**UNIVERSITATEA NATIONALA DE STIINTA SI TEHNOLOGIE**

**POLITEHNICA DIN BUCURESTI**

Scoala Doctorala din cadrul Facultatii de Inginerie Chimica si Biotehnologii

# *Suprafete antibacteriene bioactive pentru regenerarea tisulara osoasa*

# *-REZUMAT-*

**Autor: Ing. Denisa-Alexandra FLOREA**

**Coordonator: Prof. Dr. Ing. Ecaterina ANDRONESCU**

***Cuvinte cheie:*** *acoperiri antibacteriene**,** Evaporare laser pulsata asistata de o matrice, hidroxiapatita, fosfat de magneziu, nanoparticule de argint, nanotehnologie*

CUPRINS

A. Prezentarea temei de cercetare: studiul datelor de literatura, metode si concepte ..... 4

I. Studiul datelor de literatura ..... 4

1. Biomateriale. Nanobiomateriale. ..... 4

2. Tesutul osos - Generalitati ..... 6

2.1. Materiale utilizate in aplicatii ortopedice ..... 8

2.1.1. Hidroxiapatita ..... 8

2.1.2. Fosfat de magneziu ..... 15

3. Abordari antibacteriene in aplicatii biomedicale ..... 17

3.1. Formarea biofilmului bacterian ..... 17

3.2. Nanotehnologia in prevenirea aparitiei biofilmului ..... 20

3.3. Nanoparticule de argint ..... 20

3.4. Nanoparticule de oxid de zinc ..... 36

3.5. Nanoparticule de aur ..... 37

3.6. Nanoparticule de cupru ..... 38

4. Modicarea suprafetelor ..... 40

4.1.Caracteristicile suprafetelor in design-ul acoperirilor antibacteriene ..... 41

4.2. Tehnici de modificare a suprafetelor ..... 42

4.2.1. Tehnica Blasting ..... 43

4.2.2. Ablatia laser ..... 43

4.2.3. Tehnici de modificare cu plasma a suprafetelor ..... 44

4.2.4. Tehnologii tip Rapid prototyping ..... 45

4.2.5. Depunerea asistata de fasciculi de ioni ..... 45

4.2.6. Modificarea chimica a suprafetelor ..... 46

4.2.7. Depunerea cu laser pulsat ..... 47

**4.2.8. Evaporarea laser pulsata asistata de o matrice ..... 48**

**5. Partea experimentala – context ..... 50**

**B. Publicatii ..... 51**

**C. Concluzii generale si contributii personale ..... 106**

**Referinte bibliografice ..... 109**

**Abstract**

In prezent, aparitia infectiilor in contextul clinic reprezinta una dintre cele mai mari provocari cu care se confrunta sistemul medical, in special din cauza rezistentei crescute la antibiotice. In anumite cazuri, aceste infectii pot pune in pericol viata pacientului sau pot duce la complicatii grave si dificil de tratat. Proiectarea si dezvoltarea unor strategii eficiente si controlate care pot combate rezistenta la antibiotice si care pot optimiza efectul terapeutic este o necesitate. Progresele in nanotehnologie au oferit posibilitatea de a crea acoperiri antibacteriene de ultima generatie. Scopul principal al unor astfel de acoperiri este de a fi multifuntionale, stabile si de a combina o varietate de efecte antibacteriene care se adreseaza si trateaza mai multi parametrii din procesul de dezvoltare al infectiilor. In ultimele decenii, acest domeniu a fost de mare interes in cercetare, astfel incat s-au dezvoltat si evaluat multiple alternative ale tratamentelor standard. Scopul acestei teze de doctorat a fost de a aborda aceasta provocare prin proiectarea, crearea si analizarea unor acoperiri nanostucturate de ultima generatie, capabile sa inhibe atasamentul bacteriilor, impreuna cu prevenirea raspandirii si cresterii acestora pe un anumit substrat, dar care, in acelasi timp, sa aiba capacitatea de a imbunatati procesul de regenerare osoasa. In procesul de dezvoltare a acestor tipuri de acoperiri, s-au utilizat tehnici moderne de fabricare, metode avansate de analiza, acestea fiind supuse testarii in-vitro si determinarii efectului antibacterian in diverse conditii.

## Introducere

Prezenta teza de doctorat a fost construita pe baza provocarilor curente intalnite in practica medicala, in mod specific in ortopedie. Lucrarea de fata este compusa din doua sectiuni care cuprind: studiul critic al datelor de literatura, pe baza carora aceasta teza a fost conceputa, impreuna cu partea experimentala care are ca scop dezvoltarea de acoperiri nanostructurate care pot depasi limitarile pe care le prezinta tratamentele utilizate in acest moment in contextul clinic.

Infectiile de plaga chirurgicala (IPC) reprezinta una dintre cele mai mari preocupari ale personalului medical, impreuna cu rezistenta crescuta la antibiotice care este un risc major pentru sistemele de sanatate la nivel global. IPC afecteaza multiple specialitati medicale, iar rezistenta crescuta la antibiotice face ca tratarea lor sa fie un proces foarte dificil.

Traumele sau tulburarile ce apar la nivelul tesutului osos sunt foarte frecvente in randul pacientilor din intreaga lume, iar cele mai multe dintre tratamentele disponibile implica necesitatea unei interventii chirurgicale. Asadar, riscul aparitiei IPC in acest context este foarte ridicat, iar dezvoltarea unor alternative eficiente este o necesitate, mai ales pentru pacientii care au nevoie de un implant sau o proteza.

Obiectivul principal in ortopedie este obtinerea unui produs care poate minimiza riscul aparitiei infectiilor si care sa directioneze raspunsul celular, astfel incat sa se obtina osteointegrarea si osteoconductia adecvate. O abordare promitatoare in aceasta directie este reprezentata de controlul interactiunilor ce au loc la nivelul suprafetei unui material.

Pentru a atinge aceste obiective, aceasta cercetare are ca scop proiectarea si dezvoltarea de acoperiri bioactive ce detin proprietati mecanice si biologice care sa reduca limitarile pe care le au tratamentele disponibile in acest moment.

Urmatoarele sectiuni din acest rezumat vor prezenta pe scurt continutul acestei teze de doctorat.

## A. Prezentarea temei de cercetare: studiul datelor de literatura, metode si concepte

### I. Studiul datelor de literatura

### 1.Biomateriale. Nanobiomateriale.

Orice biomaterial este definit ca un material proiectat pentru a fi folosit in context medical cu multiple scopuri, precum: tratarea, restabilirea sau recuperarea unei functii a unui tesut fara a genera un efect advers al gazdei. Biomaterialele pot fi clasificate ca naturale, sintetice sau compozite, iar fabricarea lor implica interactiunea mai multor discipline: chimie, biologie, ingineria materialelor, fizica sau chimie computationala [1, 2].

In acest moment, materialele metalice [3], ceramice [4], polimerice [5], biosticlele [6] si materialele compozite [7,8] sunt componentele cheie in productia de biomateriale avansate, multe dintre acestea fiind folosite in practica curenta [9, 10]. Toate aceste tipuri de materiale pot fi clasificate in functie de raspunsul declansat la contactul cu organismul gazda. Asadar, biomaterialele sunt biointerte (care induc formarea de capsula fibroasa la interactiunea cu mediul fiziologic), bioactive (care interactioneaza cu tesuturile inconjuratoare) si biodegradabile (care se degradeaza intr-un anumit interval de timp) [11, 12].

Un biomaterial ideal ar trebui sa detina caracteristicile specifice aplicatiilor pentru care este destinat. In procesul de selectie al unui biomaterial, trebuie tinut cont de anumiti factori precum: biocompatibilitate, proprietati mecanice, citotoxicitate, eliminarea de compusi in timpul procesului de degradare etc. Desi multe biomateriale au fost intens studiate de-a lungul anilor si folosite in practica medicala, nanotehnologia s-a dovedit a fi o solutie inteligenta pentru proiectarea materialelor avansate cu aplicabilitate in domeniul biomedical [1].

Nanotehnologia reprezinta una dintre directiile de cercetare care beneficiaza de atentia oamenilor de stiinta pentru a ii explora potentialul in multiple industrii. In acest moment, nanotehnologia poate fi explicata ca un domeniu interdisciplinar care combina concepte din multiple domenii (de exemplu: biologie, inginerie, fizica, chimie etc.) pentru a proiecta, caracteriza si fabrica materiale sau sisteme cu dimensiuni de 1 nm – 100 nm [1, 13].

Nanomedicina reprezinta intersectia dintre nanotehnologie si medicina si incearca sa imbunatateasca atat preventia cat si tratamentul multiplelor afectiuni prin dezvoltarea de noi

nanobiomateriale, metode de diagnostic, agenti de contrast, nanodispozitive sau nanoterapii (Figura 1) [14,15].

Un nanobiomaterial poate fi etichetat ca orice material sintetizat la nivel nanometric (1-100 nm) care are ca scop utilizarea in aplicatii biomedicale [1, 17].

In mod specific, nanobiomaterialele pot oferi benefici extra comparativ cu materialele conventionale datorita efectului dependent de dimensiune. De exemplu, un nanocompozit pe baza de colagen si fosfat de calciu imita nanostructura osului nativ, fiind mult mai eficient [18]. Investigarea nanobiomaterialelor a representat un punct de interest in ultimii ani in multe sectoare din domeniul biomedical [19 – 21].

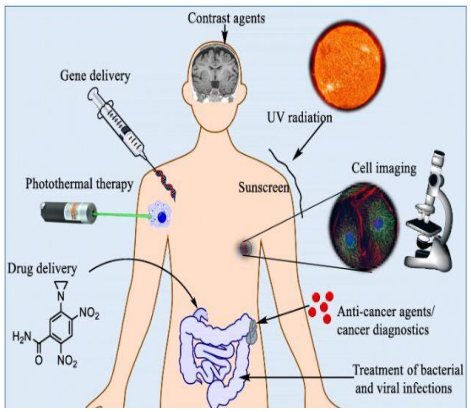


**Figura 1.** Selectie a celor mai comune aplicatii ale nanotehnologiei in medicina. Retiparit dintr-o sursa tip “Open Access” [16].

## 2. Tesutul osos – generalitati

Conform ultimelor estimari realizate in cazul fracturilor osoase, incidenta este in continua crestere, in special in cazul pacientilor care sunt afectati de boli genetice, boli care apar odata cu varsta sau boli specifice tesutului osos (de exemplu: osteoporoza, artrita etc.). In 2020, International Osteoporosis Foundation a facut o afirmatie conform careia, la fiecare 3 secunde, osteoporoza cauzeaza o fractura, insumand un total de 9 milioane de fracturi anual la nivel global. Procesul nativ de vindecare (remodelare osoasa) este remarcabil pentru ca, in urma acestuia, nu rezulta tesut cicatricial ci se produce o reconstructie totala a structurii osului natural. Totusi, rata esecului de vindecare ajunge pana la 10% la pacientii care au o abilitate restrictiva de vindecare a tesutului afectat. In acest moment, tratamentele disponibile pentru uz clinic se bazeaza pe medicatie precum biofosfonati, raloxifen sau teripartid care au ca scop reducerea riscului de fracturare, insa procesul de vindecare se realizeaza in continuare complicat si incet [22, 23].

Tesutul osos reprezinta o structura foarte dinamica formata din tesut conjunctiv mineralizat care implica actiunea a patru tipuri de celule: osteoblaste, osteoclaste, celule tip “bone lining” si osteocite. Procesul de remodelare osoasa implica activitatea sincronizata a acestor celule, bazata

pe abilitatea osteoclastelor si osteoblastelor de a resorbi si forma os nou, intr-un sincron perfect [24].

## 2.1. Materiale utilizate in aplicatii ortopedice

### 2.1.1. Hidroxiapatita

Osul este format din colagen de tip 1, faza minerala (aproximativ 65 – 70%), lipide, proteine non-colagenice si alte molecule. Arhitectura si interactiuna dintre aceste componente ofera caracteristicile acestui tip de tesut [25]. Este bine cunoscut faptul ca familia fosfatilor de calciul este o categorie de biomateriale utilizate intens in aplicatii biomedicale, in mod special in ortopedie si stomatologie [26]. O atentie sporita a fost acordata hidroxiapatitei (HAP), cu formula chimica $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, datorita faptului ca are o structura similara apatitei biologice. HAP poate fi izolata din surse naturale (oase de peste, cozi de creveti, coji de oua etc.) – cunoscuta ca si HAP naturala, dar poate fi si sintetizata din diversi precursori – HAP sintetica [27].

Au fost publicate multiple studii in ultimii ani care dovedesc potentialul hidroxiapatitei in diverse aplicatii biomedicale [28-31]. Totusi, cu beneficiile oferite de nanotehnologie, multe dintre proprietatile acesteia au fost imbunatatite, inclusiv activitatea antimicrobiana, despre care se cunoaste faptul ca este scazuta in cazul biomaterialelor ceramice. Mai mult, nanostructura acesteia ofera avantajul unei cristalinitati ridicate care permite substitutia ionica, un real beneficiu care poate extinde utilizarile sale in biomedicina [31].

### 2.1.2. Fosfat de magneziu

Chiar daca prima utilizare a aliajelor de magneziu in domeniul medical a avut loc inca de acum doua secole, potentialul materialelor pe baza de magneziu a fost intens studiat in ultimele decenii, multumita expansiunii in sfera metodelor de procesare si fabricare [32]. Pornind din acest punct, s-au realizat multiple studii pentru a investiga actiunea aliajelor de magneziu in-vitro, in special impactul acestora asupra celulelor stem mezenchimale, fibroblaste de soarece, celule derivate din oase si MG-63 osteosarcom uman. De asemenea, s-au realizat si numeroase studii in-vivo, incluzand studii pe femur de sobolan, femur de porc de guineea sau implantarea in tibie de soarece [33].

## 3. Abordari antibacteriene in biomedicina

### 3.1. Formarea biofilmului

Este bine cunoscut faptul ca bacteriile Gram-pozitive si Gram-negative sunt protagonistele in dezvoltarea IPC, cele mai multe dintre acestea fiind cauzate de stafilococi (bacterii Gram-pozitive). Principalele diferente intre aceste tipuri de bacterii sunt prezentate in Figura 2 [34, 35].

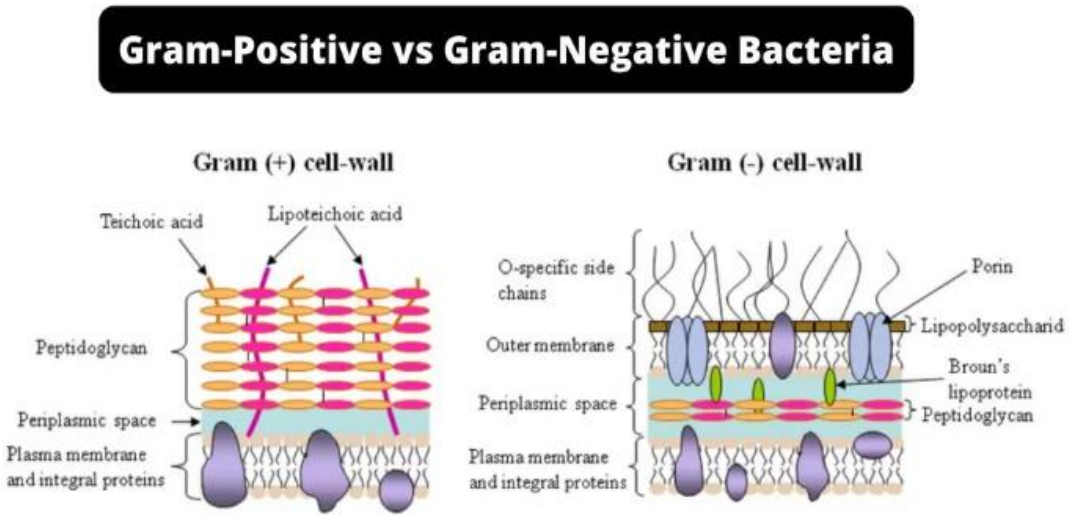


**Figura 2.** Cele mai importante diferente structurale intre cele doua tipuri de bacterii. Ilustratie preluata dintr-o sursa tip “Open access” [34].

IPC se produc de cele mai multe ori din cauza bacteriilor ce provin din instrumentarul chirurgical, de pe mainile cadrelor medicale in timpul interventiilor, de pe pielea pacientului, produse contaminate sau alte infectii locale [35].

Aparitia IPC depinde de procesul de formare al biofilmului bacterian. Acesta este un process succesiv ce are loc in mai multe etape, prima fiind adeziunea bacteriana pe o suprafata specifica (de ex. suprafata unui implant sau a unei proteze) – etapa 1. Procesul de adeziune care se produce in prima etapa este un process reversibil. Numerosi factori sunt responsabili pentru adeziunea initiala, precum: fortele London van-der-Waals, miscarea Browniana sau polaritatea conducand catre materializarea unei microcolonii. Totusi, bacteriile trebuie sa se afle in proximitatea suprafetei implantului/protezei pentru o aderenta reusita. Din acest punct, microcoloniile sunt formate prin agregare si sunt legate intr-o matrice extracelulara unde sunt transformate intr-o macrocolonie. Acesta este momentul cand procesul de adeziune devine ireversibil. Matricea

extracelulara si substantele pe care aceasta le secreta joaca un rol important in constructia arhitecturii biofilmului, reprezentand etapa 2 in procesul de formare – cresterea si maturarea biofilmului. In plus, bacteriile non-aderente ies din matrice si pot migra spre alte zone in care se reia procesul – etapa 3 – raspandirea infectiei [35].

In acest moment, este bine cunoscut faptul ca prescriptia si administrarea inconsistenta de antibiotic reprezinta una dintre cele mai mari probleme in ceea ce priveste rezistenta la antibiotice. Cateva dintre mecanismele rezistentei la antibiotice sunt descrise in literatura. Mecanismele principale sunt cunoscute ca: modificare tintita prin schimbari enzimatice, substitutie tintita, modificarea sau distrugerea antibioticului, modificare tintita prin mutatie, permeabilitate restrictiva a antibioticului etc., toate acestea avand acelasi scop: sa blocheze legarea antibioticului la tinta. Asadar, activatorii biofilmului sunt foarte greu de abordat, astfel incat necesitatea dezvoltarii unor alternative eficiente este evidenta [39].

### 3.2. Nanotehnologia in prevenirea formarii biofilmului

Dezvoltarea in domeniul nanomaterialelor a condus catre ipoteza ca ar putea fi candidatii potriviti pentru a obtine inhibarea activitatii patogene cu reactii adverse minime. O varietate de nanoparticule au fost sintetizate prin diverse metode pentru a depasi provocarile aduse de metodele conventionale de tratament. Nanoparticule precum cele de cupru, gold, magneziu si argint au demonstat rezultate promitatoare in inhibarea bacteriana, atat separat cat si in diverse combinatii [40].

### 3.3. Nanoparticule de argint

Eficienta antibacteriana a sarurilor de argint este extrem de cunoscuta inca din antichitate, aceasta proprietate fiind explorata in numeroase industrii inca de atunci [41, 42]. Acest efect se bazeaza strict pe caracteristicile fizico-chimice precum suprafata, forma sau dimensiune. Cercetarile au sugerat ca particulele din regimul nanometric induc apoptoza prin faptul ca imbunatatesc permeabilitatea ionilor de argint in specimenele microbiene [43].

### 3.4. Nanoparticule de oxid de zinc

Oxidul de zinc poate fi catalogat ca si multifunctional drept rezultat al proprietatilor chimice si fizice pe care le prezinta. Poate fi definit ca un semiconductor (grupa II-IV) cu stabilitate chimica, mecanica si termica superioara, cu o gama larga de absorbtie a radiatiilor care au condus la utilizarea lui in diverse industrii precum: electronica, tehnologia laserelor, senzori (multumita proprietatilor piezoelectrice), generarea de energie etc. Multumita biocompatibilitatii, absorbtiei mari de UV, ratei bune de degradabilitate si a toxicitatii reduse, interesul utilizarii acestuia in cosmetica sau aplicatii biomedicale a crescut considerabil in ultimii ani [44]. S-a dovedit ca oxidul de zinc nanostructurat detine proprietati superioare comparativ cu materialul conventional datorita morfologiei si dimensiunii particulelor. Totusi, performanta nanoparticulelor de zinc in mediul biologic depinde de chimia suprafetei, morfologia particulei, dimensiune si reactivitatea in solutie. Asadar, metoda de sinteza aleasa pentru realizarea nanostructurilor de oxid de zinc, trebuie sa permite obtinerea de morfologii si dimensiuni specifice [45].

### 3.5. Nanoparticule de aur

De obicei, nanoparticulele de aur cu diametre foarte mici (maxim sute de nm) sunt stabilizate in solventi organici sau solutie apoasa. In mod normal, reductia $AuCl_3$ trebuie realizata cu o substanta care poate induce nucleatia ionilor de aur in nanoparticule. In plus, se utilizeaza un surfactant cu rol de agent stabilizator. Surfactantul este legat chimic de suprafata nanoparticulelor inducand stabilitatea coloidala. Recent, structurile pe baza de aur si proprietatile lor remarcabile au condus la abordari noi cu un potential ridicat in biomedicina si aplicatii clinice [46, 47].

In ceea ce priveste aplicatiile biomedicale, nanoparticulele de aur sunt o alegere excelenta pentru o varietate de aplicatii, datorita biocompatibilitatii, a stabilitatii chimice ridicate si a usurintei bioconjugarii cu multiple tipuri de molecule. Mai mult, disponibilitatea multitudinii metodelor de sinteza reprezinta un alt mare avantaj. Acestea pot fi obtinute atat prin tehnici de tip “bottom-up”, cat si “top-down”. In categoria “bottom-up” se regasesc tehnici precum reductia chimica sau termica, in timp ce din categoria “top-down” fac parte metode ca si litografia cu fascicul de electroni sau fotolitografia. Metoda reductiei implica obtinerea structurii atomice dorite prin procesul de reductie ionica, in timp ce litografia se refera la indepartarea materiei din materia prima in vederea obtinerii unei structuri la nivel nanometric. Chiar daca ambele abordari sunt potrivite pentru a obtine formele sau structurile necesare, ele prezinta cateva limitari. De exemplu,

tehnicile de tip “bottom-up” pot conduce catre o monodispersie slaba, in timp ce metodele “top-down” pot duce la o pierdere excesiva de material. Totusi, ultimele inovatii in domeniu au condus la dezvoltarea de sinteze “verzi” ce utilizeaza biomolecule, microorganisme sau constituenti pe baza de plante [48].

### 3.6. Nanoparticule de cupru

Nanoparticulele de cupru au multiple aplicatii in numeroase industrii, incluzand optica, medicina, conductori, lubrifianti, stomatologie, cosmetica, nanofluide etc. In plus, este bine cunoscut faptul ca sarurile de cupru sunt o alegere potrivita pentru productia de dezinfectanti multumita proprietatilor antibacteriene si antibiocide. Studiile au sugerat ca performanta antibacteriana este imbunatatita la nivel nanometric comparativ cu sarurile clasice de cupru datorita structurii cristalografice [49-51].

## 4. Modificarea suprafetelor

Prima interactiune intre orice biomaterial si organismul gazda are loc la nivelul suprafetei. Caracteristicile suprafetei precum morfologia, elasticitatea, incarcarea, topografia sau umectarea sunt parametrii fundamentali in momentul in care fluidele biologice iau contact cu un dispozitiv strain. In mod specific, diferentierea celulara a celulelor stem poate fi indusa si controlata de catre morfologia si topografia suprafetei, in timp ce adeziunea celulara este mai puternica in cazul suprafetelor hidrofile [52].

Modificarea suprafetelor este una din cele mai comune si complexe strategii de a depasi multiple probleme precum integrarea slaba, respingerea implantului, infectiile etc. De-a lungul timpului au fost elaborate mai multe tactici de modificare a suprafetelor ce pot fi clasificate in active si pasive. Modificarile pasive se refera la obtinerea caracterului antibacterian al suprafetei prin customizarea caracteristicilor fizico-chimice precum: topografie, umectare, chimia suprafetei etc. [53]. In acelasi timp, una dintre cele mai populare abordari active, utilizata in prezent in practica medicala, se refera la acoperirile cu elibarare de antibiotic. Conceptul este de a imbobiliza antibioticul pe un substrat cu o rata de degradare controlata sau sa se integreze substanta intr-o acoperire care actioneaza ca un rezervor. In ambele situatii, eliberarea de antibiotic trebuie sa fie controlata si sa aiba loc intr-un interval specific de timp [53]. Avantajele acestor metode sunt reprezentate de mecanismul prin care are loc eliberarea, deoarece ofera posibilitatea de a livra

cantitati mari de substante active, local. Mecanismele pe care se bazeaza aceste strategii sunt hidroliza, biodegradarea sau difuzia. Totusi, exista cateva limitari precum acumularea de proteine, care poate conduce la o eliberare insuficienta de substanta activa sau la o capacitate inadecvata a rezervorului. O alternativa a acestor tipuri de suprafete sunt cele de tip “contact-killing”. Principiul se bazeaza pe imobilizarea de molecule anti-aderente pe suprafata prin legaturi covalente care sa respinga atasamentul bacteriilor [52].

### 4.1. Caracteristicile suprafetelor in designul acoperirilor antibacteriene

Interactiunile care au loc in stadiile incipiente de contract se datoreaza fortelor electrostatice care ghideaza atasamentul celular si bacterian. Conform masuratorilor potentialului zeta, cele mai multe dintre speciile bacteriene sunt incarcate negativ. Prin urmare, ele se ataseaza puternic si rapid de suprafetele incarcate pozitiv. In timpul stadiilor initiale de adeziune, bacteriile intalnesc repulsii pe o raza scurta de actiune, venite de la suprafetele incarcate negativ [54].

Unul dintre parametrii care influenteaza energia suprafetei si poate inhiba atasamentul bacterian e reprezentat de nanotopografie. La acest nivel, topografia poate modifica proprietatile chimice si fizice ale suprafetei, incluzand energia acesteia. A fost demonstrat de-a lungul timpului ca parametrii precum rugozitatea, chimia sau geometria pot influenta atasamentul bacterian. Recent, cercetatorii si-au concentrate atentia si resursele pentru proiectarea de topografii care pot distruge bacteriile sau inhiba atasamentul acestora [55, 56].

Umectarea suprafetei poate influenta multiple procese in ceea ce priveste aparitia infectiilor, incluzand adeziunea, frictiunea, adsorbtia sau lubrifierea. O suprafata clasificata ca avand o umectare medie poate provoca atasamentul bacteriilor din cauza interactiunilor hidrofobe [55].

### 4.2. Tehnici de modificare a suprafetelor

#### 4.2.1. Evaporare laser pulsata asistata de o matrice (MAPLE)

O metoda avansata si promitatoare de modificare a suprafetelor, care a atras atentia cercetatorilor in ultimele decenii este Evaporarea laser pulsata asistata de o matrice, cunoscuta ca si MAPLE [57].

Un beneficiu major al aceste tehnici versatile este posibilitatea de a construi structuri multi-strat prin comparatie cu alte tehnici conventionale. Inca din 1990, tehnica MAPLE a fost folosita in realizarea unui spectru larg de structuri cu diferite materiale si compusi, incluzand filme subtiri compuse din proteine, polimeri, bacterii, celule vii, straturi nanostructurate etc. Principiul de baza al acestei metode este ca ofera posibilitatea unui transfer de molecule foarte bland. Materialul este convertit intr-o tinta inghetata prin dilutia intr-un solvent cu care nu interactioneaza, urmand inghetarea cu azot lichid. Tinta nou obtinuta este expusa unui fascicul laser pulsat, etapa in care conversia in energie termica are loc. Solventul este vaporizat si este evacuat prin sistemul integrat in echipament. Practic, cand fasciculul laser loveste tinta, au loc doua procese: evaporarea tintei inghetata si colectarea materialului eliberat pe substrat – formarea de film subtire [57, 58]. O reprezentare schematica a acestei tehnici este prezentata in Figura 3.

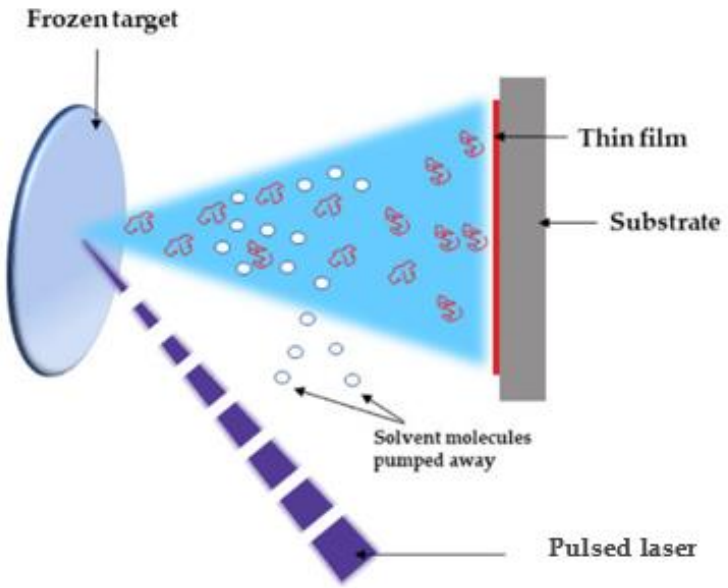


**Figura 3.** Reprezentarea schematica a tehnicii de depunere MAPLE. Retiparit dintr-o sursa de tip “open access” [59].

Tinand cont de faptul ca aceasta tehnologie poate manevra nanostructuri in mod extrem de delicat si precis si permite depunerea de filme subtiri biomimetice, aceasta tehnica a fost intens studiata in ultimii ani, in contextul modificarii suprafetelor pentru aplicatii biomedicale. In ultima vreme, multiple strategii au fost investigate pentru obtinerea de suprafete antibacteriene. De exemplu, obtinerea prin tehnica MAPLE de nanofilme pe baza de magnetita si $SiO_2$ care au fost

functionalizate cu eugenol s-a dovedit a fi eficienta, nanofilmele obtinute fiind un potential candidat in dezvoltarea de filme subtiri antibacteriene. Eficienta depunerii a fost dovedita prin caracterizarea fizico-chimica a probelor, iar performanta antibacteriana a fost confirmata prin studii in-vitro. O alta abordare a fost reprezentata de sintetizarea de microsfere pe baza la PLGA (acid poli lactic-co-glicolic) in care s-au incorporat nanoparticule de magnetita functionalizate cu lincomicina. Acestea au fost depuse cu succes prin tehnica MAPLE, iar resultate obtinute au demonstrat eficienta filmelor subtiri impotriva bacteriei *Staphylococcus aureus* [60].

## 5. Partea experimentala – contextul de cercetare

Potentialul nanotehnologiei in domeniul biomedical este intens studiat de cateva decenii. Mutiple tipuri de nanostructuri s-au dovedit a fi alternativele potrivite pentru a limita aparitia infectiei si sa depaseasca provocarile curente in ceea ce priveste rezistenta la antibiotice. Considerand aspectele prezentate in sectiunile anterioare ale acestui rezumat, se poate conluziona ca nanoparticulele de argint (AgNPs) sunt una dintre cele mai populare alegeri cand vine vorba despre aplicatii antibacteriene multumita proprietatilor pe care acestea le prezinta.

Standardul in ortopedie este reprezentat de obtinerea unui produs care poate minimiza riscul aparitiei infectiilor si care sa promoveze osteoinductia si osteointegrarea implantului. O abordare promitatoare in aceasta directie este reprezentata de controlul interactiunilor la nivelul suprafetei. Pentru a atinge aceste obiective, partea experimentala a acestei teze a avut ca scop proiectarea si dezvoltarea de filme subtiri (acoperiri) bioactive care sa detina proprietatile mecanice si biologice necesare pentru o performanta sporita, dar si sa induca un efect antibacterian.

Pe scurt, s-au urmat doua directii de cerecetare, ambele fiind bazate pe aceeasi tehnica de depunere a filmelor subtiri – MAPLE. Primul studiu este reprezentat de realizarea de filme subtiri pe baza de fosfat de magneziu ($Mg_3(PO_4)_2$) si AgNPs. S-au ales aceste materiale cu scopul de a imbunatati activitatea antibacteriana prin aditia AgNPs, in timp ce este stimulata regenerarea osoasa prin utilizarea $Mg_3(PO_4)_2$. In ceea ce priveste metoda de sinteza, AgNPs au fost obtinute prin reductie chimica, in timp ce $Mg_3(PO_4)_2$ s-a obtinut prin reactie in baie de gheata. Ambele metode de sinteza s-au dovedit a fi eficiente. Depunerea pe substrat s-a realizat prin tehnica MAPLE care a permis o depunere uniforma, omogena, cu dimensiuni controlate.

Caracterizarea fizico-chimica a nanoparticulelor de argint s-a relizat prin multiple tehnici: Difractie de raze X (XRD), Microscopie electronica prin transmisie (TEM) si prin Difractie de electroni pe arie selectata (SAED), acestea confirmand sintetizarea cu succes a AgNPs (Figura 4). In mod similar s-a procedat si in cazul $Mg_3(PO_4)_2$ (Figura 5). Rezultatele obtinute au indicat o sinteza de success in ambele cazuri.

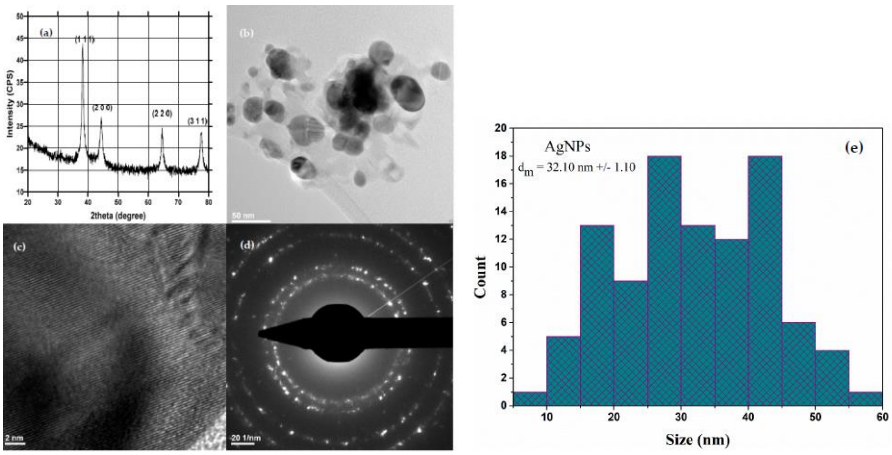


**Figura 4.** Spectrul XRD (a), Micrografii TEM si HR-TEM (b,c), Spectrul SAED (d) distributia de dimensiuni (e) obtinute pentru AgNPs.

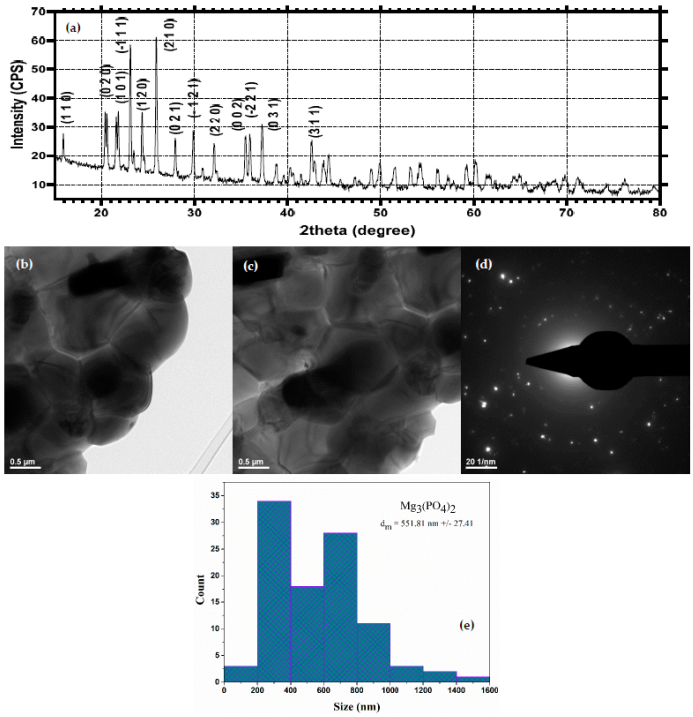


**Figura 5.** Spectrul XRD (a), Micrografii TEM si HR-TEM (b,c), Spectrul SAED (d) distributia de dimensiuni (e) obtinute pentru $Mg_3(PO_4)_2$.

Evaluarea filmelor subtiri AgNPs/$Mg_3(PO_4)_2$ s-a realizat prin microscopie in infrarosu, cu ajutorul spectrelor si hartilor ce s-au obtinut la diferite fluente ale laserului (Figura 6 si 6'). In urma datelor obtinute, s-a putut concluziona ca fluenta optima care nu afecteaza integritatea gruparilor functionale sau structura chimica a filmelor subtiri este la 300 mJ/cm$^2$.

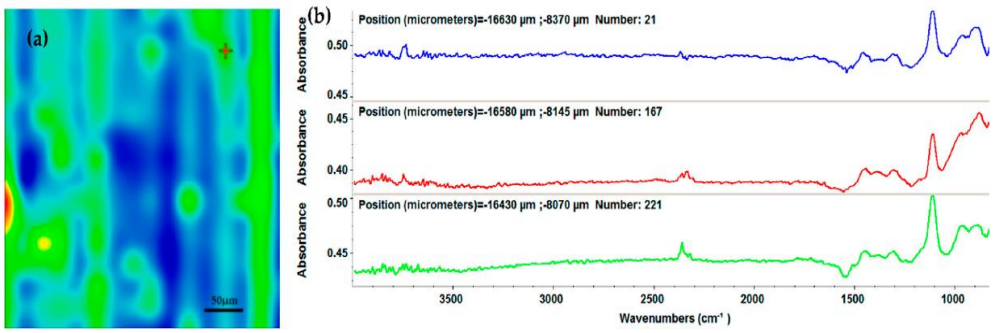


**Figura 6.** Harta IR (**a**) si spectrul FT-IR (**b**) pentru AgNPs/$Mg_3(PO_4)_2$ drop-cast (control).

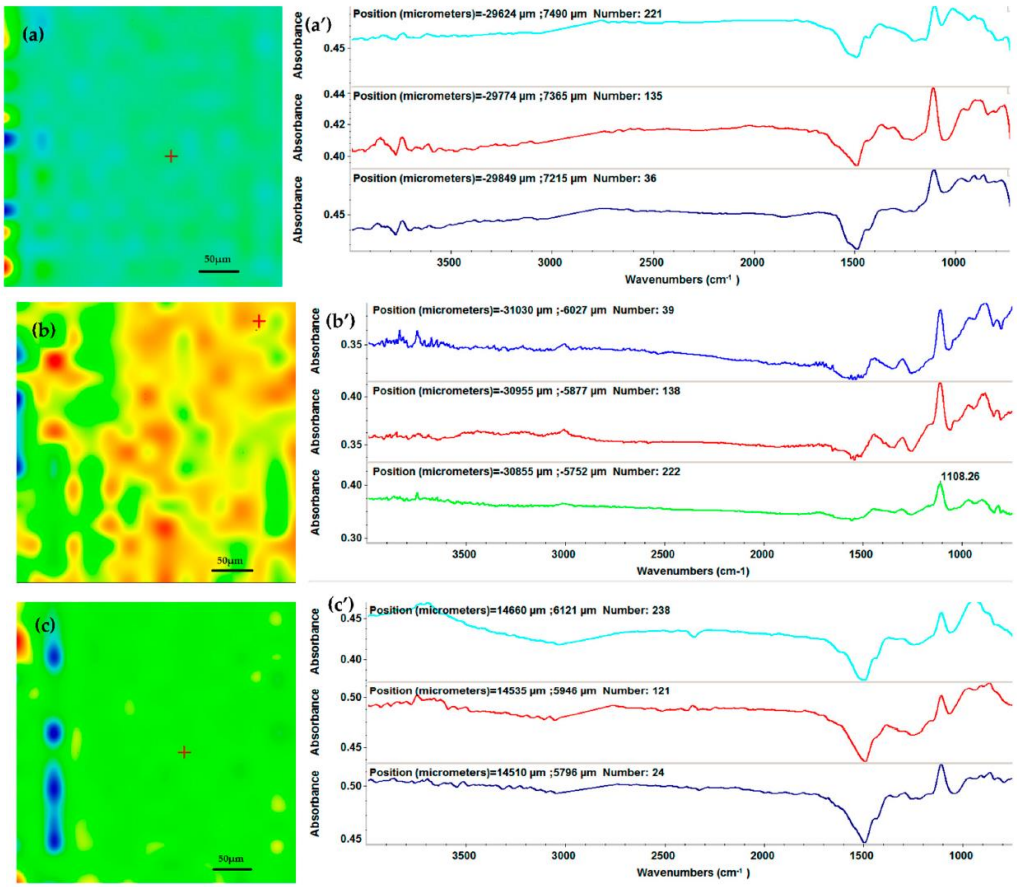


**Figure 6'.** Harta IR (**a**) si spectrul FT-IR (**b**) pentru AgNPs/$Mg_3(PO_4)_2$ la fluenta de 200 mJ/cm$^2$ (a,a'), 300 mJ/cm$^2$ (b,b'), and 400 mJ/cm$^2$ (c,c').

Depunerea uniforma a filmelor subtiri pe substrat a fost evaluata prin microscopie electronica de baleiaj (SEM), iar imaginile obtinute sunt prezentate in Figura 7. Imaginile in

sectiune confirma prezenta aglomerarilor de particule cu o dimensiune de variaza intre 55 nm si 300 nm.

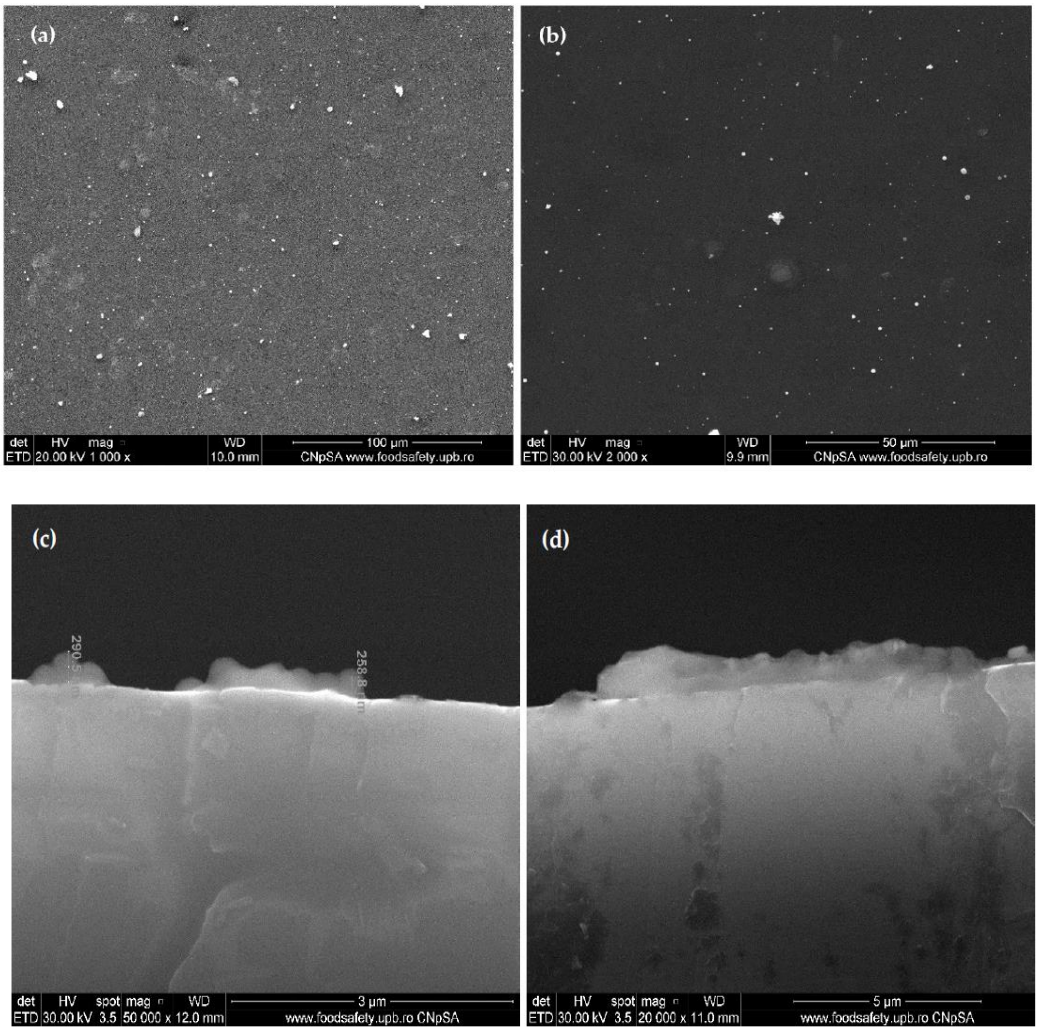


**Figura 7.** Imagine SEM de ansamblu (a,b) si in sectiune (c,d) obtinute pentru filmele subtiri AgNPs/$Mg_3(PO_4)_2$.

Evaluarea in vitro s-a realizat prin utilizarea de celule osteoblaste de tip MC3T3-E1 in contact cu probele obtinute. Citoscheletul a fost investigat prin microscopie de fluorescenta, iar conform rezultatelor obtinute se poate concluziona faptul ca morfologia si confluenta osteoblastelor prezinta filamente de actina organizate, cu o arhitectura sanatoasa, dovedind eficienta filmelor subtiri (Figura 8).

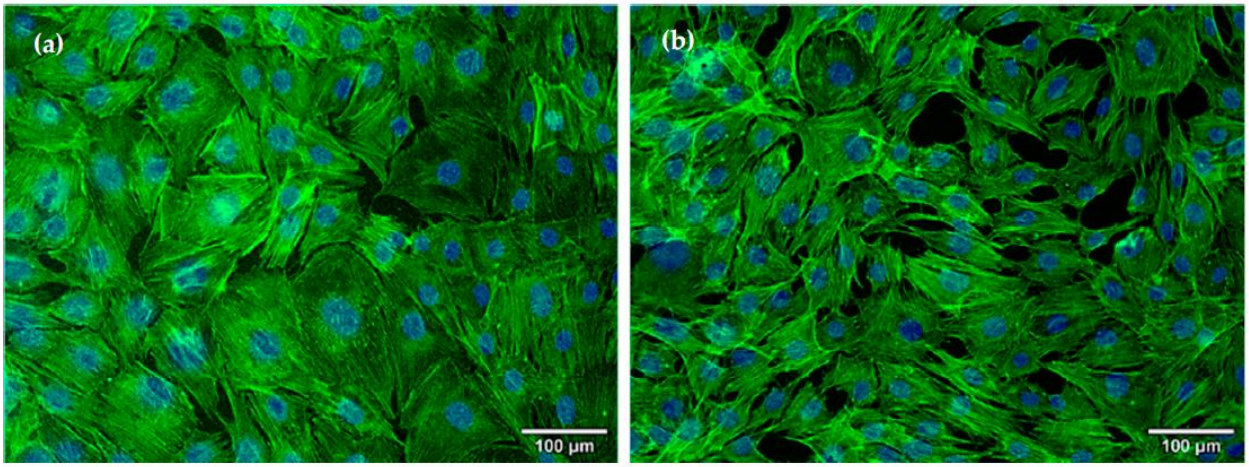


**Figura 8.** Imagini de microscopie de fluorescenta pentru filamentele de actina (verde) si nucleu (albastru) pentru osteoblaste MC3T3-E1 la 24 de ore de la incubare pe control (a) si pe filmele subtiri AgNPs/$Mg_3(PO_4)_2$ (b).

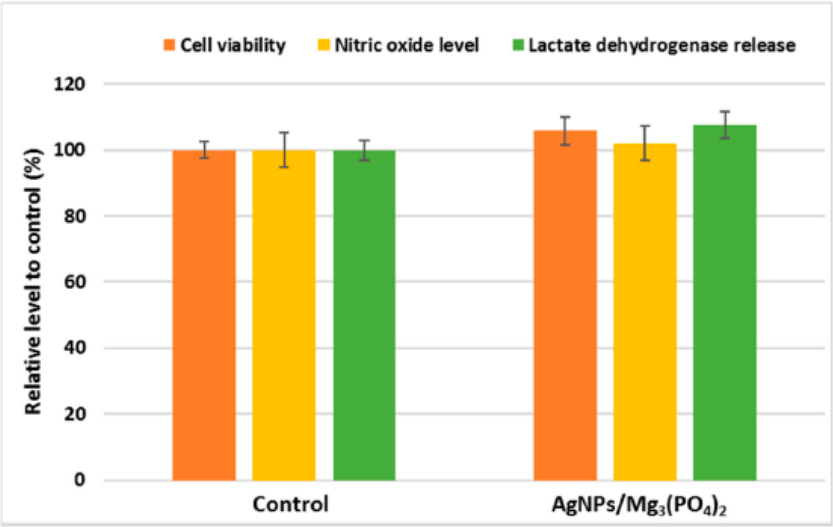


**Figura 9.** Viabilitatea celulara, nivelul de oxid nitric si eliberarea de LDH la 24 de ore de la cultivarea celulelor MC3T3-E1 osteoblaste pe control si pe filmele subtiri AgNPs/ $Mg_3(PO_4)_2$.

Testul MTT s-a utilizat in determinarea viabilitatii celulare a celulelor cultivate pe suprafetele obtinute. Rezultatele au sugerat o rata de supravietuire mare in cazul filmelor subtiri, comparativ cu probele de control, nivelul fiind cu 5% mai mare. Mai mult, nu s-au observat

schimbari in ceea ce priveste nivelul de oxid nitric si eliberarea LDH in cazul filmelor subtiri (Figura 9).

Perfomanta antibacteriana s-a investigat utilizand bacteriile *S. aureus* si *P. aeruginosa* care au fost incubate in prezenta probelor timp de 48h. Masuratorile s-au inregistrat la doua momente diferite de timp: 24h, respectiv 48h de la incubare. Rezultatele au indicat o inhibare notabila a activitatii bacteriene in cazul filmelor subtiri, prin comparatie cu substraturile de control (Figura 10).

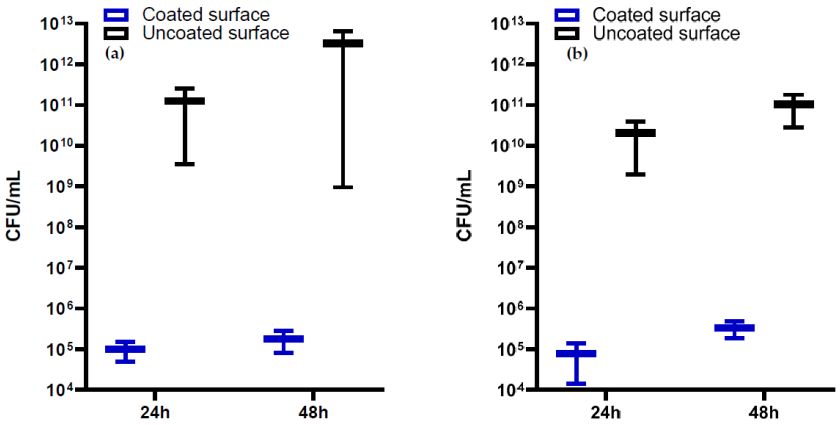


**Figura 10.** Eficienta bacteriana a filmelor subtiri AgNPs/$Mg_3(PO_4)_2$ in prezenta *S. aureus* (a) and *P. aeruginosa* (b) la 24h si 48h.

In concluzie, prezentul studiu a avut ca scop dezvoltarea de filme subtiri biocompatibile si antibacteriene cu aplicabilitate in ortopedie. Filmele obtinute au fost compuse din AgNPs si $Mg_3(PO_4)_2$ ce s-au obtinut prin rute de sinteza bine cunoscute, fiind apoi depuse in combinatie prin tehnica MAPLE. S-a demonstrat eficienta filmelor subtiri in ceea ce priveste cresterea viabilititatii si proliferarii celulelor osteoblaste, exercitand in acelasi timp un efect antibacterian impotriva a doua dintre cele mai comune bacterii responsabile pentru infectiile de plaga chirurgicala: *S. aureus* si *P. aeruginosa.* In mod specific, potentialul acestor materiale sta in efectul sinergic al fosfatului de magneziu care asigura o renegerare osoara sporita si o integrare rapida a implantului, in timp ce nanoparticulele de argint ofera caracterul antibacterian.

Pe de alta parte, cel de-al doilea studiu ce constituie partea experimentala a acestei teze de doctorat a fost reprezentat de proiectarea si dezvoltarea de filme subtiri pe baza pe hidroxiapatita – HAP, $Mg_3(PO_4)_2$, si factor de crestere BMP4 (proteina morfogenetica osoasa), fiind ulterior nebulizate cu antibiotic de tip ceftriaxona (CXF) pentru prevenirea infectiilor. Caracterizarea

fizico-chimica a probelor s-a realizat prin XRD, SEM, TEM, SAED si IR (Figura 11). Rezultatele obtinute au confirmat succesul rutelor de sinteza.

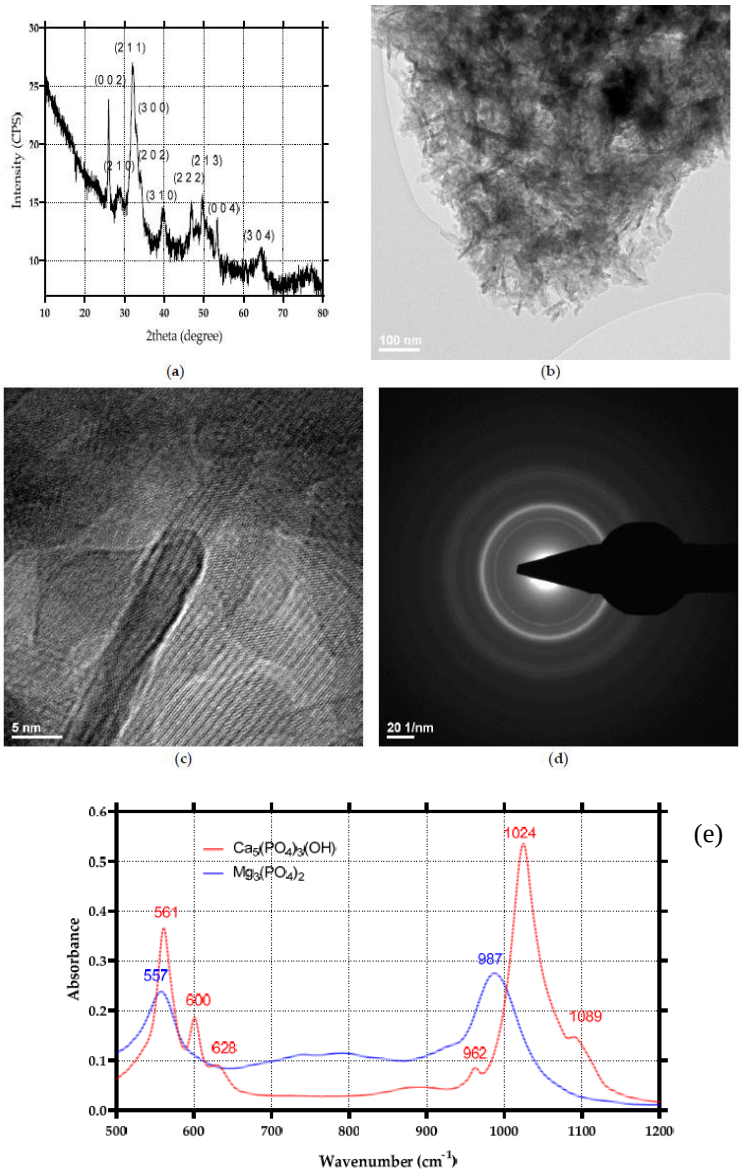


**Figura 11.** Spectrul XRD (a), Imagini TEM (b), HR-TEM (c), spectrul SAED (d) pentru nanopulberile HAP si spectrul IR pentru nanopulberile HAP si $Mg_3(PO_4)_2$ (e).

Integritatea filmelor subtiri depusa prin tehnica MAPLE s-a investigat prin IR, in vederea determinarii statusului gruparilor functionale. Intr-o maniera asemanatoare ca cea din studiul precedent, s-au obtinut harti si spectre IR pentru probele depuse la trei fluente laser. Conform rezultatelor obtinute, s-a concluzionat ca probele depuse la o fluenta a laserului de 400 mJ/cm$^2$ nu au suferit modificari structurale, fiind alese in continuarea expirementului pentru nebulizarea cu CXF.

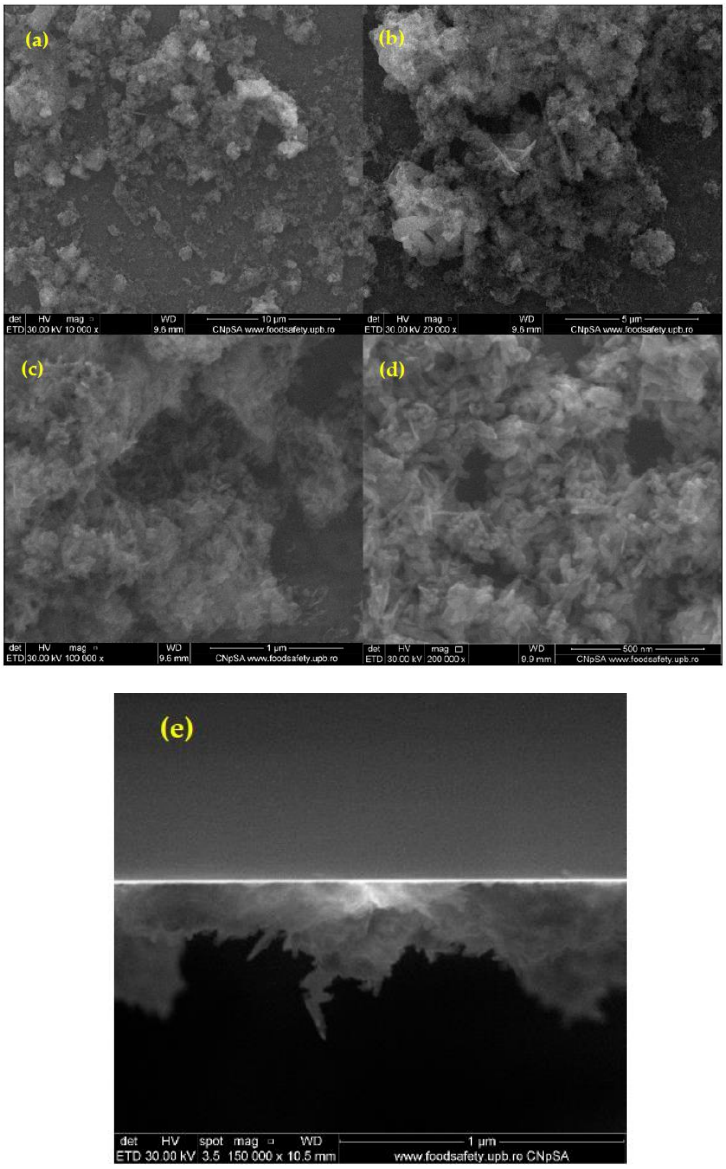


**Figura 12.** Imagini SEM de ansamblu, la diferite magnificatii (a—10,000x, b—20,000x, c—100,000x, d—200,000x) si in sectiune (e) pentru filmele subtiri HA/ $Mg_3(PO_4)_2$ /BMP4.

Mai mult, probele au fost supuse analizei SEM pentru a evalua morfologia suprafetei. In acest context, imaginile obtinute dezvaluie atat prezenta HAP, cat si a $Mg_3(PO_4)_2$ pe substrat, sub forma de aglomerari, cu o grosime a filmului subtire care variaza intre 200 nm – 500 nm (Figura 12).

Ulterior, testarea in vitro a presupus determinarea citocompatibilitatii si evaluarea activitatii antibacteriene. In Figura 13, imaginile de microscopie prezinta celulele de pe suprafata filmelor subtiri, marcate cu faloidin-FITC. Se poate deduce ca filmele subtiri nu au provocat schimbari morfologice pentru celulele osteoblaste MC3TE-E1, care prezinta forme normale si un aspect sanatos. De asemenea, se pot remarca arhitectura specifica osteoblastelor si confluenta ridicata, celulele avand nucleu centrat si filamente de actina elongate.

In plus, testul MTT s-a efectuat in vederea determinarii efectului aditiei factorului de crestere, impreuna cu viabilitatea celulara (Figura 14). S-a demonstrat ca aditia factorului de crestere a facilitat atasamentul si proliferarea celulara, mentinand o proliferare normala a osteoblastelor. Nivelele de oxid nitric si LDH indica lipsa citotoxicitatii. Mai mult, din Figura 15 se poate concluziona ca antibioticul utilizat este eficient in distrugerea bacteriilor atasate pe suprafata implantului, dovedindu-se astfel si caracterul antibacterian al probelor.

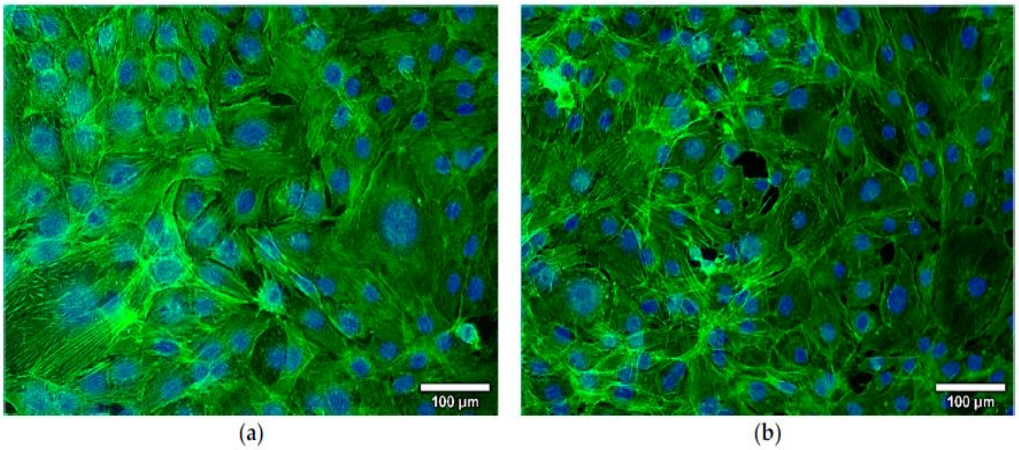


**Figura 13.** Imagini de microscopie a filamentelor de actina ale celulelor osteoblaste MC3T3-E1, la 24 de ore de la incubare pe substratul de control (a) si pe filmele subtiri HAP/ $Mg_3(PO_4)_2$/BMP4 (b).

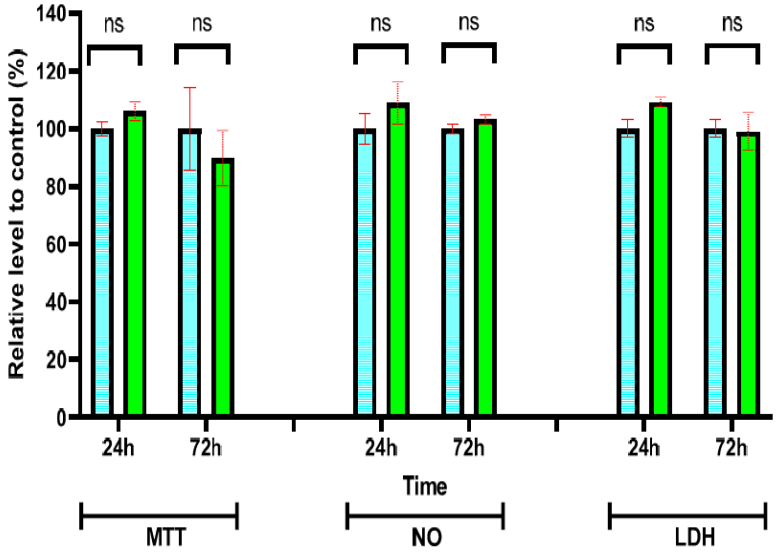


**Figura 14.** Viabilitatea celulara, nivelul de oxid nitric si eliberarea LDH la 24h si 72h de la incubare in prezenta filmelor subtiri HAP/ $Mg_3(PO_4)_2$/BMP4.

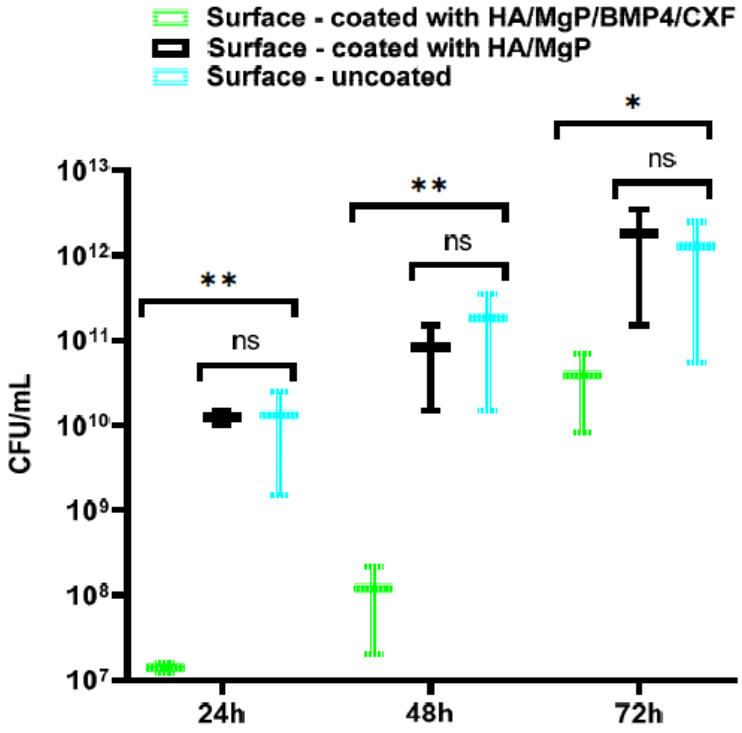


**Figura 15.** Eficienta antibiofilm a suprafetelor acoperite/neacoperite cu film subtire in prezenta *S. aureus* la 24h, 48h si 72h de la incubare.

In concluzie, scopul acestui studiu a fost de a combina avantajele celor doua biomateriale ceramice cu beneficii bine cunoscute in aplicatiile ortopedice, respectiv HAP si $Mg_3(PO_4)_2$ cu cele ale factorului de crestere BMP4 si cu un antibiotic cu spectru larg (ceftriaxona) in vederea dezvoltarii acoperirilor multifunctionale care sa stimuleze regenerarea osoasa si sa induca un efect antibacterian. S-a dovedit obtinerea cu succes a pulberilor si o depunere optima prin tehnica MAPLE la o fluenta de 400 $mJ/cm^2$. Potentialul unui asemenea sistem a fost dovedit in urma analizelor efectuate, fiind o alternativa la solutiile conventionale de tratament multumita caracterului antibacterian si a caracteristicilor celulare pe care acesta le prezinta.

**Concluzii**

Aceasta teza de doctorat se bazeaza pe studiul datelor de literatura, date ce descriu progresul realizat in ortopedie, in vederea obtinerii unor tratamente ce pot invinge provocarile variantelor care sunt utilizate in practica clinica in acest moment.

In prezent, utilizarea biomaterialelor pentru proiectarea unor alternative biomimetice ce pot folosi capacitatea organismului uman de a se auto-regenera reprezinta un punct cheie in cercetare.

Datele de literatura care stau la baza acestei teze au fost descrise in doua publicatii de tip studiu de caz ("review paper") ce cuprind urmatoarele doua subiecte: nanoparticule de hidroxiapatita si cum influenteaza acestea activitatea celulara si tehnici de modificare a suprafetelor utilizate cu precadere pentru aplicatii in ortopedie.

**Publicatii care sustin studiul datelor de literatura ce stau la baza acestei teze de doctorat:**

1. **PUBLICATIA I –** *Factor de impact 2022: 4.778:* Florea, Denisa Alexandra, *et al.*, "Surface modification – A step forward to overcome the current challenges in ortopedic industry and to obtain an improved osseointegration and antimicrobial properties: ***Materials Chemistry and Physics 243*** (2022): 122579.
2. **PUBLICATIA II –** *Factor de impact 2021: 2.838:* Florea, Denisa Alexandra, Cristina Chircov, and Alexandru Mihai Grumezescu: "Hidroxyapatite particles – directing the cellular activity in bone regeneration processes: an up-to-date review." ***Applied Sciences*** *10.10 (2020): 3483.*

Pornind de la aceste date, scopul partii experimentale a fost reprezentat de dezvoltarea de filme subtiri nanostructurate ce sunt capable sa inhibe atasamentul, cresterea si migrarea celulelor bacteriene pe un substrat, dar si sa induca procesul de regenerare osoasa. In acest proiect, au fost utilizate tehnici avansate de proiectare si depunere ale filmelor subtiri, ce permit un control strict al parametrilor pentru a obtine o performanta ridicata. De exemplu, toate filmele subtiri obtinute s-au depus pe substraturi utilizand tehnica MAPLE ce a permis atat obtinerea unui design specific, cat si controlarea parametrilor precum: rugozitate sau grosime.

In primul studiu (Publicatia III) s-au realizat filme subtiri pe baza de fosfat de magneziu si nanoparticule de argint care sa prezinte un caracter antibacterian si sa accelereze proliferarea osteoblastelor, implicit si regenerarea osoasa. Fosfatul de magneziu s-a obtinut prin reactie in baie de gheata, in timp ce nanoparticulele de argint au fost sintetizate prin reductie chimica, urmand protocoalele descrise in Publicatia III – sectiunea: "*Materials and methods*". Probele obtinute au fost supuse caracterizarii fizico-chimice, utilizand tehnici descrise in sectiunea '*Characterization methods'*. Evaluarea biologica s-a realizat pentru a determina biocompatibilitatea filmelor subtiri, iar activitatea antibacteriana s-a determinat impotriva bacteriilor de tip *S. aureus* si *P. aeruginosa*, fiind printre bacteriile cele mai comune in aparitia infectiilor de plaga chirurgicala. Eficienta depunerii prin tehnica MAPLE s-a investigat prin spectre si harti IR, dovedind ca integritatea gruparilor functionale a fost optima la o fluenta laser de 300 $mJ/cm^2$.

Concluziile obtinute in urma acestui studiu, au subliniat eficienta acestui tip de filme subtiri, fiind capabile sa exercite atat o actiune antibacteriana, multumita nanoparticulelor de argint, cat si sa promoveze regenerarea osoasa si integrarea implantului, datorita fosfatului de magneziu.

Cel de-al doilea studiu (Publicatia IV) a avut ca scop fabricarea de filme subtiri pe baza de hidroxiapatita si fosfat de magneziu, functionalizate cu factor de crestere BMP4 si nebulizate cu ceftriaxona. Pentru depunere s-a utilizat in continuare tehnica MAPLE, iar probele au fost supuse caracterizarii fizico-chimice urmand o parte din protocoalele din studiul precedent. Eficienta antibioticului s-a investigat in contact cu *S. aureus*, iar efectul citotoxic s-a determinat pe linia de celule osteoblaste MC3T3-E1.

Beneficiile utilizarii a doua tipuri de materiale bioceramice, impreuna cu factori de crestere si antibiotic, precum si eficienta tehnicii de depunere s-au demonstrat atat in ceea ce priveste efectul antibacterian, cat si biocompatibilitatea. Inhibarea bacteriana s-a dovedit ridicata in primele

48h de la incubare, in timp ce biocompatibilitatea s-a determinat prin morfologia celulelor, filamentele de actina si viabilitatea celulara sporita.

Rezultatele obtinute in partea experimentala a acestei teze pot fi considerate parte din fundatia dezvoltarii de filme subtiri antibacteriene. Asemenea strategii pot fi un candidat potrivit pentru a preveni infectiile de plaga chirurgicala si a imbunatati procesul de regenerare osoasa.

**Publicatii ce stau la baza partii experiementale din aceasta teza de doctorat:**

1. **PUBLICATIA III –** *Factor de impact: 6.208 (2021):* Florea, Denisa Alexandra, *et al.*, "Design, characterization and antibacterial performance of MAPLE-Deposited coatings of magnesium phosphate-containing silver nanoparticles in biocompatible concentrations." ***International Journal of Molecular Sciences*** *23.14 (2022): 7910.*
2. **PUBLICATIA IV –** *Factor de impact: 3.748 (2021):* Florea, Denisa Alexandra, *et al.*, "Bioactive hydroxyapatite-magnesium phosphate coatings deposited by MAPLE for preventing infection and promoting orthopedic implants osteointegration." ***Materials*** *15.20 (2022): 7337.*

*Factor de impact cumulativ: 17.572*

**Referinte bibliografice**


1. Kumarage, V., et al., *Nanotechnology Applications in Biomaterials; A review.* 2022.
2. Eliaz, N.J.M., *Corrosion of metallic biomaterials: A review.* 2019. 12(3): p. 407.
3. Pandey, A., A. Awasthi, and K.K. Saxena, *Metallic implants with properties and latest production techniques: a review.* Advances in Materials and Processing Technologies, 2020. 6(2): p. 405-440.
4. Punj, S., J. Singh, and K.J.C.I. Singh, *Ceramic biomaterials: Properties, state of the art and future prospectives.* 2021. 47(20): p. 28059-28074.
5. Xia, D., et al., *Emerging polymeric biomaterials and manufacturing techniques in regenerative medicine.* 2022: p. e176.
6. Singh, S., et al., *Bioglass: A New Era in Modern Dentistry.* 2022. 11(01): p. 001-006.
7. Abdullah, A.M., et al., *Mechanical and morphological properties of carbon fibre and its composite for biomaterials' application.* 2022: p. 1-10.
8. Peranidze, K., T.V. Safronova, and N.R.J.P. Kildeeva, *Fibrous polymer-based composites obtained by electrospinning for bone tissue engineering.* 2021. 14(1): p. 96.
9. Kluyskens, L., et al., *Biomaterials for meniscus and cartilage in knee surgery: state of the art.* 2022.
10. Jasser, R.A.L., et al., *Evaluation of clinical performance and survival rate of Straumann dental implants in Saudi Population based on cross-sectional study.* Scientific Reports, 2021. 11(1): p. 9526.
11. Biswal, T., S.K. BadJena, and D. Pradhan, *Sustainable biomaterials and their applications: A short review.* Materials Today: Proceedings, 2020. 30: p. 274-282.
12. Najdanović, J., J. Rajković, and S. Najman, *Bioactive Biomaterials: Potential for Application in Bone Regenerative Medicine*, in *Biomaterials in Clinical Practice : Advances in Clinical Research and Medical Devices*, F. Zivic, et al., Editors. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 333-360.
13. Kumar, N. and S. Kumbhat, *Essentials in nanoscience and nanotechnology*. 2016: John Wiley & Sons.
14. Zhang, C., et al., *Progress, challenges, and future of nanomedicine.* 2020. 35: p. 101008.
15. Păduraru, D.N.A.U.I.D.N.A.-G.M.F.A.O.G.A.M.A.U.B.A.R.D.i.M.N.f.C. and A. Imaging Pharmaceutics, 2022. 14, DOI: 10.3390/pharmaceutics14020435.
16. Anderson, S.D., V.V. Gwenin, and C.D. Gwenin, *Magnetic Functionalized Nanoparticles for Biomedical, Drug Delivery and Imaging Applications*. Nanoscale Research Letters, 2019. 14(1): p. 188.
17. Mirsasaani, S.S., et al., *Chapter 2 - Nanotechnology and nanobiomaterials in dentistry*, in *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry (Second Edition)*, K. Subramani and W. Ahmed, Editors. 2019, Elsevier. p. 19-37.
18. Yang, L., L. Zhang, and T.J.J.A.E.M. Webster, *Nanobiomaterials: state of the art and future trends.* 2011. 13(6): p. B197-B217.
19. Hu, X., et al., *Multifunctional gold nanoparticles: a novel nanomaterial for various medical applications and biological activities.* 2020. 8: p. 990.

20. Auría-Soro, C., et al., *Interactions of nanoparticles and biosystems: microenvironment of nanoparticles and biomolecules in nanomedicine.* 2019. 9(10): p. 1365.
21. Yaqoob, A.A., et al., *Recent advances in metal decorated nanomaterials and their various biological applications: a review.* 2020. 8: p. 341.
22. Tarantino, U., et al., *Bone healing and osteoporosis.* 2011. 23(2 Suppl): p. 62-64.
23. Florea, D.A., C. Chircov, and A.M.J.A.S. Grumezescu, *Hydroxyapatite particles—directing the cellular activity in bone regeneration processes: an up-to-date review.* 2020. 10(10): p. 3483.
24. Florencio-Silva, R., et al., *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells.* BioMed Research International, 2015. 2015: p. 421746.
25. Donnelly, E., et al., *Effects of tissue age on bone tissue material composition and nanomechanical properties in the rat cortex.* 2010. 92(3): p. 1048-1056.
26. Canillas, M., et al., *Calcium phosphates for biomedical applications.* Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 2017. 56(3): p. 91-112.
27. Mohd Pu'ad, N.A.S., et al., *Synthesis method of hydroxyapatite: A review.* Materials Today: Proceedings, 2020. 29: p. 233-239.
28. Grande, C.J., et al., *Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications.* 2009. 5(5): p. 1605-1615.
29. Fiume, E., et al., *Hydroxyapatite for Biomedical Applications: A Short Overview.* 2021. 4(4): p. 542-563.
30. Ramesh, S., et al., *Rapid densification of nanocrystalline hydroxyapatite for biomedical applications.* Ceramics International, 2007. 33(7): p. 1363-1367.
31. Jose, S., et al., *Preparation and characterization of Fe doped n-hydroxyapatite for biomedical application.* Surfaces and Interfaces, 2021. 25: p. 101185.
32. Witte, F., *The history of biodegradable magnesium implants: A review.* Acta Biomaterialia, 2010. 6(5): p. 1680-1692.
33. Yoshizawa, S., et al., *Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation.* 2014. 10(6): p. 2834-2842.
34. Microbiologynote.com, *Difference between Gram-Positive and Negative Bacteria – Gram-Negative vs. Gram-Po Bacteria.*
35. Anthony, A., et al., *Studies on multiple antibiotic resistant bacterial isolated from surgical site infection.* 2010. 5(24): p. 3876-3881.
36. Pavithra, D. and M. Doble, *Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants—issues and prevention.* Biomedical Materials, 2008. 3(3): p. 034003.
37. Ruhal, R. and R. Kataria, *Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria.* Microbiological Research, 2021. 251: p. 126829.
38. Veerachamy, S., et al., *Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review.* Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 2014. 228(10): p. 1083-1099.
39. Gebreyohannes, G., et al., *Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms.* Heliyon, 2019. 5(8): p. e02192.

40. Ramasamy, M. and J. Lee, *Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices.* BioMed Research International, 2016. 2016: p. 1851242.
41. Kim, J.S., et al., *Antimicrobial effects of silver nanoparticles.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2007. 3(1): p. 95-101.
42. Huang, Z., et al., *Silver ion-enhanced particle-specific cytotoxicity of silver nanoparticles and effect on the production of extracellular secretions of Phanerochaete chrysosporium.* Chemosphere, 2018. 196: p. 575-584.
43. Remya, V., et al., *Silver nanoparticles green synthesis: a mini review.* 2017. 3(2): p. 165-171.
44. Kołodziejczak-Radzimska, A. and T. Jesionowski, *Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review.* 2014. 7(4): p. 2833-2881.
45. Jiang, J., J. Pi, and J. Cai, *The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications.* Bioinorganic Chemistry and Applications, 2018. 2018: p. 1062562.
46. Giljohann, D.A., et al., *Gold nanoparticles for biology and medicine.* Angew Chem Int Ed Engl, 2010. 49(19): p. 3280-94.
47. Sperling, R.A., et al., *Biological applications of gold nanoparticles.* 2008. 37(9): p. 1896-1908.
48. Shah, M., et al., *Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications.* 2014. 19(8): p. 1320-1344.
49. Gaetke, L.M. and C.K. Chow, *Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients.* Toxicology, 2003. 189(1): p. 147-163.
50. Ermini, M.L. and V. Voliani, *Antimicrobial Nano-Agents: The Copper Age.* ACS Nano, 2021. 15(4): p. 6008-6029.
51. Din, M.I. and R. Rehan, *Synthesis, Characterization, and Applications of Copper Nanoparticles.* Analytical Letters, 2017. 50(1): p. 50-62.
52. Florea, D.A., et al., *Surface modification–A step forward to overcome the current challenges in orthopedic industry and to obtain an improved osseointegration and antimicrobial properties.* 2020. 243: p. 122579.
53. Akdoğan, E. and H.T. Şirin, *Plasma surface modification strategies for the preparation of antibacterial biomaterials: A review of the recent literature.* Materials Science and Engineering: C, 2021. 131: p. 112474.
54. Renner, L.D. and D.B. Weibel, *Physicochemical regulation of biofilm formation.* MRS Bulletin, 2011. 36(5): p. 347-355.
55. Li, W., et al., *Surface design for antibacterial materials: from fundamentals to advanced strategies.* 2021. 8(19): p. 2100368.
56. Hasan, J. and K.J.N. Chatterjee, *Recent advances in engineering topography mediated antibacterial surfaces.* 2015. 7(38): p. 15568-15575.
57. Caricato, A., et al., *MAPLE deposition of nanomaterials.* 2014. 302: p. 92-98.
58. Ciobanu, C.S., et al., *Biomedical properties and preparation of iron oxide-dextran nanostructures by MAPLE technique.* Chemistry Central Journal, 2012. 6(1): p. 17.
59. Grumezescu, V., et al., *Isoflavonoid-Antibiotic Thin Films Fabricated by MAPLE with Improved Resistance to Microbial Colonization.* 2021. 26(12): p. 3634.

60. Hudiță, A., et al. *MAPLE Processed Nanostructures for Antimicrobial Coatings*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. 23, DOI: 10.3390/ijms232315355.
61. Grumezescu, V., et al., *Antimicrobial applications of MAPLE processed coatings based on PLGA and lincomycin functionalized magnetite nanoparticles.* Applied Surface Science, 2019. 484: p. 587-599.