, il quale incrementa il grado di sinterabilità della polvere ceramica, e tale aspetto si riflette sul comportamento meccanico di tali scaffold.

STABILITÀ DEGLI SCAFFOLD

Come già affermato, la biodegradabilità è un aspetto essenziale degli scaffold che ne influenza la bioattività, la velocità di degradazione deve essere sincrona con la velocità di rigenerazione del tessuto osseo. Poichè, una lenta degradazione potrebbe indurre una risposta infiammatoria nell'organismo; mentre, una velocità eccessivamente alta non consentirebbe allo scaffold di fungere da supporto meccanico al nuovo tessuto. Per tale ragione si sono effettuati i test di Tris-HCl, stabilità in con le modalità



HA-Mg_Coll

HA-Si Coll



Fig. 3 – Immagini SEM degli scaffold HA, HA-Mg and HA-Si, liofilizzati con metodo tradizionale (a, b, c) e i rispettivi liofilizzati con il nuovo approccio (d, e, f). (scale bar: 200 µm; ingrandimento 60X)

4



Fig. 4 – Immagini SEM degli scaffold HA, HA-Mg and HA-Si, analizzati ai vari intervalli di tempo (scale bar: 200 μm; ingrandimento 60X)

precedentemente indicate. Gli scaffold compositi dopo l'immersione, come mostrato in Fig. 4, hanno mostrato una graduale perdita della componente organica in collagene. Dopo 3 giorni in Tris-HCl, gli scaffold HA_Coll presentano una riduzione del collagene sulla superficie rispetto agli analoghi in HA-Mg_Coll e HA-Si_Coll. Dopo una settimana, invece, i campioni HA-Mg_Coll presentavano una quantità di collagene più alta rispetto agli analoghi in HA_Coll e HA-Si_Coll. Tuttavia, a 14 e infine a 28 giorni, la degradazione del collagene è stata continua per tutti i tipi di scaffold, fino a guando la proteina è scomparsa del tutto sulla superficie, mostrando così solo la componente ceramica. tendenza alla degradazione Questa è stata



Fig. 5 – Andamento della % Perdita di peso degli scaffold compositi HA_Coll, HA-Mg_Coll e HA-Si_Coll.

confermata anche dalle misurazioni della % di perdita di peso (Fig. 5.).

Gli scaffold hanno mostrato un profilo di degradazione differente; quelli in HA-Mg_Coll, pressoché stabili in condizioni fisiologiche, hanno riportato una velocità di degradazione significativamente inferiore rispetto agli scaffold HA-Coll e HA-Si_Coll (% di perdita di peso: 0,36 ± 0,05; 1,61 ± 0,23 e 1,17 ± 0,05 dopo 28 giorni, rispettivamente). Gli scaffold ceramici in HA e Coll hanno presentato un'elevata percentuale di perdita di peso dopo 7 giorni, e poi ai 28 giorni; tale aspetto non è emerso nel caso dei campioni HA-Mg_Coll e HA-Si_Coll, nei quali il profilo di stabilità è costante dopo 3 giorni in soluzione.





La maggiore degradazione degli scaffold HA_Coll è stata confermata anche dalle prove meccaniche (Fig.6).

Dopo una settimana in soluzione, la perdita della componente proteica si riflette nell'aumento dello stress a rottura, essendo presente principalmente la parte ceramica, più resistente a compressione. All'aumentare dei tempi in soluzione aumenta la degradazione della struttura ceramica, infatti, dopo quattro settimane, la perdita di peso, in tutte e tre le tipologie di scaffold compositi, raggiunge i valori più elevati rispetto a tempi inferiori. Ciò determina un importante diminuzione della resistenza a rottura. Un aspetto interessante che si può notare dai valori di omax registrati è che, i campioni HA_Coll e HA-Si_Coll hanno presentato un incremento delle proprietà a compressione ai 7 giorni, dovuto alla progressiva perdita di collagene, il quale, come già affermato, ne influenza negativamente la resistenza. Tuttavia, gli scaffold compositi con HA drogata con Si, dopo 28 giorni $(\sigma max = 0.20 \pm 0.05 \text{ MPa})$ hanno esibito un comportamento analogo ai medesimi senza la proteina (omax = 0,18 ± 0,05 MPa), da ciò si deduce che il collagene preservi la struttura ceramica durante la degradazione per tempi più lunghi rispetto ai campioni HA Coll. Mentre, i campioni HA-Mg_Coll, sebbene abbiano riportato le migliori prestazioni meccaniche prima dei test di stabilità (omax= 0,22 ± 0,07 MPa), dopo essere stati posti in Tris-HCl hanno manifestato uno performance continuo decremento delle meccaniche, ai 28 giorni σ max= 0,05 ± 0,01 MPa. Questo fenomeno potrebbe essere causato dalla contemporanea degradazione del collagene e della componente ceramica, l'introduzione di Mg2+ nell'HA potrebbe portare alla formazione di una fase secondaria, come il β-TCP, più solubile dell'apatite che ne deteriora la resistenza finale degli scaffold [13].

CONCLUSIONI

La tecnica di liofilizzazione innovativa messa in pratica per realizzare gli scaffold bioattivi sembra essere molto promettente. Infatti, sono state soddisfatte le proprietà morfologiche, l'elevata porosità (> 90%) e la presenza di pori superficiali aperti e interconnessi. Ciò dovrebbe favorire la colonizzazione e la migrazione delle cellule all'interno dei dispositivi. Analizzando le proprietà degli scaffold compositi dopo i test di stabilità, si può concludere che i campioni HA-Mg_Coll hanno esibito le migliori prestazioni in termini di perdita di peso, mentre gli scaffold HA-Si_ Coll migliore resistenza meccanica a lungo termine (dopo 28 giorni). Considerando le caratteristiche che gli scaffold bioattivi devono possedere, lo sviluppo di scaffold a base di HA modificata con ioni quali SiO44- e Mg2+ e collagene risulta un'idea vincente per il trattamento di lesioni ossee. Tuttavia, i campioni compositi in HA modificata con silicio sono risultati i dispositivi più idonei per il loro utilizzo, considerando gli aspetti relativi alla porosità, velocità e resistenza alla compressione. Le conclusioni a cui si è giunti dovranno essere confermate anche dagli studi di proliferazione e vitalità cellulare.

BIBLIOGRAFIA

- [1] [1] O'Brien FJ, Harley BA, Waller MA, Yannas IV, Gibson LJ, Prendergast PJ. (2007), *The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering.* Technol Health Care.15:3-17.
- [2] [2] Jones JR. (2013), *Review of bioactive glass: From Hench to hybrids.* Acta Biomaterialia.9:4457-4486.
- [3] [3] Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, Langer R. (1994) *Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering*. Bio/Technology.12:689-693.
- [4] [4] Akkouch A, Zhang Z, Rouabhia M. (2011) A novel collagen/hydroxyapatite/poly(lactide-co-εcaprolactone) biodegradable and bioactive 3D porous scaffold for bone regeneration. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2020/10/22;96A:693-704.
- [5] [5] Wei G, Ma P. (2004) *Structure and Properties of Nano-Hydroxyapatite/Polymer Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering.* Biomaterials.25:4749-4757.
- [6] [6] Takata M, Saiki M, Sumita N, Saldiva P, Pasqualucci C. (2005) *Trace element determinations in human cortical and trabecular bones.* Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.264.
- [7] [7] Gervaso F, Scalera F, Kunjalukkal S, Sannino A, Licciulli A. (2011) *High-Performance Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications*. International Journal of Applied Ceramic Technology.9:507-516.
- [8] [8] Gervaso F, Padmanabhan SK, Scalera F, Sannino A, Licciulli A. (2016) *Mechanical stability of highly porous hydroxyapatite scaffolds during different stages of in vitro studies*. Materials Letters.185:239-242.
- [9] [9] Zhang H. (2018) "Introduction to Freeze-drying and Ice Templating" in: Ice Templating and Freeze-Drying for Porous Materials and Their Applications. (Wiley-VCH) 1-27.
- [10] [10] Salvatore L, Gallo N, Aiello D, Lunetti P, Barca A, Blasi L, Madaghiele M, Bettini S, Giancane G, Hasan M, et al. (2020) An insight on type I collagen from horse tendon for the manufacture of implantable devices. Int J Biol Macromol. Jul; 154:291-306.
- [11] [11] Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. (2006) Freeze-drying of nanoparticles:Formulation, process and storage considerations. Supplementary Non-Thematic

Collection.58:1688-1713.

- [12] [12] Kramschuster A, Turng L. S. (2013) *"Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds."* Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics. (Sina Ebnesajjad), 427-446.
- [13] [13] Scalera F, Gervaso F, Palazzo B, Scialla S, Izzo D, Cancelli N, Barca A, Kunjalukkal S, Sannino A, Piconi C. (2017) Strategies to Improve Bioactivity of Hydroxyapatite Bone Scaffolds. Key Engineering Materials.758:132-137.