

Biofuncionalización de Ti6Al4V mediante crecimiento de nanoestructuras de TiO₂ con contenido de calcio y fósforo

Biofunctionalization of Ti6Al4V by growth of TiO₂ nanostructures with calcium and phosphorus

Anderson Sandoval-Amador^{1,2}, Laura Juliana Miranda-Vesga¹,
Juan Sebastian Pérez Martínez¹, Darío Yesid Peña-Ballesteros¹,
Sandra Judith García-Vergara¹

¹ Grupo de Investigaciones en Corrosión GIC, Centro de Materiales y Nanomateriales CMN - UIS, Universidad Industrial de Santander UIS, Bucaramanga, Colombia.

e-mail: anderson84f@outlook.com, dypena@uis.edu.co

² Grupo Fields, Corporación Universitaria de Investigación y Desarrollo UDI, Barrancabermeja, Colombia

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto de la electrodeposición de fosfato de calcio sobre nanoestructuras de TiO₂. Para ello, se desarrollaron nanoestructuras de TiO₂ sobre sustratos de Ti6Al4V en una solución de NH₄F y NH₄H₂PO₄ y posteriormente se realizó electrodeposición catódica empleando una solución compuesta de Ca(NO₃)₂ y (NH₄)₂HPO₄ como electrolito. La morfología de las superficies se observó mediante microscopia electrónica de barrido y la capacidad de las superficies para formar apatitas se evaluó a través de absorción atómica tras inmersión de las muestras en fluido corporal simulado (SBF) durante 7 días. Finalmente se evaluó la respuesta electroquímica de las superficies biofuncionalizadas mediante pruebas de resistencia a la polarización y curvas potenciodinámicas. Estos ensayos permitieron observar un incremento en la resistencia a la degradación de las superficies biofuncionalizadas respecto al sustrato.

Palabras clave: Biofuncionalización, nanoestructuras, Ti6Al4V, TiO₂.

ABSTRACT

In this work the effect of the electrodeposition of calcium phosphate on TiO₂ nanostructures was evaluated. For that, TiO₂ nanostructures were developed in a solution of NH₄F and NH₄H₂PO₄ on Ti6Al4V substrates and subsequent cathodic electrodeposition was performed using Ca(NO₃)₂ and (NH₄)₂HPO₄ as electrolyte. The surface morphology was observed by scanning electron microscopy and the surface capacity to form apatites was evaluated by Atomic absorption spectroscopy after immersion of samples in simulated body fluid (SBF) for 7 days. Finally, the electrochemical response of biofunctionalized surfaces was evaluated by polarization resistance tests and potentiodynamic curves. These tests allowed to observe an increase in the resistance to degradation of biofunctionalized surfaces respect to the substrate.

Keywords: Biofunctionalization, nanostructure, Ti6Al4V, TiO₂.

1. INTRODUCCIÓN

Materiales metálicos como la aleación Cr-Co-Mo, el acero AISI 316 LVM y el Ti6Al4V han sido utilizados a lo largo de los años como biomateriales de osteosíntesis obteniendo grandes resultados [1], [2]. El principal requerimiento de estos materiales es que sean resistentes a sufrir alguna alteración en su superficie cuando son implantados en el cuerpo y que posean óptimas propiedades mecánicas enlazadas con una excelente biocompatibilidad [3]. Los dispositivos fabricados con estos materiales muestran un alto grado de aceptación por el cuerpo, buena respuesta celular y alta resistencia a la corrosión, donde la resistencia a la corrosión de estos materiales se deriva de la película estable de óxido que se forma en su superficie, la cual al dañarse, se reconstruye en presencia de fluidos fisiológicos [4], [5].

Partiendo de la necesidad de producir mejores superficies para los materiales de implantes de regeneración ósea, se ha estudiado la fabricación de nanoestructuras de TiO_2 , [6], [7], [8], [9],[10], [11], [12] con contenidos de calcio fosforo [13],[14],[15] a partir de Ti6Al4V con el fin de mejorar la respuesta de la interfase superficial del material implantable - medio biológico con el fin de favorecer la formación de hidroxiapatita, la cual es una estructura estable que facilita la oseointegración con el tejido óseo y provee al hueso de condiciones óptimas para su desempeño. Por tal motivo en este estudio, se analiza la capacidad de formación de apatitas, la degradación y el efecto del voltaje de anodizado sobre superficies de la aleación Ti6Al4V nanoestructuradas y funcionalizadas mediante la electrodeposición de calcio y fosforo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de las muestras de la aleación Ti6Al4V .

Se emplearon sustratos de la aleación Ti6Al4V (ASTM F-136) con 14 mm de diámetro y 3 mm de espesor. Antes de realizar el anodizado electroquímico, los discos de la aleación de Ti6Al4V fueron mecánicamente desbastados usando papel de carburo de silicio (220-, 320-, 400-, 600-, 1000-, y 1200) y pulidos usando paños de algodón con una suspensión de Al_2O_3 . Por ultimo las muestras fueron limpiadas ultrasónicamente en acetona por 15 minutos.

2.2. Formación de las nanoestructuras de TiO_2 .

Las nanoestructuras fueron obtenidas sobre las superficies de los discos de la aleación de Ti6Al4V por anodizado electroquímico en una solución acuosa que contenía 1M hidrogenofosfato de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) y 0.3 M de fluoruro de amonio (NH_4F) como electrolito. El anodizado electroquímico se llevó a cabo usando una celda de dos electrodos, donde los discos de la aleación de Ti6Al4V se emplearon como electrodo positivo mientras que una malla de platino se utilizó como electrodo negativo y la separación entre los electrodos se mantuvo en 15 mm. El proceso se llevó a cabo durante una hora aplicando 10, 20, 30 and 40 V con una fuente THERMO EC 57090ECA-115, en un ambiente controlado con temperatura de 25 °C con agitación magnética a 100 rpm. Después del anodizado las muestras fueron lavadas con agua destilada y secadas en aire.

2.3. Funcionalización de las nanoestructuras de TiO_2 .

Las Nanoestructuras de TiO_2 fueron funcionalizadas por electrodeposición catódica de fosfato de calcio. La electrodeposición catódica se llevó a cabo en una celda electroquímica con un sistema de dos electrodos, donde se utilizaron las nanoestructuras crecidas sobre la aleación de Ti6Al4V como el electrodo negativo, mientras que una lámina de grafito se empleó como el electrodo positivo. La distancia de separación entre los electrodos se mantuvo en 15 mm. El proceso se llevó a cabo a 12 V durante 0,25 h, se controló la temperatura a 60 °C y se aplicó agitación magnética a 600 rpm. El electrolito empleado para la electrodeposición catódica fue una solución acuosa compuesta por 0,025 M de hidrogenofosfato de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) y 0.042M de nitrato de calcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). El pH inicial del electrolito se fijó en 10, ya que este pH está en el rango donde la especie PO_4^{3-} es la más estable, y esto es necesario para llevar a cabo el proceso de electrodeposición de fosfato de calcio [16].

2.4 Análisis de bioactividad

La bioactividad in vitro de las muestras se evaluó en términos de la capacidad de absorción de iones de calcio, este ensayo se realizó mediante inmersión de las muestras en solución acuosa con composición similar a la del plasma sanguíneo, al que denominaremos fluido corporal simulado (SBF o SBF de Kokubo [17]). Las nanoestructuras de TiO_2 fucionalizadas con calcio y fósforo se sumergieron durante 7 días en frascos de 30 ml que contienen SBF a 37 °C. En la solución de SBF se renovó diariamente. Con el fin de obtener las muestras de fluido para el ensayo de absorción atómica se tomó una alícuota de 1 ml del SBF. El equipo empleado para el ensayo fue un espectrofotómetro de absorción atómica BUCK modelo 210 VGP.

2.5 Caracterización de la superficie de Ti6Al4V funcionalizada

La morfología de las superficies funcionalizadas se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un microscopio electrónico de barrido modelo JOEL Quanta 650 FEG equipado con espectroscopia de energía dispersiva de rayos X EDAX Apolo X (EDS).

2.6 Caracterización Electroquímica

Se realizaron ensayos electroquímicos en una celda de tres electrodos con un potenciostato Gamry 600. Se utilizó una barra de grafito como contraelectrodo y Ag/AgCl (KCl 3M) como electrodo de referencia respectivamente. Se empleó SBF como electrólito de soporte. Las pruebas de resistencia a la polarización lineal se llevaron a cabo aplicando un barrido de potencial entre -30 mV y 30 mV (frente al potencial de circuito abierto), la velocidad de barrido fue de 0,166 mV/s, las curvas de polarización potenciodinámica se registraron aplicando un barrido de potencial desde - 1000 mV a 2000 mV (respecto al potencial de circuito abierto) con una velocidad de barrido de 1 mV/s. Todos los experimentos electroquímicos se realizaron a 37 °C, con el fin de simular condiciones corporales.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se pudo observar una microestructura equiaxial, está formada por granos finos de fase α (zona clara, rica en aluminio) y fase β (zona oscura, rica en vanadio), esta última se encuentra distribuida en los bordes de grano, sobre la matriz de fase α [18]. Esta fase se denomina mill-annealed y según lo reportado en [19] es posible obtener esta microestructura al trabajar el material mecánicamente en un intervalo de temperaturas correspondiente al campo $\alpha + \beta$ y posteriormente realizar un proceso de recocido que se debe llevar a cabo a una temperatura inferior a la temperatura de inicio de la martensita. Cabe resaltar que esta microestructura es la más ampliamente usada en la aleación de Ti6Al4V debido a las excelentes propiedades mecánicas que esta brinda [20], [21].

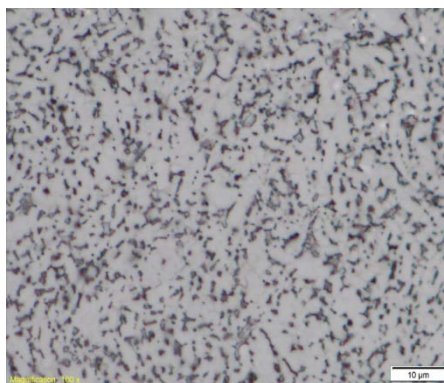


Figura 1: Micrografía óptica de la aleación Ti6Al4V a 2000X atacada con solución Kroll.

La figura 2, muestra 4 grupos de micrografías SEM a diferentes aumentos de las nanoestructuras obtenidas por anodizado electroquímico. En las micrografías SEM de los grupos (a) y (b) se observa una distribución ordenada y homogénea de nanotubos sobre la superficie, con diámetros promedio de 32 nm y 77 nm respectivamente, estos valores concuerdan con lo reportado en [22], donde se desarrollaron nanotubos de TiO₂ y se encontraron relaciones similares entre el voltaje y los diámetros de los nanotubos. Por otra parte en las micrografías a y b se pueden observar pequeñas cavidades de fase β en las cuales crecieron nanoporos. En las micrografías SEM de los grupos (c) y (d) se muestran capas de nanoporos sobre las superficies. La capa formada a 30 V sobre la superficie de la aleación de Ti6Al4V (figura 2 (c)) presenta una morfología homogénea donde el diámetro promedio del poro es de 24 nm, con presencia de cavidades de fase β , mientras que la capa formada en el grupo (d) es irregular, presentando una superficie agrietada en la cual se pueden observar los nanoporos con diámetro promedio de 216 nm.

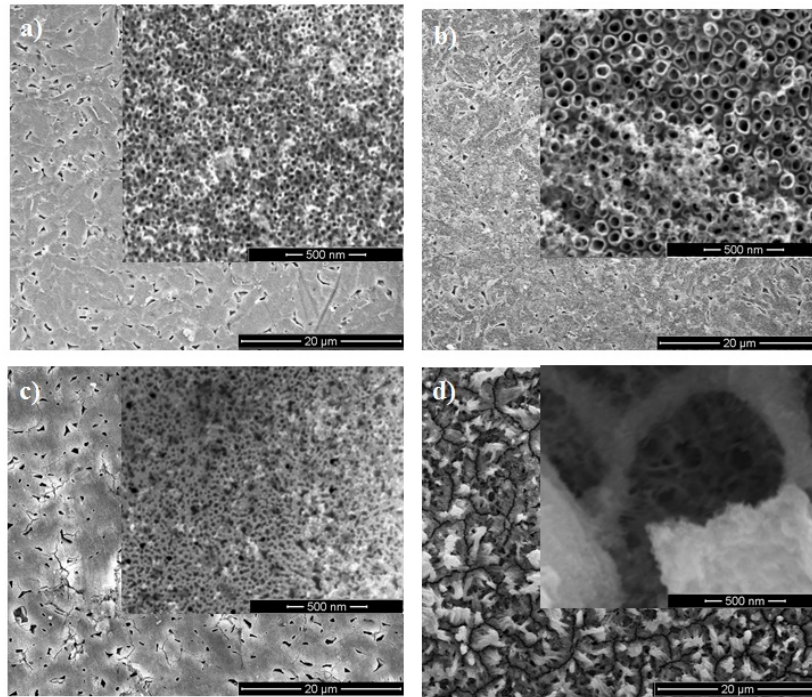


Figura 2: Micrografías SEM de las nanoestructuras obtenidas mediante anodizado electroquímico a: (a) 10 V, (b) 20 V, (c) 30 V y (d) 40 V.

La Figura 3, muestra 4 grupos de micrografías SEM de los recubrimientos de calcio y fósforo depositados sobre las nanoestructuras de TiO_2 mediante electrodeposición catódica.

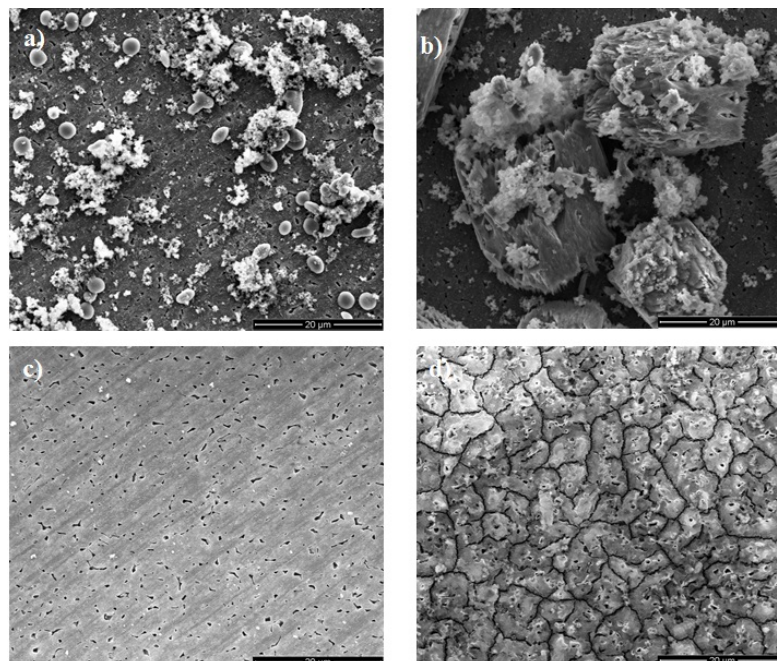


Figura 3: Micrografías SEM de las nanoestructuras funcionalizadas mediante electrodeposición catódica sobre superficies anodizadas a: (a) 10 V, (b) 20 V, (c) 30 V y (d) 40 V

Los diámetros promedio de las nanoestructuras variaron tras el proceso de electrodeposición catódica, disminuyendo para las probetas de (a) 10V, (b) 20V y (d) 40V, con valores de 24nm, 31nm y 198 nm respectivamente.

tivamente; mientras que para las probeta de (c) 30V no se presentó ningún efecto en el diámetro de poro. Adicionalmente como se puede observar en la figura 3, las superficies con nanoestructuras de TiO₂ crecidas a 30 y 40V no brindan buena adhesión para el recubrimiento de fosfato de calcio.

La bioactividad de las superficies biofuncionalizadas se evaluó mediante obtención de la curva de concentración de Ca²⁺ tras sumergir las muestras durante 7 días en SBF a 37 °C (figura 4).

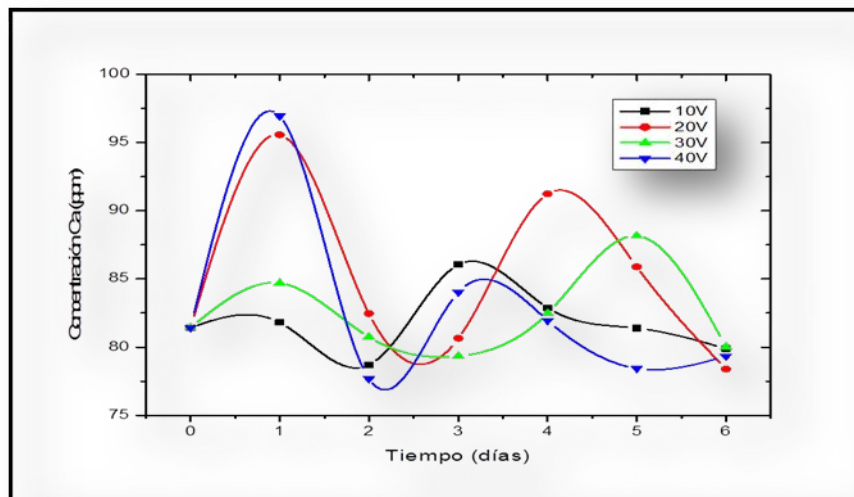


Figura 4: Evaluación de bioactividad mediante medición de la Concentración de Ca²⁺ vs tiempo de inmersión.

La concentración inicial de calcio en la solución SBF es de 81,4 ppm, como se puede apreciar en la figura 4 las 4 nanoestructuras funcionalizadas presentaron variaciones en las concentraciones de calcio en las alíquotas tomadas diariamente, estas variaciones se deben a, los procesos de absorción y desorción que se llevan a cabo mientras el material está inmerso en el fluido fisiológico simulado. Un aumento de la concentración indica que el recubrimiento presentó desorción, mientras que una disminución indica absorción. La disminución de la concentración de calcio en la solución se puede atribuir a atracciones electrostáticas entre la superficie y los iones de calcio o a la formación de una capa de apatita. Estos datos de absorción de calcio por las superficies están relacionadas con la capacidad que tienen las superficies de nanoestructuras para favorecer la adherencia de fosfatos de calcio [22]. Adicionalmente estos datos son comparables con lo reportado en [23], [24] y [25] donde se evaluó la formación de apatitas sobre nanotubos de TiO₂ por inmersión y encontraron mediante espectroscopia de infrarrojo que tras la inmersión en SBF se formó una capa de hidroxiapatita. Finalmente, a partir de los resultados de concentración inicial y final, se puede afirmar que las 4 nanoestructuras funcionalizadas presentaron una adsorción, en donde se debió favorecer la formación de una capa de apatita en la superficie.

En la tabla 1 se pueden observar los resultados de resistencia a la polarización para las muestras de estudio. Encontramos que la superficie de Ti6Al4V sin modificar presenta una resistencia a la polarización de 2,00E+06 Ω/cm² al igual que las superficies de Ti6Al4V anodizadas a 10 y 40 V. Este resultado indica que estas modificaciones no generaron un cambio en la capacidad de transferencia de electrones del material. Sin embargo, estas superficies al ser funcionalizadas con el recubrimiento de fosfato de calcio si presentaron una disminución en su resistencia a la polarización, tomando valores de 2,20E+05 Ω/cm² en promedio. Esta variación se atribuye a la facilidad que tiene el fosfato de calcio a disolverse en el SBF. Por otra parte, las demás superficies disminuyeron sus valores de resistencia a la polarización en relación al sustrato sin modificar, lo cual indica que estas modificaciones superficiales que se realizaron al material lo hacen más susceptible al daño por fluidos corporales. Una de las posibles causas de que las resistencias a la polarización obtenidas para las superficies anodizadas y funcionalizadas sean menores que la del sustrato, se encuentra en las especies presentes en los electrolitos utilizados para cada proceso, ya que contenían agentes corrosivos como lo son el NH₄F y el NaOH respectivamente.

Tabla 1: Valores de la resistencia a la polarización obtenidos para las diferentes muestras de estudio.

Sustrato		Rp (Ω/cm^2)
Desnudo		2,00E+06
Anodizado	10 V	2,00E+06
	20V	7,70E+05
	30V	2,40E+05
	40V	2,00E+06
Funcionalizado con Ca y P	10 V	2,30E+05
	20V	7,00E+04
	30V	6,00E+04
	40V	1,90E+05

En la figura 4 se presentan las curvas de polarización potenciodinámica. En estas curvas se puede observar que los muestras anodizadas (Figura 4a), presentan un potencial de corrosión (E_{corr}) mayor que el sustrato, resultados similares han sido reportados en [26] donde las superficies de Ti6Al4V con nanoestructuras presentaron corrimiento del potencial hacia valores más nobles, de igual manera, este corrimiento se puede asociar a que la capa de TiO_2 protege al material de la degradación en presencia de soluciones que contienen cloruros [27].

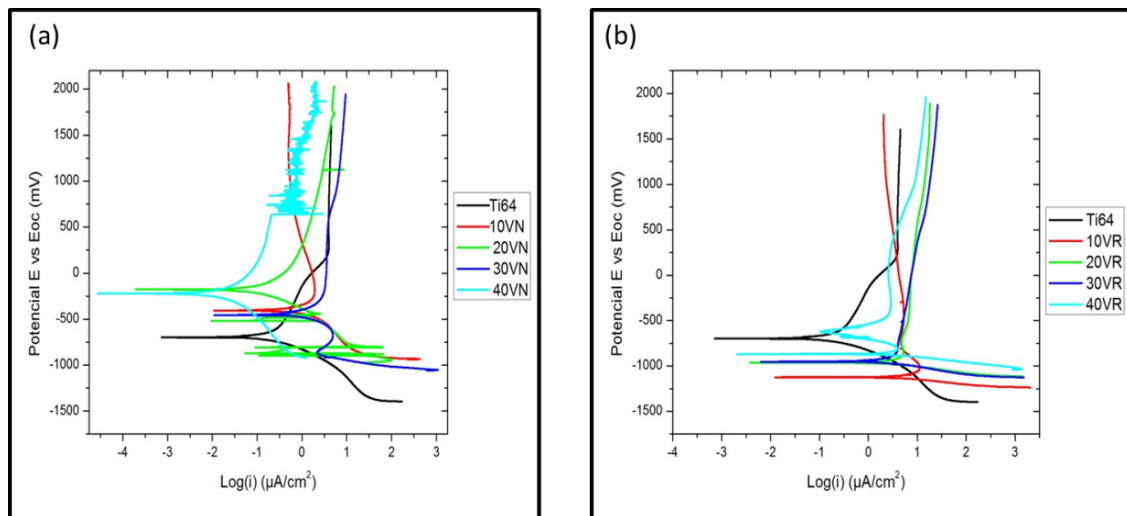


Figura 4: Curvas de polarización potenciodinámicas para los sustratos modificados por (a) anodizado electroquímico y (b) funcionalizados por electrodeposición catódica.

Las muestras anodizadas a 20 y 30 V presentan un cambio del comportamiento de la zona catódica, lo se atribuye a la producción de hidrogeno, este fenómeno se asocia a la reacción de las nanoestructuras con los compuestos del SBF.

Por otra parte, la figura 4b presenta las curvas de polarización obtenidas de las muestras funcionalizadas mediante electrodeposición catódica de fosfato de calcio. En estas curvas se puede observar que el potencial de corrosión es menor para las muestras funcionalizadas. Además, se observa en la zona anódica, por encima de potenciales mayores a 1 mV que la corriente en todas las curvas se tiene a estabilizarse [28].

Tabla 2: Parámetros electroquímicos obtenidos para los sustratos.

Sustrato		E_{CORR} (mV)	V_{CORR} (mV)	I_{CORR} ($\mu A/cm^2$)
Desnudo		-698	0,025	0,079
Anodizado	10 V	-406	0,137	0,427
	20V	-179	0,014	0,044
	30V	-456	0,162	0,505
	40V	-222	0,002	0,006
Funcionalizado con Ca y P	10 V	-1120	1,540	4,812
	20V	-965	0,766	2,394
	30V	-952	0,523	1,634
	40V	-870	0,985	3,078

De los resultados obtenidos en la Tabla 2 se puede observar que la menor velocidad de corrosión (V_{CORR}) se presenta en la muestra anodizada a 40 V, lo cual nos indica que este proceso genera un carácter protector, en comparación con las demás muestras, lo cual concuerda con el valor de la resistencia a la polarización obtenida para esta muestra, la cual aunque no es superior al sustrato, presenta un mejor comportamiento ante los procesos de degradación. Las superficies funcionalizadas por electrodeposición catódica son las que presentan una mayor velocidad de corrosión (V_{CORR}), confirmando lo dicho anteriormente en el análisis de las curvas de la resistencia a la polarización.

4. CONCLUSIONES

Los voltajes trabajados permitieron obtener dos tipos de superficies de TiO₂, nanotubos y nanoporos, los cuales fueron funcionalizados mediante electrodeposición catódica, permitiendo obtener recubrimientos de fosfato de calcio formados por granos y copos. Los cuales favorecen la formación de capas de apatita según los datos obtenidos mediante las pruebas de absorción atómica.

Los resultados obtenidos con la caracterización electroquímica de los sustratos modificados y funcionalizados, indican que la nanoestructura modificada a 40V sería la mejor de las nanoestructuras para trabajar bajo condiciones biológicas, lo cual se justifica, debido a que presentó el potencial de circuito abierto más noble, su R_p fue la misma que la del sustrato y además su velocidad de corrosión fue la menor.

5. AGRADECIMIENTOS

Nuestros más sinceros agradecimientos a COLCIENCIAS, por la financiación de este proyecto bajo el contrato N°780-2011 y al Grupo de Investigaciones en Corrosión (GIC) de la Universidad Industrial de Santander por su constante apoyo y colaboración

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] SÁNCHEZ, L., GUTIÉRREZ-SOLANA, F., ÁLVAREZ, J.A., *et al.* “Estudio de una prótesis de cadera de aleación Ti-6Al-4V con recubrimientos de ti e hidroxiapatita”, En: *Anales de mecánica de la fractura*, v. 16, pp. 500-507, 1999.
- [2] GIL, F.J. Y PLANELL, J.A. “Aplicaciones biomédicas del titanio y sus aleaciones”, *Revista Biomecnica*, <https://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/6814/1/Article04.pdf>, accedido en febrero 2014.
- [3] PEREYRA, M., MÉNDEZ, E., DALCHIELE, A. “Nanotubos de orientación vertical autoensamblados por método electroquímico: síntesis y caracterización”, *Revista Puente*, v. 5, n. 2, pp. 45- 49, 2011.
- [4] TALAVERA JAUME, I. D. *Estudio de la corrosión de una aleación Ti6Al4V utilizada como biomaterial*, Tesis de pregrado, Universidad central de Venezuela, Caracas Venezuela 2007.
- [5] WEI-QIANG, YU., JING, QIU., LING, XU., *et al.* “Corrosion behaviors of TiO₂ nanotube layers on titanium in Hank’s solution”, *Biomedical Materials*, v. 4, n. 6, 2009.
- [6] MATYKINA, E., CONDEA, A., DAMBORENEA, J., *et al.*, “Growth of TiO₂-based nanotubes on Ti-6Al-4V alloy”, *Electrochimica Acta*, v. 56, n.25, pp. 9209– 9218, 2011.

- [7] MINAGAR, S., BERNDT, C. C., WANG, J., *et al.*, “A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces”, *Acta Biomaterialia*, v. 8, pp. 2875–2888, 2012.
- [8] HERBSTTRITH BESSAUER, L. *Desenvolvimento e caracterização de nanotubos de tio2 em implantes de titânio*, Tesis M. Sc. (PGETEMA), Pontificia Universidad Católica de Río Grande do Sul, Porto Alegre Brasil, 2011
- [9] SOBIESZCZYK, S., KLOTZKE, R. “Nanotubular titanium oxide layers for enhancement of bone-implant bonding and bioactivity”, *Advances in material science*, v.11, n. 1, pp. 17-26, 2011.
- [10] KASUGA, T. “Formation of titanium oxide nanotubes using chemical treatments and their characteristic properties”, *Thin solid films*, v. 496, n. 1, pp. 141-145, 2006.
- [11] MACAK, J. M., TSUCHIYA, H., GHIVCOV, A., *et al.*, “TiO₂ nanotubes: self-organized electrochemical formation, properties and applications”, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 11, pp. 3-18. 2007.
- [12] GREGORIO-VÁZQUEZ, L., CUEVAS-ARTEAGA, C., HERNÁNDEZ, G., *et al.*, “Formación de nanoestructuras porosas de TiO₂ mediante la exposición en soluciones de HF-H₂O aplicando la técnica electroquímica de anodización”, *Avances en Ciencias e Ingeniería*, vol. 4, no. 1, pp. 85-95, 2013.
- [13] XIAO, X., LIANG, J., TANG, H., *et al.*, “Preparation and bioactivity of TiO₂ nanotube arrays containing calcium and phosphorus”, *Applied Surface Science*, v.261, pp. 312– 319, 2012.
- [14] RAJAT, K.S., MISRA, M., PARAMGURU, K. “Deposition of calcium phosphate coating on nanotubular anodized titanium”, *Materials Letters*, v. 59, pp. 2137–2141, 2005.
- [15] KAR, A., RAJA, K.S., MISRA, M. “Electrodeposition of hydroxyapatite onto nanotubular TiO₂ for implant applications”, *Surface & Coatings Technology*, v. 201, n.6, pp. 3723–3731, 2006.
- [16] SÁNCHEZ, L. J., FORERO, S. A. *Evaluación de la formación de apatita sobre una superficie biocerámica patronada obtenida por electrodeposición catódica y litografía láser*, Tesis pregrado, Universidad industrial de Santander, facultad de ingeniería físico-químicas, escuela de ingeniería metalúrgica y ciencia de materiales, Bucaramanga, 2013.
- [17] KOKUBO, T., TAKADAMA, H. “How useful is *SBF* in predicting in vivo bone bioactivity?”, *Biomaterials*, v. 27, pp. 2907-2915, 2006.
- [18] GUOZHENG, K., YAWEL, D., YUJEL, L., *et al.*, “Macroscopic and microscopic investigations on uniaxial ratchetting of two phase Ti 6Al 4V Alloy”, *Materials Characterization*, v. 92, pp. 26-35, March 2014.
- [19] CÓRDOBA ROMAN, L.C. “Relación entre microestructura y resistencia a corrosión de la aleación biocompatible Ti6Al4V deformada en caliente”, Universidad nacional de Colombia, Medellin, Tesis de Maestría 2009
- [20] CORDOBA ROMAN, L. C., “Relación entre microestructura y resistencia a corrosión de la aleación biocompatible Ti6Al4V deformada en caliente”, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Tesis de maestría 2009
- [21] GIL, F. J., GINEBRA, P., PLANELL, J. A. “Metales y aleaciones para la substitución de tejidos duros”, *Biomechanica*, v. VII, n. 13, pp. 73-78, 1999.
- [22] PINLIANG, J., JIANHE, L., RAN S., *et al.* “Effect of cotacalcium phosphate modified micro nanostructured titania surfaces on osteoblast response”, *Applied Material and Interfaces*, v. 7, pp. 14384-14396, 2015.
- [23] TSUCHIYA, H., MACAK, J. M., MÜLLER, L., “Hydroxyapatite growth on anodic TiO₂ nanotubes”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 77A, n.3, pp. 534-541, 2006.
- [24] YANQUIN, L., XIANJIN, Y., ZHENDUO, C., *et al.*, “Effect of TiO₂ nanotube morphology on the formation of apatite layer in simulated body fluid”, *Current Nanoscience*, v. 6, pp. 256-261, 2010.
- [25] ROGUSKA, A., PISAREK, M., ANDRZEJCZUK, M., *et al.* “Characterization of a calcium phosphate – TiO₂ nanotube composite layer for biomedical applicatrions”, *Materials Science and Engineering C*, Vol. 31, pp. 906-914, 2011.
- [26] LIU, C. L., WANG, Y. J., WANG, M., *et al.*, “Electrochemical Behaviour of TiO₂ nanotube on titanium in artificial saliva containing bovine serum albumin”, *Corrosion Engineering, Sciencie and Technology*, v. 47, n. 3, pp. 167-169, 2012.
- [27] ROSSI, M., NILSON, T. C., OLIVERA, N. K. K., *et al.*, “Growth and electrochemical stability of self-organized TiO₂ nanotubes on Ti-2 grade and orthopedic Ti6Al4V alloy for biomedical application”, *Materia*, v. 19, n. 1, pp. 53-60, 2014.

[28] GRECU, M., PRODANA, M., CIMPEAN, A. “Enhancing the performance of titanium Surface elaboration of a nanostructure and bioactive coating”, *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, v. 74, n. 2, pp 113-128, 2012.