

Fișierul V.B

B.1. Propunerea de proiect (max. 10 pagini în limba română)

1. Titlul, cu indicarea domeniului științific din lista de la secțiunea VI

Acoperiri nanostructurate cu aplicații în ingineria tisulară

Domeniul științific: 7. Bio și nano materiale/tehnologii pentru industrie și medicină

2. Cuvinte cheie: nanomateriale, biocompatibilitate, acoperiri bioactive

3. Obiective, cu indicarea importanței acestora

Pentru a crește activitatea osteogenetică a implanturilor metalice s-au depus numeroase eforturi în găsirea de soluții variate cum ar fi: dezvoltarea de materiale compozite și aliaje, modificarea și texturarea suprafețelor, acoperirea sau funcționalizarea suprafețelor [1,2]. O abordare eficientă în sprijinirea integrării implanturilor metalice și în depășirea bioinertiei ce le caracterizează este modificarea suprafețelor prin acoperirea cu straturi bioactive ce au capacități osteoconductive și/sau osteoinductive [3,4].

Pentru a crește biocompatibilitatea dispozitivelor protetice și pentru a asigura obținerea de materiale nanostructurate adaptate pentru o aplicație biomedicală particulară, cercetarea actuală vizează dezvoltarea și testarea de structuri cu funcționalitate multiplă. Au fost astfel studiate și raportate numeroase materiale biocompatibile și biodegradabile implicate în obținerea de suporturi acelulare, acestea jucând un rol important în realizarea de materiale nanostructurate utilizate pentru ingineria tisulară și medicina regenerativă. Hidroxiapatita sintetică (HAp) este unul dintre cele mai utilizate biomateriale pe bază de fosfat de calciu pentru aplicațiile în ingineria țesutului osos, deoarece prezintă o asemănare chimică și structurală cu apatita biomimetică [5,6] și o excelentă biocompatibilitate [7]. HAp sintetic este responsabil pentru o concentrație locală crescută de Ca^{2+} , care poate stimula proliferarea osteoblastelor și poate încuraja creșterea și diferențierea celulelor stem mezenchimale [8]. Acoperirile obținute prin procesare laser pe bază de HAp au demonstrat eficiență ridicată pentru osteointegrarea implanturilor metalice și regenerarea osoasă ulterioară [9,10]. În plus, osteointegrarea materialelor metalice asistată de HAp poate fi îmbunătățită în continuare prin dezvoltarea de acoperiri compozite sau hibride, deoarece prezența diferiților ioni [11,12,13] și nanostructuri [14,15] induc efecte benefice asupra cristalizării, proprietăților mecanice, degradării și activității biologice ale apatitei.

În procesul de fabricare a acoperirilor trebuie ținut cont de mai multe aspecte. Acoperirile obținute trebuie să îndeplinească concomitent următoarele caracteristici: aderență, hidrofilicitate, uniformitate și nu în ultimul rând reproductibilitate. Luând în considerare cele menționate anterior putem contura **principalele obiective** ale prezentei propuneri:

01. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor

02. Modificarea suprafeței implanturilor din titan prin procesare laser

03. Caracterizarea acoperirilor obținute prin procesare laser

O4. Testarea biocompatibilității suprafeței implanturilor din titan

4. Metodologie, cu indicarea gradului de originalitate

Prezenta propunere are ca **scop principal** îmbunătățirea bioactivității implanturilor metalice prin modificarea suprafețelor dispozitivelor implantabile în scopul accelerării refacerii țesuturile dure afectate.

Modificarea suprafeței cu acoperiri de fosfat de calciu obținute prin procesare cu impulsuri reprezintă o alegere potrivită pentru îmbunătățirea gradului de integrare a implanturilor metalice și biofuncționalității acestora [16,17]. Se știe că tehnica de procesare laser are unele avantaje, cum ar fi sinteza de acoperiri omogene și uniforme de dimensiuni nanometrice sau nanostructurate și posibilitatea de a obține acoperiri compozite care conțin substanțe organice, cum ar fi polimeri [18,19] și biomolecule [20,21]. Unul dintre componentele din prezentul studiu este hidroxiapatita sintetică (HAp). Acesta este unul dintre cele mai utilizate biomateriale pe bază de fosfat de calciu pentru aplicațiile în ingineria țesutului osos, deoarece prezintă o asemănare chimică și structurală cu apatita biomimetică [22,23] și o excelentă biocompatibilitate [24]. HAp sintetic este responsabil pentru o concentrație locală crescută de Ca^{2+} , care poate stimula proliferarea osteoblastelor și poate încuraja creșterea și diferențierea celulelor stem mezenchimale.

Un alt component din structura acoperiri va fi argintul (Ag), mai exact nanoparticule de Ag. Acestea reprezintă una dintre categoriile de nanomateriale pentru biomateriale și biotehnologii noi și îmbunătățite, cu utilizare în industria farmaceutică și cosmetică, terapia antiinfecțioasă și îngrijirea rănilor, industria alimentară și textilă. Aplicabilitatea lor extinsă și versatilă se bazează pe proprietățile reale și ușor de reglat ale nanoparticulelor de Ag, inclusiv comportamentul fizico-chimic remarcabil, eficiența antimicrobiană excepțională, acțiunea antiinflamatoare și activitatea antitumorală. Pe lângă produsele pe bază de Ag disponibile comercial și sigure clinic, unele studii recente au evaluat aplicabilitatea Ag de dimensiuni nanometrice ca agent terapeutic în strategii augmentate și alternative pentru terapia cancerului, platforme de detectare și diagnosticare, biomateriale restaurative și regenerative.

Diferite studii din ultimii ani au investigat toxicitatea nanoparticulelor de Ag în țesuturile umane și au demonstrat aplicabilitatea acestora ca agenți terapeutici pentru produsele farmaceutice [25,26]. Alt aspect important este că efectele toxice manifestate de nanoparticulele de Ag sunt puternic influențate de morfologia și dimensiunea lor. De exemplu, citoplasma și

organele celulare sunt mai predispuse să fie afectate de particule de dimensiuni reduse [27,28]. Datorită nanodimensiunii și chimiei suprafeței reactive, particulele de Ag sunt capturate și interiorizate de celule [29]. Aglomerarea lor intracelulară poate deteriora grav constituția celulară (peretele celular, citoplasma), precum și organele vitale (mitocondriile) și macromoleculele esențiale (proteine, enzime, ADN) [30,31]. De asemenea, un alt posibil mecanism pentru toxicitatea acestor nanoparticule este apoptoza celulară [32,33].

În prezentul studiu se dorește fabricarea unor acoperiri ce vor avea în componență, în afară de HAp și nanoparticule de Ag, și carboximetilceluloză (CMC), iar în funcție de rezultatele obținute la testele *in vitro* se va decide adăugarea sau nu a unui factor de creștere. Acesta din urmă are un rol esențial pe durata refacerii și regenerării țesutului osos reprezentând o strategie atractivă pentru a promova și susține osteointegrarea implanturilor metalice și vindecarea ulterioară a osului. Osteointegrarea materialelor metalice asistată de HAp poate fi îmbunătățită în continuare prin dezvoltarea de acoperiri compozite, deoarece prezența diferiților ioni [34,35,36] și nanostructuri [37,38] induc efecte benefice asupra cristalizării, proprietăților mecanice, degradării și activității biologice ale apatitei.

De menționat faptul că acoperirile destinate dispozitivelor biomedicale trebuie să îndeplinească o serie de caracteristici obligatorii, precum stabilitate și durabilitate, reproductibilitate, adaptabilitate la suprafața ce se dorește a fi modificată. Modificarea suprafețelor implanturilor metalice, efectuată prin tehnici mecanice, chimice sau fizice [39,40,41], are ca rezultat îmbunătățirea proprietăților de biocompatibilitate, reactivitate, hidrofilicitate, rugozitate, energie și încărcarea pe suprafața a implanturilor.

O1. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor

A.1. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor

Obținerea nanoparticulelor de hidroxiapatită (HAp) și Ag se va face cu ajutorul metodei hidrotermale sau co-precipitare [42]. Investigarea cristalinității nanoparticulelor se va face prin Difrakție de Raze X (XRD), iar în ceea ce privesc dimensiunea și forma acestora se va utiliza Microscopia Electronică prin Transmisie (TEM) / Microscopia Electronică de Baleiaj (SEM).

O2. Modificarea suprafeței implanturilor din titan prin procesare laser

A.2. Fabricarea acoperirilor pe suprafața implanturilor din titan

Se vor prepara inițial soluții volatile ce vor conține HAp, Ag și CMC (și în funcție de rezultatele *in vitro* se va adăuga sau nu factor de creștere la soluția inițială), de concentrații mai mici de 5% și se vor depune sub formă de acoperire prin procesare laser (Figura 1) pe substratul din titan. Solventul utilizat în prepararea soluției trebuie să permită solubilizarea, dar fără deteriorarea integrității structurii chimice a compușilor. Se vor optimiza parametrii experimentali astfel încât acoperirile obținute să nu fie modificate din punct de vedere stoichiometric și astfel se va face un studiu al parametrilor experimentali (fluența, frecvența, nr de impulsuri, etc.).

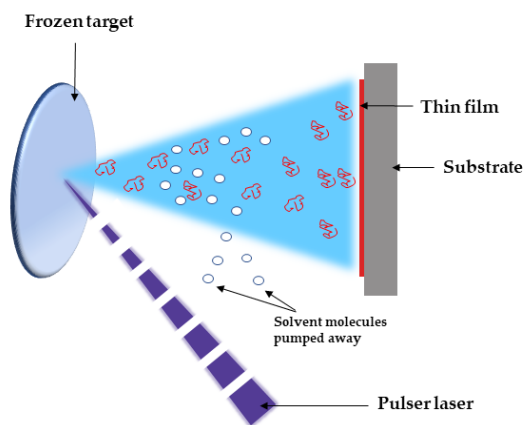


Figura 1. Reprezentarea schematică a fabricării acoperirilor prin procesare laser [43]

O3. Caracterizarea acoperirilor obținute prin procesare laser

A.3. Caracterizarea acoperirilor obținute la A.2.

Pentru investigarea integrității grupelor funcționale caracteristice materialelor obținute la A.2. se va utiliza Spectrometria în Infraroșu cu Transformată Fourier - FT-IR. Cartografierea în infraroșu a acoperirilor nanostructurate obținute experimental se va face cu ajutorul Microscopiei în InfraRoșu – MIR, iar în scopul investigării morfologiei și dimensiunii acoperirilor subțiri obținute se va utiliza tehnica SEM.

O4. Testarea biocompatibilității suprafeței implanturilor din titan

A.4. Evaluarea biologică a acoperirilor

A.4.1. Evidențierea capacității de creștere și multiplicare a microorganismelor selectate pe eșantioanele cu suprafața modificată

Stabilirea gradului de creștere și a capacității de aderență a microorganismelor selectate la acoperirile obținute prin procesare laser se va face pe tulpini Gram pozitive și Gram negative. Stabilirea capacității de aderență a microorganismelor selectate în prezența acoperirilor obținute

se va face pe eşantioanele modificate prin metoda numărării coloniilor viabile, după incubarea microorganismelor până la 72 de ore în prezența suprafețelor modificate.

A.4.2. Evaluarea citocompatibilității acoperirilor

Citocompatibilitatea va fi pusă în evidență prin teste de proliferare și morfologie a culturilor celulare osteoprogenitoare. Capacitatea acoperirilor nanostructurate de a susține adeziunea, viabilitatea și proliferarea celulelor osteoprogenitoare va fi investigată atât din punct de vedere calitativ, cât și cantitativ, utilizând testele Live/Dead și MTT până la maxim 7 zile de la însămânțarea celulelor pe substraturile cu suprafață modificată.

O. Diseminare – publicarea a 2 articole în zona Q1/Q2 cotate ISI

5. Rezultate estimate intermediare/finale cu indicarea calendarului de activități

Rezultatele estimate sunt listate în Tabelul de mai jos.

Nr. crt.	Activitate	Rezultate intermediare/finale	Perioada (luni)
O1.	A1. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor	optimizarea metodei de sinteză; nanoparticule de HAp, Ag; proprietăți fizico-chimice ale nanosistemelor	1 – 4
O2.	A.2. Fabricarea acoperirilor pe suprafața implanturilor din titan	optimizarea procesului de obținere a acoperirilor; suprafețe din Ti modificate	4 – 8
O3.	A.3. Caracterizarea acoperirilor obținute la A.2.	caracterizare fizico-chimică a acoperirilor bioactive (exemplu: FT-IR, SEM, unghi de contact, etc.)	9 – 14
O4.	A.4. Evaluarea biologică a acoperirilor	acoperiri cu proprietăți antimicrobiene/anti-aderente; acoperiri biocompatibile cu potențial osteoinductiv	15 – 20
O	Diseminare	redactarea și publicarea a 2 manuscrite	1 – 20

6. Articole estimate a fi elaborate cu indicarea factorului de impact minim al revistei unde vor fi publicate

Rezultatele obținute în cadrul studiului de față se vor disemina prin publicarea a 2 manuscrite în reviste de specialitate, cotate ISI, din zona Q1/Q2 cu factor de impact >3.

8. Suma solicitată (nu se vor specifica tipurile de cheltuieli).

Suma solicitată – 60000 lei

B.2. Titlu și rezumat în limba engleză (max. 10 rânduri)

Nanostructured coatings with application in tissue engineering

Abstract:

Sever health conditions are reportedly generated at the occurrence of opportunistic local infection and improper integration of metallic implants. Solving this issue often involves the improvement of the protective coatings, making them an attractive and challenging selection for improving the metallic devices' biofunctional performances to restore or replace bone tissue. In the framework of this project composite materials based on hydroxyapatite (HAp), Silver (Ag), and CMC are proposed as multifunctional coatings for hard tissue implants. The goal of the project is to obtain improved cytocompatibility *via* proliferation and morphological assays on osteoblast cell cultures. The project proposes HAp, Ag and CMC as multifunctional materials with superior osseointegration potential and the ability to reduce device-associated infections.

7. Bibliografie

- ¹ Ibrahim et al., Biomedical materials and techniques to improve the tribological, mechanical and biomedical properties of orthopedic implants – A review article. *J. Alloys Compd.* 2019, 714, 636-667, doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.04.231.
- ² Souza et al., Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration. *Acta Biomater.* 2019, 94, 112-131, doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.045.
- ³ Popa et al., Insights on metal based dental implants and their interaction with the surrounding tissues. *Curr. Top Med. Chem.* 2015, 15(16), 1614-162, doi:10.2174/1568026615666150414144033.
- ⁴ Asensio et al., Achievements in the Topographic Design of Commercial Titanium Dental Implants: Towards Anti-Peri-Implantitis. *J. Clin. Med.* 2019, 8(11), 1982, doi.org/10.3390/jcm8111982.
- ⁵ Beig, B.; Liaqat, U.; Farooq Khan Niazi, M.; Douna, I.; Zahoor, M.; Bilal Khan Niazi, M. Current Challenges and Innovative Developments in Hydroxyapatite-Based Coatings on Metallic Materials for Bone Implantation: A Review. *Coatings* **2020**, 10(12), 1249, doi.org/10.3390/coatings10121249
- ⁶ Pu'ad, N.; Chuan, L.T.; Salman, N.S.; Selimin, M.A.; Latif, A.F.A.; Muhamad, M.S.; Abdullah, H.Z.; Idris, M.; Mustapha, S.N.H. Synthesis of bioactive calcium phosphate from cockle shell for biomedical applications. *Biointerface Research in Applied Chemistry* **2020**, 10, 5787-5791, doi:10.33263/briac104.787791.
- ⁷ Zhao, R.; Xie, P.; Zhang, K.; Tang, Z.; Chen, X.; Zhu, X.; Fan, Y.; Yang, X.; Zhang, X. Selective effect of hydroxyapatite nanoparticles on osteoporotic and healthy bone formation correlates with intracellular calcium homeostasis regulation. *Acta Biomater.* **2017**, 59, 338-350, doi: 10.1016/j.actbio.2017.07.009
- ⁸ Beig, B.; Liaqat, U.; Farooq Khan Niazi, M.; Douna, I.; Zahoor, M.; Bilal Khan Niazi, M. Current Challenges and Innovative Developments in Hydroxyapatite-Based Coatings on Metallic Materials for Bone Implantation: A Review. *Coatings* **2020**, 10(12), 1249, doi.org/10.3390/coatings10121249
- ⁹ Duta, L. In Vivo Assessment of Synthetic and Biological-Derived Calcium Phosphate-Based Coatings Fabricated by Pulsed Laser Deposition: A Review. *Coatings* **2021**, 11(1), 99, doi.org/10.3390/coatings11010099
- ¹⁰ Beig, B.; Liaqat, U.; Farooq Khan Niazi, M.; Douna, I.; Zahoor, M.; Bilal Khan Niazi, M. Current Challenges and Innovative Developments in Hydroxyapatite-Based Coatings on Metallic Materials for Bone Implantation: A Review. *Coatings* **2020**, 10(12), 1249, doi.org/10.3390/coatings10121249
- ¹¹ Hidalgo-Robatto, B.M.; López-Álvarez, M.; Azevedo, A.Z.; Dorado, J.; Serra, J.; Azevedo, N.F.; González, P. Pulsed laser deposition of copper and zinc doped hydroxyapatite coatings for biomedical applications. *Surface & Coatings Technology* **2018**, 333, 168-177, doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.11.006
- ¹² Hidalgo-Robatto, B.M.; Aguilera-Correa, J.J.; López-Álvarez, M.; Romera, D.; Esteban, J.; González, P.; Serra, J. Fluor-carbonated hydroxyapatite coatings by pulsed laser deposition to promote cell viability and antibacterial properties. *Surface and Coatings Technology* **2018**, 349, 736-744, doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.06.047
- ¹³ Massit, A.; El Yacoubi, A.; Rezzouk, A.; El Idrissi, B.C. Thermal Behavior of Mg-Doped Calcium-Deficient Apatite and Stabilization of beta Tricalcium Phosphate. *Biointerface Research in Applied Chemistry* **2020**, 10, 6837-6845, doi:10.33263/briac106.68376845.
- ¹⁴ Mareci, D.; Trincă, L.C.; Căilean, D.; Souto, R.M. Corrosion resistance of ZrTi alloys with hydroxyapatite-zirconia-silver layer in simulated physiological solution containing proteins for biomaterial applications. *Applied Surface Science* **2016**, 389, 1069-1075, doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.08.046
- ¹⁵ Qiao, H.; Song, G.; Huang, Y.; Yang, H.; Han, S.; Zhang, X.; Wang, Z.; Ma, J.; Bue, X.; Fud, L. Si, Sr, Ag co-doped hydroxyapatite/TiO₂ coating: enhancement of its antibacterial activity and osteoinductivity. *RSC Advances* **2019**, 9, 13348-13364, doi.org/10.1039/C9RA01168D
- ¹⁶ Kreller, T.; Sahm, F.; Bader, R.; Boccaccini, A.R.; Jonitz-Heincke, A.; Detsch, R. Biomimetic Calcium Phosphate Coatings for Bioactivation of Titanium Implant Surfaces: Methodological Approach and In Vitro Evaluation of Biocompatibility. *Materials* **2021**, 14(13), 3516, doi.org/10.3390/ma14133516
- ¹⁷ Cao, J.; Lian, R.; Jiang, X.; Rogachev, A.C. In vitro degradation assessment of calcium fluoride-doped hydroxyapatite coating prepared by pulsed laser deposition. *Surface and Coatings Technology* **2021**, 416, 127177, doi.org/10.1016/j.surfcoat.2021.127177
- ¹⁸ Gherasim, O.; Grumezescu, A.M.; Ficai, A.; Grumezescu, V.; Holban, A.M.; Gălățeanu, B.; Hudiță, A. Composite P(3HB-3HV)-CS Spheres for Enhanced Antibiotic Efficiency. *Polymers* **2021**, 13(6), 989, doi.org/10.3390/polym13060989

- ¹⁹ Marturano, V.; Abate, F.; Ambrogi, V.; Califano, V.; Cerruti, P.; Pepe, G.P.; Vicari, L.R.M.; Ausanio, G. Smart Coatings Prepared via MAPLE Deposition of Polymer Nanocapsules for Light-Induced Release. *Molecules* **2021**, *26*(9), 2736, doi.org/10.3390/molecules26092736
- ²⁰ Icriverzi, M.; Rusen, L.; Brajnicov, S.; Bonciu, A.; Dinescu, M.; Cimpean, A.; Evans, R.W.; Dinca, V.; Roseanu, A. Macrophage in vitro Response on Hybrid Coatings Obtained by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation. *Coatings* **2019**, *9*(4), 236.
- ²¹ Grumezescu, V.; Negut, I.; Cristescu, R.; Grumezescu, A.M.; Holban, A.M.; Iordache, F.; Chifiriuc, M.C.; Narayan, R.J.; Chrisey, D.B. Isoflavonoid-Antibiotic Thin Films Fabricated by MAPLE with Improved Resistance to Microbial Colonization. *Molecules* **2021**, *26*(12), 3634, doi.org/10.3390/molecules26123634
- ²² Beig, B.; Liaqat, U.; Farooq Khan Niazi, M.; Douna, I.; Zahoor, M.; Bilal Khan Niazi, M. Current Challenges and Innovative Developments in Hydroxyapatite-Based Coatings on Metallic Materials for Bone Implantation: A Review. *Coatings* **2020**, *10*(12), 1249, doi.org/10.3390/coatings10121249
- ²³ Pu'ad, N.; Chuan, L.T.; Salman, N.S.; Selimin, M.A.; Latif, A.F.A.; Muhamad, M.S.; Abdullah, H.Z.; Idris, M.; Mustapha, S.N.H. Synthesis of bioactive calcium phosphate from cockle shell for biomedical applications. *Biointerface Research in Applied Chemistry* **2020**, *10*, 5787-5791, doi:10.33263/briac104.787791.
- ²⁴ Zhao, R.; Xie, P.; Zhang, K.; Tang, Z.; Chen, X.; Zhu, X.; Fan, Y.; Yang, X.; Zhang, X. Selective effect of hydroxyapatite nanoparticles on osteoporotic and healthy bone formation correlates with intracellular calcium homeostasis regulation. *Acta Biomater.* **2017**, *59*, 338–350, doi: 10.1016/j.actbio.2017.07.009
- ²⁵ Ontong, J.C.; Paosen, S.; Shankar, S.; Voravuthikunchai, S.P. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using Senna alata bark extract and its antimicrobial mechanism through enhancement of bacterial membrane degradation. *J. Microbiol. Methods* **2019**, *165*, 105692
- ²⁶ Hussein, J.; El-Naggar, M.E.; Fouda, M.M.G.; Morsy, O.M.; Ajarem, J.S.; Almalki, A.M.; Allam, A.A.; Mekawi, E.M. The efficiency of blackberry loaded AgNPs, AuNPs and Ag@AuNPs mediated pectin in the treatment of cisplatin-induced cardiotoxicity in experimental rats. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *159*, 1084–1093.
- ²⁷ Fahimirad, S.; Ajallouei, F.; Ghorbanpour, M. Synthesis and therapeutic potential of silver nanomaterials derived from plant extracts. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *168*, 260–278.
- ²⁸ Perde-Schrepler, M.; Florea, A.; Brie, I.; Virag, P.; Fischer-Fodor, E.; Vâlcău, A.; Gurzău, E.; Lisencu, C.; Maniu, A. Size-Dependent Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Cochlear Cells In Vitro. *J. Nanomater.* **2019**, *2019*, 6090259.
- ²⁹ Wu, F.; Harper, B.J.; Harper, S.L. Differential dissolution and toxicity of surface functionalized silver nanoparticles in small-scale microcosms: Impacts of community complexity. *Environ. Sci. Nano* **2017**, *4*, 359–372.
- ³⁰ Heshmati, M.; Arbabi Bidgoli, S.; Khoei, S.; Mahmoudzadeh, A.; Sorkhabadi, S.M.R. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in Chinese Hamster ovary cell line (CHO-K1) cells. *Nucleus* **2019**, *62*, 221–225.
- ³¹ Tang, J.; Chen, B.; Cai, E.; Liu, W.; Jiang, J.; Chen, F.; Shan, X.; Zhang, H. Mechanisms of silver nanoparticles-induced cytotoxicity and apoptosis in rat tracheal epithelial cells. *J. Toxicol. Sci.* **2019**, *44*, 155–165.
- ³² Xue, Y.; Wang, J.; Huang, Y.; Gao, X.; Kong, L.; Zhang, T.; Tang, M. Comparative cytotoxicity and apoptotic pathways induced by nanosilver in human liver HepG2 and L02 cells. *Hum. Exp. Toxicol.* **2018**, *37*, 1293–1309.
- ³³ Plackal Adimuriyil George, B.; Kumar, N.; Abrahamse, H.; Ray, S.S. Apoptotic efficacy of multifaceted biosynthesized silver nanoparticles on human adenocarcinoma cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*.
- ³⁴ Hidalgo-Robatto, B.M.; López-Álvarez, M.; Azevedo, A.Z.; Dorado, J.; Serra, J.; Azevedo, N.F.; González, P. Pulsed laser deposition of copper and zinc doped hydroxyapatite coatings for biomedical applications. *Surface & Coatings Technology* **2018**, *333*, 168-177, doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.11.006
- ³⁵ Hidalgo-Robatto, B.M.; Aguilera-Correa, J.J.; López-Álvarez, M.; Romera, D.; Esteban, J.; González, P.; Serra, J. Fluor-carbonated hydroxyapatite coatings by pulsed laser deposition to promote cell viability and antibacterial properties. *Surface and Coatings Technology* **2018**, *349*, 736-744, doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.06.047
- ³⁶ Massit, A.; El Yacoubi, A.; Rezzouk, A.; El Idrissi, B.C. Thermal Behavior of Mg-Doped Calcium-Deficient Apatite and Stabilization of beta Tricalcium Phosphate. *Biointerface Research in Applied Chemistry* **2020**, *10*, 6837-6845, doi:10.33263/briac106.68376845.
- ³⁷ Mareci, D.; Trincă, L.C.; Căilean, D.; Souto, R.M. Corrosion resistance of ZrTi alloys with hydroxyapatite-zirconia-silver layer in simulated physiological solution containing proteins for biomaterial applications. *Applied Surface Science* **2016**, *389*, 1069-1075, doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.08.046

-
- ³⁸ Qiao, H.; Song, G.; Huang, Y.; Yang, H.; Han, S.; Zhang, X.; Wang, Z.; Ma, J.; Bue, X.; Fud, L. Si, Sr, Ag co-doped hydroxyapatite/TiO₂ coating: enhancement of its antibacterial activity and osteoinductivity. *RSC Advances* **2019**, *9*, 13348-13364, doi.org/10.1039/C9RA01168D
- ³⁹ Liu, Y.; Rath, B.; Tingart, M.; Eschweiler, J. Role of implants surface modification in osseointegration: A systematic review. *J Biomed Mater Res Part A*. **2020**, *108*, 470–484, doi: 10.1002/jbm.a.36829
- ⁴⁰ Li, J.; Zhou, P.; Attarilar, S.; Shi, H. Innovative Surface Modification Procedures to Achieve Micro/Nano-Graded Ti-Based Biomedical Alloys and Implants. *Coatings* **2021**, *11(6)*, 647, doi.org/10.3390/coatings11060647
- ⁴¹ Roy, A.K.; Kumar, K. Sustainability in bio-metallic orthopedic implants. *Biointerface Research in Applied Chemistry* **2019**, *9*, 3825-3829, doi:10.33263/briac91.825829.
- ⁴² Gherasim *et al.*, Bioactive Coatings Based on Hydroxyapatite, Kanamycin, and Growth Factor for Biofilm Modulation. *Antibiotics* **2021**, *10(2)*, 160, doi.org/10.3390/antibiotics10020160.
- ⁴³ Grumezescu *et al.*, Isoflavonoid-Antibiotic Thin Films Fabricated by MAPLE with Improved Resistance to Microbial Colonization *Molecules* **2021**, *26(12)*, 3634, doi.org/10.3390/molecules26123634.