Universidad Autónoma de Baja California
INSTITUTO DE INGENIERIA
Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

Modificación de Superficies de Ti y la Aleación de Ti_6Al_4V por Anodizado Electroquímico para la Obtención de Nano-Estructuras en Electrolitos Base Agua Súper-Oxidada

Alan Humberto Escamilla Rodríguez

TESIS

Para obtener el grado de
Doctor en Ingeniería

Dr. Benjamín Valdez Salas
Director

Enero 2017

RESUMEN

La presente tesis estudia la influencia en las propiedades morfológicas que aportan las soluciones electrolíticas acuosas base agua súper oxidada (ASO) a bajas concentraciones de Fluoruro de Amonio (NH_4F) (<0.1%) disueltos en solución; para la modificación superficial de titanio puro comercial (Ti) y la aleación de titanio-aluminio-vanadio (Ti_6Al_4V) por el método de anodizado electroquímico, buscando desarrollar capas de nano-estructuras tubulares o nano-tubos (NTs) de óxidos de titanio (TiO_2).

Las modificaciones superficiales de Ti y la aleación Ti_6Al_4V mediante métodos de anodizado electroquímico para la generación de nano-estructuras con TiO_2 requieren del control de parámetros clave para la obtención de características morfológicas especificas deseadas, para nano-estructuras tubulares o NTs, estas características morfológicas son: diámetro interno y diámetro externo (espesor de pared), longitud del NT y densidad de NTs por unidad de área. El correcto control en la generación de estas características morfológicas provee de cualidades específicas a las superficies modificadas otorgando diversas propiedades que pueden ser utilizadas en distintas áreas de aplicación.

El ASO es utilizada ampliamente en la industria médica ya que posee excelentes propiedades como antiséptico y desinfectante. El contenido de especies oxidantes como el Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2) y otros radicales oxidantes formados de distintas especies de hipocloritos le otorgan propiedades que se han reportado ser muy efectivas en el tratamiento de infecciones. El utilizar ASO dentro de la solución electrolítica tiene como objetivo primario el de reducir los tiempos de anodizado y las concentraciones de fluoruros en la solución en la formación de capas de NT.

El objetivo particular es el de obtener NTs de TiO_2 con características específicas en los rangos de los 80 a 100 nano-metros (nm) en diámetro externo promedio, un espesor de pared de 5 a 20 nm, longitudes de 50 a 100 nm y densidades arriba del 90% por centímetro cuadrado (cm^2) en rangos de tiempo cortos de 1 a 30 minutos con potenciales de 5 a 20 V y valores de corriente de 0.5 y 1 Amperes, estimando obtener capas de NTs en los rangos de 1.25 a 1.75 $gr.cm^{-3}$.

DECLARACION DE ORIGINALIDAD.

La principal contribución del presente trabajo de investigación es el análisis de los efectos en la modificación superficial de Ti y la aleación Ti_6Al_4V utilizando electrolitos acuosos base ASO, con el objetivo de hacer crecer capas anódicas gruesas en el rango micrométrico con nano-estructuras de NTs de TiO_2 en tiempos cortos menores a 30 min y bajas concentraciones de NH_4F (<0.1%). Siendo este el primer estudio dirigido a la fabricación y caracterización de NTs sobre la superficie de Ti y la aleación Ti_6Al_4V por el método de oxidación anódica, utilizando un proceso novedoso constituido por electrolitos acuosos base ASO.

DEDICATORIA.

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS.

Agradeciendo primeramente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento de esta investigación en la búsqueda de enriquecer, fortalecer e impulsar el desarrollo científico en México.

Al Dr. Benjamín Valdez Salas, por su valiosa y generosa contribución, guía y estimulo en la realización del presente trabajo de investigación. El compartir su vasta experiencia durante las actividades de investigación favoreció el desarrollo oportuno de las habilidades necesarias para el dominio de los conocimientos necesarios para mi formación integral y la realización de esta Tesis.

Al Dr. Nicola Nedev Radnev, al Dr. Roumen Zlatev Koytchev, al Dr. Mario Alberto Curiel Álvarez y a la Dra. Mónica Carrillo Beltrán por compartir sus conocimientos en el campo de las nano-ciencias y la química, favoreciendo y enriqueciendo el contenido de esta tesis.

Es muy difícil en un proyecto como este dar las gracias a todos los que han contribuido a él. Sin embargo me gustaría expresar una gratitud especial al M.C. Iván Alberto Pulido Banda, al Dr. Manuel Muñoz Gómez, al Ing. León Roberto Rodríguez Vizcarra, al Dr. Alonso Murillo, al Dr. Ernesto Beltrán Partida, a la Dra. Sayuri Kiyota, al Dr. Arias León García, al Dr. Francisco David Mateos Anzaldo, a las Ing. Martha Fernanda Martínez Kelez, Ing. Karen López Torres e Ing. Fernanda Sánchez Hernández, y a la L.D.I. América Lomelí Osuna que de maneras distintas contribuyeron en el enriquecimiento inmedible en la realización del presente trabajo de investigación.

CONTENIDO

RESUMEN 2
DECLARACION DE ORIGINALIDAD. 3
DEDICATORIA. 4
AGRADECIMIENTOS. 5
Lista de Símbolos. 13
Capítulo 1. - Introducción. 15
1.1 Nano-materiales. 17
1.2 Nano-tubos (NTs) de Dióxido de Titanio (TiO_2). 18
1.3 Antecedentes y Revisión de Literatura. 19
1.4 Objetivos del Presente Trabajo de Investigación. 23
1.5 Organización de la Tesis. 25
Capítulo 2. Oxidación Anódica o Anodizado Electroquímico. 26
2.1 Anodizado Electroquímico. 26
2.2 Mecanismos del Crecimiento de la Capa de Oxido. 28
2.3 Factores que afectan la geometría y la composición. 34
2.3.1 Factores para Obtener Arreglos Nano-Tubulares. 36
2.3.2 El Potencial en el Anodizado Electroquímico. 38
2.3.3 Composición Química del Electrolito. 39
2.3.4 Temperatura del Electrolito. 39
2.3.5 Efectos de la Distancia entre el Ánodo y el Cátodo. 40
2.4 Agua Súper Oxidada (ASO). 40
2.3.1 Electrólisis en Soluciones Salinas. 41
Capítulo 3. Síntesis de NTs de TiO_2 por Métodos de Anodizado Electroquímico. 42
3.1 Selección del Método para el Diseño Experimental. 42
3.1.2 Diseño Experimental Metodología Taguchi. 43
3.2 Reactivos para la Generación de Electrolitos Base ASO. 44
3.3 Instrumentos Utilizados en la Caracterización de las Mediciones. 45
2.3.2 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM). 46
2.3.3 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). 48

3.4 Diagrama de Procesos para la Síntesis de Nano-Estructuras de TiO_2. 49
3.5 Configuración para el Proceso de Anodizado Electroquímico. 50
3.5.1 Diseño de Celda Electroquímica para el Proceso de Anodizado. 51
3.5.2. Diseño de Celda para el Proceso de Electrólisis por Corriente Directa. 54
3.5.3. Prototipo 1: Celda para Electrólisis por Corriente Directa. 56
3.5.4. Prototipo 2: Celda para Electrólisis por Corriente Directa. 58
3.5.5. Prototipo 3: Celda para Electrólisis por Corriente Directa. 60
3.6 Preparación de las Muestras de Ti y Ti_6Al_4V. 64
3.6.1 Tratamientos Previos y Posteriores de las Muestras de Ti y Ti_6Al_4V. 65
3.6.2 Preparación de las capas de TiO_2. 65
Capítulo 4. Experimentos y Análisis de Resultados. 66
4.1 Panorama General de Experimentación. 66
4.2 Diseño de Experimentos para Soluciones Electrolíticas y Resultados Previos. 67
4.2.1 Soluciones Electrolíticas Acuosas Base ASO. 67
4.2.2 Resultados Experimentales Previos. 68
4.3 Anodización Electroquímica: Efectos de la Variación en el Tiempo, Ti_6Al_4V. 74
4.4 Anodización Electroquímica: Parámetros Constantes Ti y Ti_6Al_4V. 78
4.4.1 Resultados por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM). 80
4.5 Anodización Electroquímica: Variabilidad Electrolítica Ti y Ti_6Al_4V. 82
4.6 Anodización Electroquímica: Variabilidad en Tiempos Cortos, Ti y Ti_6Al_4V. 93
4.7 Electrolisis por Corriente Directa: Generación de ASO en Laboratorio. 106
4.8 Modificación Superficial con Electrolitos ASO de Laboratorio. 114
4.9 Soluciones Electrolíticas Utilizando ASO de Laboratorio. 114
4.10 Anodizados con Soluciones Electrolíticas Utilizando ASO de Laboratorio. 116
4.11 Análisis de Resultados Electroquímicos con ASO de Laboratorio. 148
Capítulo 5. Conclusiones y Trabajos Futuros. 161
ANEXOS. 170

Figura 1. Cronología de métodos de fabricación de NT base TiO_2 [22]. 19
Figura 2. Esquema general para el anodizado electroquímico. 27
Figura 3. Curva Típica Corriente vs Tiempo. 31
Figura 4. Distribución de la Composición de los NT. 33
Figura 5. Diagrama esquemático de la evolución de nanotubos (TiO_2) en anodización. 37
Figura 6. Microscopio de fuerza atómica (AFM). 46
Figura 7. Diagrama esquemático de la microscopia de fuerza atómica (AFM). 47
Figura 8. Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). 48
Figura 9. Diagrama de flujo general. 49
Figura 10. Esquema Detallado del Arreglo Electroquímico. 50
Figura 11. Celda Electroquímica Modificada. 51
Figura 12. Celda Electroquímica para Anodizado. 53
Figura 13. Electrólisis por Corriente Directa, Esquema General. 54
Figura 14. Prototipo 1: Celda Electroquímica para Electrólisis por Corriente Directa. 56
Figura 15. Prototipo 1: Configuración Final. 57
Figura 16. Prototipo 2: Celda Electroquímica para Electrólisis por Corriente Directa. 58
Figura 17. Prototipo 2: Celda Electroquímica para Electrólisis por Corriente Directa. 59
Figura 18. Prototipo 3: Celda Electroquímica para Electrólisis por Corriente Directa. 60
Figura 19. Características Físicas del Arreglo Final de la Celda para la Generación de ASO. 61
Figura 20. Diagrama Detallado para la Generación de ASO. 62
Figura 21. Prototipo 3: Celda Electroquímica para Electrólisis por Corriente Directa. 63
Figura 22. Material base muestras de Ti y Ti_6Al_4V. 64
Figura 23. Muestra M1, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 1 min a 20V (SEM y EDX). 75
Figura 24. Muestra M2, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 5min a 20V (SEM y EDX). 76
Figura 25. Muestra M3, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 10min a 20V (SEM y EDX). 77
Figura 26. Muestra M4, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 10min a 20V (SEM). 78
Figura 27. Muestra M5, aleación Ti, solución 2, 10min a 20V (SEM). 79
Figura 28. Muestra M4, aleación Ti_6Al_4V, rugosidad promedio 200 a 300 nm (AFM). 80
Figura 29. Muestra M5, aleación Ti, rugosidad promedio 200 a 300 nm (AFM). 81
Figura 30. Muestra M6, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 5min a 5V (SEM). 83
Figura 31. Muestra M6, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 5min a 5V (EDX). 84
Figura 32. Muestra M7, aleación $Ti6_Al_4V$, solución 10, 5min a 5V (SEM). 85
Figura 33. Muestra M7, aleación Ti_6Al_4V, solución 10, 5min a 5V (EDX). 86
Figura 34. Muestra M8, aleación $Ti6_Al_4V$, solución 11, 5min a 5V (SEM). 87
Figura 35. Muestra M8, aleación Ti_6Al_4V, solución 11, 5min a 5V (EDX). 88
Figura 36. Muestra M9, aleación $Ti6_Al_4V$, solución 12, 5min a 5V (SEM). 89
Figura 1- 37. Muestra M9, aleación Ti_6Al_4V, solución 12, 5min a 5V (EDX). 90
Figura 38. Muestra M10, aleación $Ti6_Al_4V$, solución 13, 5min a 5V (SEM). 91
Figura 39. Muestra M10, aleación Ti_6Al_4V, solución 13, 5min a 5V (EDX). 92
Figura 1- 40. Muestra M11, aleación $Ti6_Al_4V$, solución 2, 10min a 20V (SEM). 94
Figura 1- 41. Muestra M11, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 10min a 20V (EDX). 95
Figura 1- 42. Muestra M12, Ti, solución 2, 0.17 min a 20V (SEM). 96

Figura 1- 43. Muestra M12, Ti, solución 2, 0.17min a 20V (EDX). 97
Figura 1- 44. Muestra M13, Ti, solución 2, 0.5min a 20V (SEM). 98
Figura 1- 45. Muestra M13, Ti, solución 2, 0.5min a 20V (EDX). 99
Figura 1- 46. Muestra M14, Ti, solución 2, 1min a 20V (SEM). 100
Figura 1- 47. Muestra M14, Ti, solución 2, 1min a 20V (EDX). 101
Figura 1- 48. Muestra M15, Ti, solución 2, 2min a 20V (SEM). 102
Figura 1- 49. Muestra M15, Ti, solución 2, 2min a 20V (EDX). 103
Figura 1- 50. Muestra M16, Ti, solución 2, 3min a 20V (SEM). 104
Figura 1- 51. Muestra M17, Ti, blanco (SEM y EDX). 105
Figura 52. Muestra M18, Ti_6Al_4V, solución 2, 10min a 20V (SEM). 116
Figura 53. Muestra M19, Ti_6Al_4V, solución 2, 10min a 20V (SEM). 118
Figura 54. Muestra M19, Ti_6Al_4V, solución 2, 10min a 20V (AFM). 119
Figura 55. Muestra M20, Ti_6Al_4V, solución 2, 5min a 20V (SEM). 120
Figura 56. Muestra M21, Ti_6Al_4V, solución 6, 5min a 20V (SEM). 121
Figura 57. Muestra M21, Ti_6Al_4V, solución 6, 5min a 20V (AFM). 122
Figura 58. Muestra M22, Ti_6Al_4V, solución 6, 10min a 20V (SEM). 123
Figura 59. Muestra M23, Ti_6Al_4V, solución 6, 20min a 15V (SEM). 124
Figura 60. Muestra M24, Ti_6Al_4V, solución 6, 20min a 20V (SEM). 125
Figura 61. Muestra M25, Ti_6Al_4V, solución 6, 20min a 10V (SEM). 126
Figura 62. Muestra M26, Ti_6Al_4V, solución 6, 10min a 10V (SEM). 127
Figura 63. Muestra M27, Ti_6Al_4V, solución 6, 15min a 5V (SEM). 128
Figura 64. Muestra M28, Ti_6Al_4V, solución 6, 15min a 10V (SEM). 129
Figura 65. Muestra M29, Ti_6Al_4V, solución 6, 15min a 10V (SEM). 130
Figura 66. Muestra M30, Ti_6Al_4V, solución 6, 20min a 5V (SEM). 131
Figura 67. Muestra M31, Ti_6Al_4V, solución 6, 20min a 15V (SEM). 132
Figura 68. Muestra M32, Ti_6Al_4V, Blanco (SEM). 133
Figura 69. Muestra M32, Ti_6Al_4V, Blanco (AFM). 134
Figura 70. Muestra M33, Ti_6Al_4V, solución 10, 20min a 20V (SEM). 135
Figura 71. Muestra M34, Ti_6Al_4V, solución 10, 20/5min a 15-20V (SEM). 136
Figura 72. Muestra M35, Ti_6Al_4V, solución 10, 20/5min a 10-15V (SEM). 137
Figura 73. Muestra M36, Ti_6Al_4V, solución 10, 20/10min a 15-20V (SEM). 138
Figura 74. Muestra M37, Ti_6Al_4V, solución 10, 20/10min a 10-15V (SEM). 139
Figura 75. Muestra M38, Ti_6Al_4V, solución 10, 40min a 20V (SEM). 140
Figura 76. Muestra M39, Ti_6Al_4V, solución 10, 40min a 15V (SEM). 141
Figura 77. Muestra M40, Ti_6Al_4V, solución 10, 60min a 20V (SEM). 142
Figura 78. Muestra M41, Ti_6Al_4V, solución 10, 60min a 15V (SEM). 143
Figura 79. Muestra M42, Ti_6Al_4V, solución 10, 60/10min a 15-20V (SEM). 144
Figura 80. Muestra M43, Ti_6Al_4V, solución 10, 60/10min a 10-15V (SEM). 145
Figura 81. Muestra M44, Ti_6Al_4V, solución 10, 40/10min a 10-15V (SEM). 146
Figura 82. Muestra M45, Ti_6Al_4V, solución 10, 40/10min a 15-20V (SEM). 147

Tabla 1. Composición del agua súper oxidada Microdacyn®. 44
Tabla 2. Composición del agua súper oxidada comercial (Microdacyn60®). 44
Tabla 3. Valores del agua súper oxidada comercial (Microdacyn60®). 45
Tabla 4. Definición de niveles y factores [15]**.** 67
Tabla 5. Tabla de Soluciones Propuestas [15]**.** 68
Tabla 6. Factores dependientes e independientes, arreglo L27 para 10 factores 3 niveles [15]**.** 69
Tabla 7. Media de los efectos principales para la obtención de NT. 70
Tabla 8. Interacciones de las medias para la obtención de NT. 71
Tabla 9. Grafica de probabilidad para la obtención de NT. 72
Tabla 10. Resumen de ensayos óptimos para la obtención de NT. 73
Tabla 11. Soluciones óptimas para la obtención de NT utilizando ASO. 73
Tabla 12. Experimentos: variación en el tiempo. 74
Tabla 13. Muestra 1: variación en el tiempo. 75
Tabla 14. Muestra 2: variación en el tiempo. 76
Tabla 15. Muestra 3: variación en el tiempo. 77
Tabla 16. Muestra 4: condiciones constantes (Ti_6Al_4V). 78
Tabla 17. Muestra 5: condiciones constantes (Ti). 79
Tabla 18. Soluciones electrolíticas variabilidad de parámetros. 82
Tabla 19. Muestra 6: variabilidad de parámetros (Ti_6Al_4V). 83
Tabla 20. Muestra 7: variabilidad de parámetros (Ti_6Al_4V). 85
Tabla 21. Muestra 8: variabilidad de parámetros (Ti_6Al_4V). 87
Tabla 22. Muestra 9: variabilidad de parámetros (Ti_6Al_4V). 89
Tabla 23. Muestra 10: variabilidad de parámetros (Ti_6Al_4V). 91
Tabla 24. Resultados en la variabilidad de parámetros (Ti_6Al_4V). 93
Tabla 25. Variabilidad en el Tiempo Ti y Ti_6Al_4V. 94
Tabla 26. Muestra 11: variabilidad en el Tiempo (Ti_6Al_4V). 94
Tabla 27. Muestra 12: variabilidad en el Tiempo (Ti). 96
Tabla 28. Muestra 13: variabilidad en el Tiempo (Ti). 98
Tabla 29. Muestra 14: variabilidad en el Tiempo (Ti). 100
Tabla 30. Muestra 15: variabilidad en el Tiempo (Ti). 102
Tabla 31. Muestra 16: variabilidad en el Tiempo (Ti). 104
Tabla 32. Muestra 17: variabilidad en el Tiempo (Ti). 105
Tabla 33. Definición de niveles y factores para la electrólisis por corriente directa. 107
Tabla 34. Factores dependientes e independientes, arreglo L12 para 10 factores a 2 niveles. 107
Tabla 35. Valores del ASO Casero (15min). 108
Tabla 36. Valores de ASO de Laboratorio (30min). 109
Tabla 37. Valores de ASO de Laboratorio (45min). 109
Tabla 38. Valores de ASO de Laboratorio (60min). 109
Tabla 39. Valores Medidos vs Valores Esperados (Potencial 12V - Tiempo 60min). 110
Tabla 40. Valores Medidos vs Valores Esperados (Potencial Rampas 12, 15 y 30V - Tiempo 90min). . 110
Tabla 41. Valores Medidos vs Valores Esperados (Potencial 30V - Tiempo 90min). 110
Tabla 42. Valores Medidos vs Valores Esperados (Potencial 30V – Tiempo 60 y 90min). 111

Tabla 43. Valores Medidos al Día Siguiente (24hr - Potencial 30V - Tiempo 90min). 111
Tabla 44. Mezclas (Proporción A1000/C800 y A650/C900). 112
Tabla 45. Valores Medidos (Potencial 30V - Tiempo 90min). 112
Tabla 46. Valores Medidos (Potencial 30V - Tiempo 30min). 112
Tabla 47. Valores Medidos (Potencial 30V - Tiempo 20min). 113
Tabla 48. Valores Medidos (Potencial 30V - Tiempo 10min). 113
Tabla 49. Tabla de Soluciones Propuestas para ASO Laboratorio. 114
Tabla 50. Resumen General de Resultados: Soluciones con ASO de Laboratorio. 115
Tabla 51. Muestra M18: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 116
Tabla 52. Muestra M19: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 118
Tabla 53. Muestra M20: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 120
Tabla 54. Muestra M21: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 121
Tabla 55. Muestra M22: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 123
Tabla 56. Muestra M23: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 124
Tabla 57. Muestra M24: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 125
Tabla 58. Muestra M25: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 126
Tabla 59. Muestra M26: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 127
Tabla 60. Muestra M27: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 128
Tabla 61. Muestra M28: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 129
Tabla 62. Muestra M29: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 130
Tabla 63. Muestra M30: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 131
Tabla 64. Muestra M31: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 132
Tabla 65. Muestra M32: Blanco Ti_6Al_4V. 133
Tabla 66. Muestra M30: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 135
Tabla 67. Muestra M34: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 136
Tabla 68. Muestra M35: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 137
Tabla 69. Muestra M36: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 138
Tabla 70. Muestra M37: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 139
Tabla 71. Muestra M38: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 140
Tabla 72. Muestra M39: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 141
Tabla 73. Muestra M40: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 142
Tabla 74. Muestra M41: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 143
Tabla 75. Muestra M42: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 144
Tabla 76. Muestra M43: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 145
Tabla 77. Muestra M44: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 146
Tabla 78. Muestra M45: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio. 147
Tabla 79. Media de efectos principales experimentos con ASO de Laboratorio. 148
Tabla 80. Media de efectos principales señal/ruido experimentos con ASO de Laboratorio. 149
Tabla 81. Interacciones de medias: diámetro, experimentos con ASO de laboratorio. 150
Tabla 82. Interacciones medias: longitud, experimentos de ASO de laboratorio. 151
Tabla 83. Interacciones de medias: espesor de pared, experimentos con ASO de laboratorio. 152
Tabla 84. Interacciones de medias: densidad, experimentos con ASO de laboratorio. 153

Tabla 85. Análisis de Medias: Diámetro, experimentos con ASO de laboratorio. 154
Tabla 86. Análisis de Medias: Longitud, experimentos con ASO de laboratorio. 154
Tabla 87. Análisis de Medias: Espesor, experimentos con ASO de laboratorio. 155
Tabla 88.Varianza: Diámetro, experimentos con ASO de laboratorio. 156
Tabla 89. Varianza: Longitud, experimentos con ASO de laboratorio. 156
Tabla 90. Varianza: Espesor, experimentos con ASO de laboratorio. 157
Tabla 91. Varianza: Densidad, experimentos con ASO de laboratorio. 157
Tabla 92. Probabilidad: Diámetro, experimentos con ASO de laboratorio. 158
Tabla 93. Probabilidad: Longitud, experimentos con ASO de laboratorio. 159
Tabla 94. Probabilidad: Diámetro, experimentos con ASO de laboratorio. 159
Tabla 95. Probabilidad: Densidad, experimentos con ASO de laboratorio. 160

Lista de Símbolos.

Los textos especializados en un tema muchas veces fuerzan a que se utilicen subíndices y superíndices, así como también sufijos y prefijos o abreviaciones. A continuación presentamos de manera breve y útil una lista de los utilizados en la escritura de esta Tesis.

Ti	Titanio puro comercial o Titanio grado 2 (99% pureza).
Ti_6Al_4V	Aleación de Titanio-Aluminio-Vanadio.
ASO	Agua Súper Oxidada.
NH_4F	Fluoruro de Amonio.
NT	Nano estructuras tubulares/Nano tubos.
TiO_2	Óxidos de Titanio.
H_2O_2	Peróxido de Hidrogeno.
CONACyT	Centro Nacional de Ciencia y Tecnología.
Al	Aluminio.
Al_2O_3	Óxidos de Alúmina.
HF	Fluoruro de Hidrogeno.
KF	Fluoruro de Potasio.
NaF	Fluoruro de Sodio.
EG	Etilenglicol.
FA	Formaldehidos.
HCl	Ácido Clorhídrico.
nm	Nano metros.
NaOH	Hidróxido de Sodio.
C	Escala térmica, Celsius.
$[(NaH_4)_2SO_4]$	Sulfato de amonio.
NaCl	Cloruro de sodio.
SAEW	Siglas en inglés: *Strongly Acidic Electrolyzed Water*.
AC	Concentraciones de Cloro.
ORP	Potencial de Oxido Reducción.
pH	Acides.

ppm	Partes por millón.
AFM	Siglas en inglés: Microscopia de Fuerza Atómica.
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido.
XRD	Difracción de Rayos X.
EDX	Espectroscopia por dispersión de rayos X.
HOCl	Ácido Hipocloroso.
OCl^-	Hipocloritos.
NaCl	Cloruro de Sodio.
O_2	Oxígeno.
H_2	Hidrogeno.
Cl_2	Cloro.
H^+	Cationes de Hidrogeno.
$*O_2^-$,HO_2	Cantidades correspondientes de superoxidos.
O_3	Ozono.
*OCl, $*HO^-$	Formas Activas de Especies de Oxigeno.
OM	Óxidos Metálicos.

Capítulo 1. - Introducción.

"Llegara una época en la que una investigación diligente y prolongada sacara a la luz cosas que hoy están ocultas. La vida de una sola persona, aunque estuviera toda ella dedicada a la ciencia, sería insuficiente para investigar una materia tan vasta... Por lo tanto este conocimiento solo se podrá desarrollar a lo largo de sucesivas edades. Llegará una época en la que nuestros descendientes se asombraran de que ignorábamos cosas que para ellos son tan claras… Muchos son los descubrimientos reservados para las épocas futuras, cuando se haya borrado el recuerdo de nosotros. Nuestro universo sería una cosa muy limitada si no ofreciera a cada época algo que investigar… La naturaleza no revela sus misterios de una vez y para siempre."

SENECA, Cuestiones naturales, libro 7, siglo primero.

En las últimas décadas el estudio, análisis, comprensión, optimización de técnicas, métodos para la generación y manipulación de nano-estructuras ordenadas con características morfológicas específicas ha venido creciendo gracias a los distintos avances de la tecnología en sus diferentes disciplinas; este crecimiento se debe al potencial que existe en un amplio número de aplicaciones, que exigen tanto evolución, como innovación tecnológica.

Desde la antigüedad las nano-estructuras han otorgado propiedades únicas a los distintos materiales que las poseen, especialmente estas nano-estructuras han formado parte de la mayoría de las aleaciones de metales ferrosos y no ferrosos que son sometidos a distintos métodos de manufactura. El estudio y dominio de las técnicas para la generación de estas nano-estructuras con un orden controlado a voluntad no se había desarrollado en potencia debido a las dificultades y limitantes de la época en la observación y manipulación a esta escala. Recordemos el significado de las escalas pequeñas más allá del centímetro o el milímetro. Un nano-metro es: $10e^{-9}$ siendo el exponente el número de ceros después del punto, 0.000 000 001.

Los primeros estudios sobre capas de óxidos organizadas con características morfológicas específicas fueron realizados sobre superficies de aluminio (Al), formando capas de óxidos de Alúmina (Al_2O_3) por métodos de oxidación anódica. Los primeros reportes sobre estos estudios se pueden encontrar con fechas de más de 50 años de antigüedad (1960-1965) [1], Masuda y Fukuda [2] reportaron que bajo condiciones específicas particulares se puede lograr el crecimiento de óxidos porosos organizados y distribuidos sobre la superficie del material. Este descubrimiento inicio una serie de investigaciones en el tema que llevaron al descubrimiento de la variedad de nano-estructuras que conocemos hoy en día en distintos materiales y aleaciones.

Las principales razones en la utilización de los métodos electroquímicos de polarización anódica son gracias a su relativa sencillez, bajo costo y efectividad, razones que han motivado los esfuerzos para aplicar esta técnica en la modificación superficial de distintos materiales. Desde el redescubrimiento de las nano-estructuras, específicamente los NTs de carbón por Iijima [3], se han venido desarrollando estudios en otros materiales inorgánicos, con especial interés en óxidos o sulfatos metálicos, con la intensión de explorar sus propiedades específicas. Los primeros reportes donde se presentan arreglos de NTs de TiO_2 por métodos de anodizado electroquímico sobre superficies de Ti en electrolitos acuosos con contenidos de fluoruros de hidrogeno (HF), fueron reportados por Gong y colaboradores [4], considerados estos de primera generación. La síntesis de nanotubos de segunda generación son reportados por Cai y colaboradores [5] ajustando el pH de los electrolitos acuosos base fluoruro de potasio (KF) y fluoruro sódico (NaF) lograron reducir la disolución química de la capa de óxido logrando incrementar las longitudes de los NTs por varios micrones. Reportes utilizando electrolitos orgánicos conteniendo etilenglicol (EG) di-etilenglicol, formaldehidos (FA) y otros compuestos orgánicos en combinación con iones fluoruro de distintos compuestos en la solución electrolítica, son considerados de tercera generación [6]. Allam y colaboradores fabricaron arreglos de NTs anodizando Ti utilizando especies sin contenidos de fluoruros con electrolitos base ácido clorhídrico (HCl) [7] y HCl en combinación con H_2O_2 [8] llamados estos de cuarta generación.

El Ti y la aleación Ti_6Al_4V son ampliamente utilizadas como bio-materiales, implantes dentales y ortopédicos ya que ofrecen excelentes virtudes y propiedades, como su alta resistencia a la tensión, bio-compatibilidad, baja toxicidad y una excelente resistencia a la corrosión favoreciendo su utilización en el campo médico [9] [10] [11], siendo la aleación de Ti_6Al_4V la más utilizada como bio-material, ya que esta aleación ofrece propiedades químicas, físicas y mecánicas superiores a las del Ti [12]. De entre la mayoría de los óxidos de transición de metales, los TiO_2 son los más estudiados (con más de 40,000 publicaciones en los últimos 10 años), lo que los convierte en uno de los compuestos inorgánicos más estudiados en el campo de la ciencia de materiales. Diferentes estudios han demostrado que las propiedades de los TiO_2 son amigables en su interacción con el medio ambiente, además de poseer propiedades anticorrosivas y una excelente bio-compatibilidad [13]; favoreciendo el interés en el estudio de sus propiedades.

1.1 Nano-materiales.

Se considera nano-material, al compuesto cuyas dimensiones existen específicamente entre los valores de 1 a 100 nano-metros (nm), y si al menos una de sus propiedades es única en diferencia con el material base. Los nanomateriales se clasifican principalmente de acuerdo a sus características geométricas dimensionales en coordenadas espaciales X, Y y Z, y por su composición química con características del material base [14]. Los nano-materiales han sido adoptados por nuestro lenguaje tomando una definición específica refiriéndose: “a materiales solidos que en su interior o en su superficie poseen estructuras a nano-escala” [15]. La clasificación más frecuentemente utilizada es la de dimensión de orden cero, 0D (nano-punto), 1D (NT, nano-alambre, nano-cilindro), 2D (nano-lamina), y la clasificación 3D que es el material base compuesto por nano-partículas [16].

Actualmente los nano-materiales se pueden encontrar en una gran variedad de formas incluyendo esferas simétricas, tubos cilíndricos, fibras o poros tubulares. Las formas alongadas de geometrías nano-tubulares (tubos cilíndricos), se define por la relación que existe entre las dos dimensiones características de la estructura, en este caso en particular de forma de NT: el diámetro y la longitud [15].

1.2 Nano-tubos (NTs) de Dióxido de Titanio (TiO_2).

Los NTs de TiO_2 se pueden describir como las partículas de TiO_2 en arreglos estructurados en una dirección axial en particular, tomando forma cilíndrica, donde los átomos en uno o en sus dos extremos cierran el tubo. De forma general esta característica se encuentra más común mente con solo uno de sus extremos cerrado, mientras el otro está abierto. Estas morfologías maximizan el área superficial e incrementan su rugosidad, efectos que contribuyen a cambios en las reacciones químicas e interacciones físicas entre la superficie y el medio que lo rodea, revelando resultados novedosos entre estas interacciones [13].

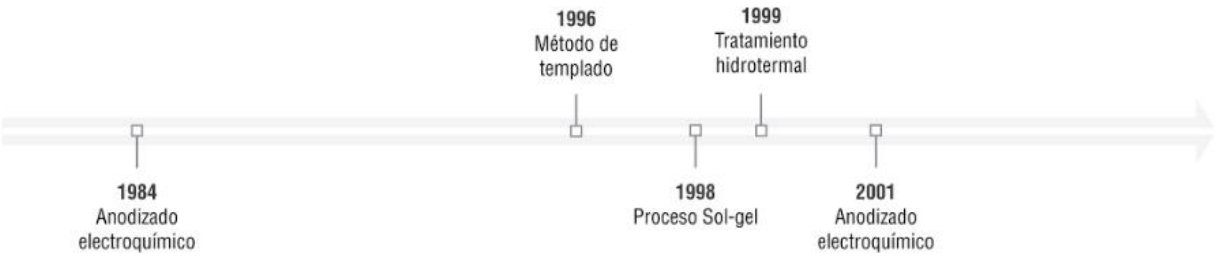
Es muy importante hacer mención a la distinción entre nano-poros y nano-tubos que se ha venido dando en diferentes publicaciones sobre el tema [9] [17] [11] [18] [15] [19] [20], ya que muchos de los autores intercambian estas palabras al concepto que las define siendo esta mecánica no estrictamente justificada y se considerara pura semántica.

Algunas de las áreas donde la aplicación de los TiO_2 han tenido un impacto significativo gracias a su versatilidad, pero que no están limitadas a, son: Industria energética, energía solar; se utilizan para la mejora de la eficiencia de reacciones fotovoltaicas en paneles solares, industria electrónica; en el desarrollo de súper-capacitores y sensores; Industria ambiental, en los sistemas purificadores de agua para la prevención de contaminantes, bacterias y como purificadores de aire; industria médica; dispositivos de liberación de medicamentos controlados, membranas de bio-filtrado o filtrado molecular, así como en la regeneración de células óseas y tejido [21]. Gracias a las múltiples aplicaciones que estas nano-estructuras pueden llegar a tener, los procesos para su fabricación deben ser adecuados para su reproducción y producción a nivel industrial, por esto la gran importancia en la investigación de métodos simples, reproducibles y de bajo costo [15].

1.3 Antecedentes y Revisión de Literatura.

En las últimas décadas se han logrado grandes avances y descubrimientos en el tema de los nano-materiales, específicamente en el área de los TiO_2, su preparación, síntesis, modificación y aplicación es de nuestro especial interés; el presente trabajo tiene el enfoque en el desarrollo de estos temas.

La **Figura 1** muestra un esquema general aproximado de la cronología de los distintos métodos utilizados en la fabricación de NT base TiO_2 de las últimas décadas por distintas áreas de investigación.



Método	Ventaja	Desventaja	Características de los Nanotubos
Templado	La morfología de Los nanotubos puede ser controlada por el templado	El proceso consta de muchos pasos y un cuidado especial tiene que ser tomado para proteger la morfología del tubo durante la fabricación	Arreglo matricial (forma de polvo)
Anodizado	Alineación directamente relacionada con el sustrato metálico Posibilidad de aplicar en áreas grandes y variedad de formas (ej. implantes)	La producción en masa puede ser limitada para algunas recetas específicas El equipo para morfologías específicas puede ser costoso	Orden y orientación de arreglo matricial alineado directamente sobre el substrato metálico
Hidrotermal	Método sencillo con facilidad para incrementar los atributos de nanotubos de titanio con otro dopaje, etc.	Reacción experimental prolongada Dificultad para lograr un tamaño uniforme de las estructuras nanotubulares	Alineación aleatoria (forma de polvo)

Figura 1. Cronología de métodos de fabricación de NT base TiO_2 *[22]***.**

En 1972, Fujishima y Honda descubrieron el método de separación foto-catalítica del agua sobre un electrodo de TiO_2 bajo luz ultravioleta (UV) [19] [14]. Desde entonces se han hecho grandes intentos por desarrollar distintos tipos de capaz de TiO_2, por distintos métodos gracias a la gran versatilidad en distintas áreas de aplicación.

Los primeros trabajos documentados sobre capas organizadas de TiO_2 fueron hechos a principio de los 90's, cuando en 1991, Zwilling y colaboradores [23] [14] reportaron capas de NT de TiO_2 sobre la superficie anodizada con electrolitos base fluoruro. Trabajos subsecuentes reportaron en 1999, la obtención de capas porosas de TiO_2 sintetizadas sobre láminas de Ti por el método de anodizado electroquímico en soluciones electrolíticas acidas con contenidos de ácido fluorhídrico (HF) [24]. Desafortunadamente los trabajos originales de estos autores no fueron propiamente referenciados. Sin embargo, estos primeros trabajos hicieron que muchos otros investigadores pusieran especial atención en este campo, ya que el método de anodizado electroquímico abre muchos caminos para la generación de nano-estructuras compactas bien organizadas con distintas morfologías sobre superficies de distintos materiales [13].

Una década después Gong y colaboradores [25] lograron sintetizar arreglos de capas de NTs de TiO_2 bajo el método de anodizado electroquímico sobre láminas de Ti utilizando electrolitos acuosos con contenidos de HF disuelto en solución, obteniendo estas capas de NT directamente sobre el sustrato de Ti, orientados en la misma dirección perpendicular a la superficie del electrodo, formando arquitecturas tubulares muy bien ordenadas [14].

En el 2001 Dawei Gong y colaboradores [26] fabricaron capas de NTs por el método de anodizado electroquímico de láminas de titanio en soluciones acuosas conteniendo 0.5 a 3.5 % de agua en la solución con HF. Estos tubos estaban muy bien alineados y con una densidad por área uniforme sobre toda la superficie. Con la sección superior del tubo abierta y la sección inferior cerrada, formando una barrera similar a la de los obtenidos en aleaciones de aluminio. El diámetro promedio de estos tubos se encontraba en los rangos de los 25 a 65nm, lográndolos con el incremento del voltaje, mientras que la longitud del NT se encontró ser independiente del tiempo de anodizado [14].

En el 2003 Oomman K. Varghese y colaboradores [27] utilizaron el método de anodizado electroquímico variando el voltaje de forma lineal de 10 a 23 V, en rangos dependientes del tiempo de 0.43 a 2 V/min, logrando capas cónicas de NTs con la sección superior cubierta. Esto se logró sobre una lámina de Ti en 0.5% de HF, este método logro incrementar el diámetro del nanotubo de forma lineal a medida que el voltaje se incrementaba, con resultados de NTs aproximadamente de 500 nm de longitud. La evidencia provista por las imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido del sustrato de Ti durante las primeras etapas del proceso, llevaron a la propuesta de las variaciones del voltaje como mecanismos de crecimiento de capas de óxido [14].

En el 2005 Seung-Han y colaboradores [28] lograron sintetizar arreglos de NT de TiO_2 con soluciones electrolíticas base Hidróxido de Sodio (NaOH), esto con el propósito de hacer la superficie bio-activa e inducir el crecimiento de hidroxiapatita dentro de un ambiente de simulación de fluidos del organismo (solución de Hanks). Las nano-estructuras asociadas podrían ser utilizadas en implantes ortopédicos y dentales, así como para algunas aplicaciones en sensores biológicos [14].

En el 2007 V. Vega y colaboradores [29] sintetizaron NTs de TiO_2 por métodos de anodización electroquímica con corriente directa, variando la influencia de la temperatura del medio durante la anodización, variando los rangos de temperatura entre los valores de 2 C a 24 C, sobre la estructura y morfología de la formación de la capa de óxido nano-porosa, así como las concentraciones de contenidos de HF en conjunto con otros ácidos en la mezcla electrolítica; logrando obtener capas de NTs de TiO_2 en los rangos de tamaño de diámetro que van desde los 50 hasta los 100nm, con espesores de pared de 20-60nm y 300nm de longitud, verticalmente orientados y distribuidos sobre el sustrato de Ti, paralelos y alineados cada tubo de manera uniforme sobre la superficie de la muestra [14].

En el 2008 Hua-Yan Si y colaboradores [30], presentaron estudios realizados sobre los efectos en la morfología de los óxidos al variar los voltajes anódicos. Las capas de NTs de TiO_2 sintetizados por métodos de anodizado electroquímico utilizando electrolitos ácidos base HF y Cromo, mostraron un aumento en su humectabilidad y su rugosidad con el incremento de los voltajes. Demostrando que el control del crecimiento de la capa superficial se puede lograr gracias al control de la composición química del electrolito y el incremento en los voltajes de anodizado aumentando o disminuyendo la humectabilidad de la capa de óxido. Estos estudios demostraron de manera directa la importancia en la estrategia al momento de preparar capas de TiO_2 con características específicas, enfatizando la importancia del entendimiento de la relación entre la morfología deseada, las propiedades del electrolito, el voltaje utilizado y la corriente que fluye a través de él. [14].

En el 2009 Michael y colaboradores [31] lograron sintetizar distintas capas de TiO_2 utilizando soluciones de electrolitos acuosos libres de contenidos de HF, estos electrolitos estaban compuestos por 1% en contenido de agua y Sulfato de Amonio [$(NH_4)_2SO_4$] más 0.5% en contenido de agua de NH_4F, utilizando electrodo de platino como cátodo en la celda electroquímica [14].

En el 2010 Hun Park y colaboradores [20] estudiaron las morfologías de los arreglos de NTs de TiO_2 fabricados por el método de anodizado electroquímico con electrolitos orgánicos base EG con contenidos de 0.3% de NH_4F a una temperatura de 30 C. Su longitud, tamaño de poro, espesor de pared y diámetro del NT, fueron evaluados por microscopia de emisión de barrido de electrones, rayos X y espectroscopia foto electrónica [14].

En el 2011 S. Sreekantan y colaboradores [32] formaron capas de NTs de TiO_2 sobre láminas de Ti por el método de anodizado electroquímico, con un arreglo estándar de 2 electrodos a baño de electrolito, constituido por EG y 5% de NH_4F en solución. El pH de la solución era de aproximadamente de 7 y el voltaje aplicado fue de 60 V. Las observaciones mostraron que tales condiciones en el proceso de anodizado permitían que con solo la adición de 1% de agua en solución era posible obtener capas de NTs de TiO_2 perfectamente formados con una excelente densidad por cm^2 sobre la superficie del metal, con dimensiones aproximadas de 18.5 micrometros de longitud [14].

Estudios más recientes confirman que los rangos específicos de tamaño de poro y longitud de NT otorgan propiedades de bio-compatibilidad especificas en términos de su morfología y topografía sobre las superficies de Ti y aleaciones de titanio modificadas con TiO_2 por el método de anodizado electroquímico; es de mucha importancia para el entendimiento de los procesos *in vivo* de los implantes las interacciones con las células y tejidos del organismo, estos estudios han demostrado la gran importancia del tamaño de poro y longitud de los NTs de TiO_2, ya que estas características afectan directamente la adhesión, extensión, crecimiento y diferenciación de células [33]. Se ha demostrado que el tamaño de poro del NT de TiO_2 que más estimula el crecimiento celular se encuentra en los rangos de alrededor de los 80 nm, mientras que tamaños de poro de aproximadamente 100 nm llevan a incrementar drásticamente la muerte de estas células debido a las características especiales de la morfología [15].

Es necesario incrementar el estudio de las estructuras de NTs de TiO_2 para su uso como materiales en biotecnología ya que se requiere de una mejor comprensión de las propiedades de toxicidad hacia las células. Métodos en el mejoramiento en el relleno de los nano-poros con fármacos y con moléculas bio-activas pueden proveer de información significativa para el desarrollo de sistemas para su liberación controlada en organismos [17] [15].

1.4 Objetivos del Presente Trabajo de Investigación.

Las superficies de materiales nano-estructurados pueden proveer propiedades físicas y químicas que asemejen la estructura nativa de un organismo vivo, ofreciendo un sustrato ideal para soportar la regeneración de tejido y otras células sobre su superficie, mientras ayuda a la disminución de la viabilidad bactericida ya que interfiere negativamente con las actividades metabólicas y la integridad de membranas de algunas bacterias [15].

Uno de los factores principales en la falla clínica del implante es la integración incompleta con el hueso de sus alrededores (óseo-integración) y el cartílago con el material implantado [34].Las capas de NT de TiO_2 formadas por métodos de anodizado electroquímico sobre Ti y la aleación Ti_6Al_4V han demostrado mejorar la adhesión y funcionamiento de osteoblastos cuando se comparan con materiales no anodizados. Sin embargo los implantes base Ti y aleaciones ocasionalmente pierden sujeción y fallan [35]. Motivo concluyente para investigar la modificación superficial con nano-estructuras, buscando el mejoramiento superficial de interface y de la óseo-integración con el material implantado, disminuyendo las posibilidades de falla a largo plazo [36].

El ASO es ampliamente recomendada para la esterilización y desinfección de implantes ortopédicos y dentales ya que no altera el comportamiento de la superficie en contacto con las células de tejido vivo [8], siendo la principal contribución del presente trabajo de investigación, el análisis de los efectos en el uso de ASO como electrolito en la modificación superficial de Ti y la aleación Ti_6Al_4V.

El objetivo particular es el de obtener NTs de TiO_2 con características específicas en los rangos de los 80 a 100 nano-metros (nm) en diámetro externo promedio, un espesor de pared de 5 a 20 nm, longitudes de 50 a 100 nm y densidades arriba del 90% por centímetro cuadrado (cm^2) o 1.25-1.75 $gr.cm^{-3}$, en rangos de tiempo cortos de 1 a 30 minutos y potenciales de corriente entre los 5 a 20 V a 1, 5 y 10 amperes [10]. Siendo este el primer estudio dirigido a la fabricación y caracterización de NTs sobre la superficie de Ti y la aleación Ti_6Al_4V por el método de oxidación anódica con electrolitos acuosos base ASO, siendo su excelente bio-compatibilidad la propiedad clave de mayor interés para nuestro estudio [37]; con especial interés en los siguientes puntos:

1. Promover el uso de electrolitos acuosos base ASO para la generación de NTs de TiO_2.
2. Reducir tiempos de anodizado de 5 a 30 minutos, gracias a las propiedades únicas del ASO.
3. Proveer de capas anti-corrosivas de NTs de TiO_2 fuertemente adheridas a la superficie de la aleación Ti_6Al_4V utilizando electrolitos acuosos base ASO.
4. Formar capas de NTs de TiO_2 en los rangos de 80 a 100 nm de diámetro para el posterior estudio de sus propiedades biológicas por otras líneas de investigación.
5. Reducir los contenidos de NH_4F (<0.1%) en la solución acuosa electrolítica base ASO.

Así como investigar y documentar los efectos del cambio en los parámetros como; el tiempo, voltaje y composición del electrolito sobre el diámetro, longitud y la densidad por cm^2 de NTs de TiO_2, con el apoyo de tecnologías de última generación en microscopia de fuerza atómica (AFM), microscopia electrónica de barrido (SEM) y composición química con espectroscopia por dispersión de rayos X (EDX).

1.5 Organización de la Tesis.

La presente tesis está dividida en 5 capítulos.

Capítulo 1. Presenta la revisión de la literatura de trabajos previos realizados sobre el tema, así como los objetivos de esta tesis.

Capítulo 2. Se enfoca en describir de forma general el método de anodizado electroquímico y los mecanismos que gobiernan el crecimiento de las capas de óxidos, se introducen las características generales, propiedades y composición del ASO comercial, así como el método de electrolisis por corriente directa.

Capítulo 3. Se detalla la síntesis de NTs de TiO_2 por el método de anodizado electroquímico sobre Ti y la aleación Ti_6Al_4V, se presenta el diseño de experimentos, el origen para las propuestas electrolíticas base agua súper oxidada utilizadas, se discuten los parámetros de control en los ensayos, se detallan los instrumentos utilizados para la medición y evaluación de los resultados obtenidos y se presentan las herramientas diseñadas para la fabricación de las nano-estructuras de TiO_2 y la fabricación de ASO utilizado en las soluciones propuestas.

Capítulo 4. Se detallan los experimentos realizados, la metodología utilizada, y se analizan los resultados obtenidos por la aportación del ASO para la formación de nano-estructuras.

Capítulo 5. Se presentan conclusiones, y se discute sobre la aplicación, así como trabajos futuros.

Capítulo 2. Oxidación Anódica o Anodizado Electroquímico.

"Lo conocido es finito, lo desconocido infinito; desde el punto de vista intelectual estamos en una pequeña isla en medio de un océano ilimitable de inexplicabilidad. Nuestra tarea en cada generación es recuperar algo más de tierra."

T.H. Huxley, 1887.

La síntesis de nano-estructuras especialmente los NTs se pueden lograr por distintos métodos, la técnica de oxidación anódica o anodizado electroquímico es de nuestro especial interés ya que puede ser utilizada para la modificación superficial de distintos materiales ferrosos y no ferrosos, muy versátil, fácil de escalar, de un relativo bajo costo, permitiendo la formación de capas de óxidos densas muy bien definidas con el control adecuado de los parámetros de anodizado y el tipo de aleación a utilizar. La comprensión de los factores que afectan la mecánica de crecimiento de las capas de óxido utilizando la técnica de oxidación anódica se describe en este capítulo, de igual manera se menciona la importancia de las soluciones electrolíticas y el uso de ASO en la formulación de nuevas soluciones.

2.1 Anodizado Electroquímico.

La técnica de oxidación anódica o anodizado electroquímico consiste en exponer el metal a un voltaje positivo en una configuración electroquímica, donde el ánodo (+) y el cátodo (-) se encuentran sumergidos en la solución electrolítica; el metal a modificar es expuesto (en contacto con el electrolito) a través del ánodo positivo (+) a un determinado voltaje y corriente eléctrica; donde la reacción electroquímica de óxido reducción se inicia: $M \rightarrow M^{n+} + n\,e^-$, como se muestra en la **Figura 2**. Del resultado del fenómeno de óxido reducción se pueden producir tres posibles reacciones que son dependientes del electrolito y de los parámetros de anodización existentes que gobiernan la mecánica de crecimiento de la capa de óxido, estas reacciones son las siguientes:

1. Los cationes del metal M^{n+} se disuelven de manera continua en el electrolito, ocasionando corrosión o electro-pulido.

2. Los cationes del metal M^{n+} reaccionan con los iones del oxígeno O^{2-} contenidos en el electrolito, formando capas de óxido compactas (Óxidos Metálicos, OM), siendo los OM no solubles en el electrolito.

3. Bajo condiciones electroquímicas muy particulares, la formación de la capa de óxido y la disolución química inician simultáneamente generando una capa de óxido porosa. Sin embargo bajo condiciones aún más específicas se establece una situación donde las capas de óxido comienzan a crecer de manera organizada o desorganizada (dependiendo de los parámetros de control) y durante este crecimiento los nano-poros, nano-capas de NTs y otras morfologías inician su formación.

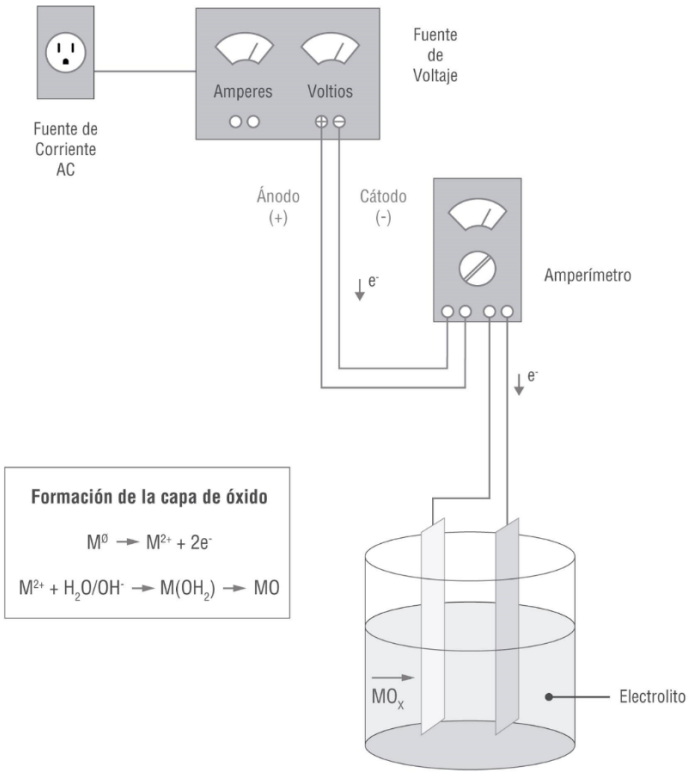


Figura 2. Esquema general para el anodizado electroquímico.

2.2 Mecanismos del Crecimiento de la Capa de Oxido.

Existen dos técnicas principales que pueden ser utilizadas durante el proceso de anodizado para la formación de capas de NTs, una de estas técnicas se lleva acabo con la aplicación de rampas de voltaje, otra es con la aplicación de un voltaje constante. Estos voltajes varían de entre 1-60 V en electrolitos acuosos, o hasta 150 V en electrolitos no acuosos. Las soluciones electrolíticas indagadas por distintos investigadores proponen un contenido de iones fluoruro disueltos en solución en los rangos de 0.05 - 0.5 M (0.1 - 1%) [38].

El crecimiento de la capa de óxido una vez elegido el metal a anodizar, puede ser monitoreado llevando un registro de las características del electrolito, concentración de componentes disueltos en él, temperatura, pH, velocidades de agitación (si aplica), control de los niveles de voltaje y corriente que pasa a través de la muestra, así como el tiempo de anodizado.

Sobre el ánodo, si el electrolito no contiene iones fluoruro, las capas de óxido de TiO_2 formadas sobre la superficie de Ti o Ti_6Al_4V son compactas y obedecen las siguientes ecuaciones:

$$M \rightarrow M^{z+} + z\,e^- \qquad (0\text{-}1)$$

$$M \rightarrow (z/2)\,H_2O \rightarrow MO_{z/2} + z\,H^+ + z\,e^- \qquad (0\text{-}2)$$

$$M^{z+} \rightarrow zH_2O \rightarrow M(OH)_z + zH^+ \qquad (0\text{-}3)$$

$$M(OH)_z \rightarrow MO_{z/2} + (z/2)\,H_2O \qquad (0\text{-}4)$$

De forma simultánea una reacción contraria en el cátodo origina la evolución de hidrogeno:

$$zH_2O + z\,e^- \rightarrow (z/2)H_2 \uparrow + zOH^- \qquad (0\text{-}5)$$

Este es el esquema clásico general de anodización donde se involucra la formación de cationes Ti^{4+}, que reaccionan con iones O^{2-} creados por el campo asistido del H_2O o los OH^-, de esta manera los cationes Ti^{4+} y los iones O^{2-} migran a través de la superficie [38].

En el momento que inicia el crecimiento de la capa de óxido anódica, esta es determinada por el transporte asistido de iones a través de la capa de óxido y dependiendo del porcentaje de transporte de las especies iónicas involucradas (Ti^{4+}, O^{2-}) el crecimiento ocurre en cualquiera de las dos interfaces, oxido-metal y oxido-electrolito. Bajo un voltaje constante *U*, el campo *F=U/d* baja constantemente, disminuyendo las fuerzas de migración iónica (para estado sólido), incrementando el espesor de la capa de óxido *d*. El resultado es una caída exponencial de la corriente anódica con el tiempo, hasta que los efectos de campo se pierden, esto en el orden de *kT*. En este punto es cuando se puede concluir que se ha logrado el máximo espesor de capa dependiente del voltaje. Para la mayoría de los metales de transición este espesor final se encuentra dado por la ecuación *d=fU*, donde *f* es el llamado factor del óxido (típicamente en el rango de 2 - 4 nm V^{-1}). La capa que crece en la interface oxido/electrolito consiste de una capa de óxido menos densa conteniendo oxy-hidroxidos [38] [39], mientras que la capa en la interface metal-oxido consiste de capas densas y estables de TiO_2.

La presencia de fluoruros en el electrolito afecta los procesos de anodización, ya que estos forman especies solubles en el agua $[TiF_6]^{2-}$. Por un lado los cationes Ti^{4+} son expulsados hacia la interface oxido-electrolito, después de la migración a través de la capa de óxido y por otra parte el ataque químico de la recién formada capa de TiO_2.

$$Ti^{4+} + 6F^- \rightarrow [TiF_6]^{2-} \qquad (0\text{-}6)$$

$$TiO_2 + 6F^- \xrightarrow{H^+} [TiF_6]^{2-} + 2H_2O \qquad (0\text{-}7)$$

Dependiendo de la concentración de fluoruro disuelto en la solución electrolítica, existen tres posibles características electroquímicas que pueden ser obtenidas [13] [40]:

1. Si el contenido de fluoruro es muy bajo (<= 0.05 % en contenido de agua), podemos observar capaz de óxidos compactas y estables, similares a las encontradas en los electrolitos libres de fluoruros; esto se logra anodizando el material a un voltaje superior a U_p.

2. Si las concentraciones de contenidos de fluoruro en la solución son mayores al 1%, no se observara formación de óxidos, ya que todos los cationes Ti^{4+} que se forman reaccionan inmediatamente con el fluoruro para formar $[TiF_6]^{2-}$ soluble, de esta manera la reacción debe ser controlada por difusión de los $[TiF_6]^{2-}$ de la superficie y el electro-pulido ocurre [40].

3. Para concentraciones de fluoruro intermedias, existe una competencia entre la formación del óxido y la disolución de iones Ti^{4+} ocurre, de esta manera se comienza a observar la formación de nanotubos. Una curva típica *i-t* (corriente vs tiempo) de condiciones que llevan a la formación de nanotubos se observa en **Figura 3** [40].

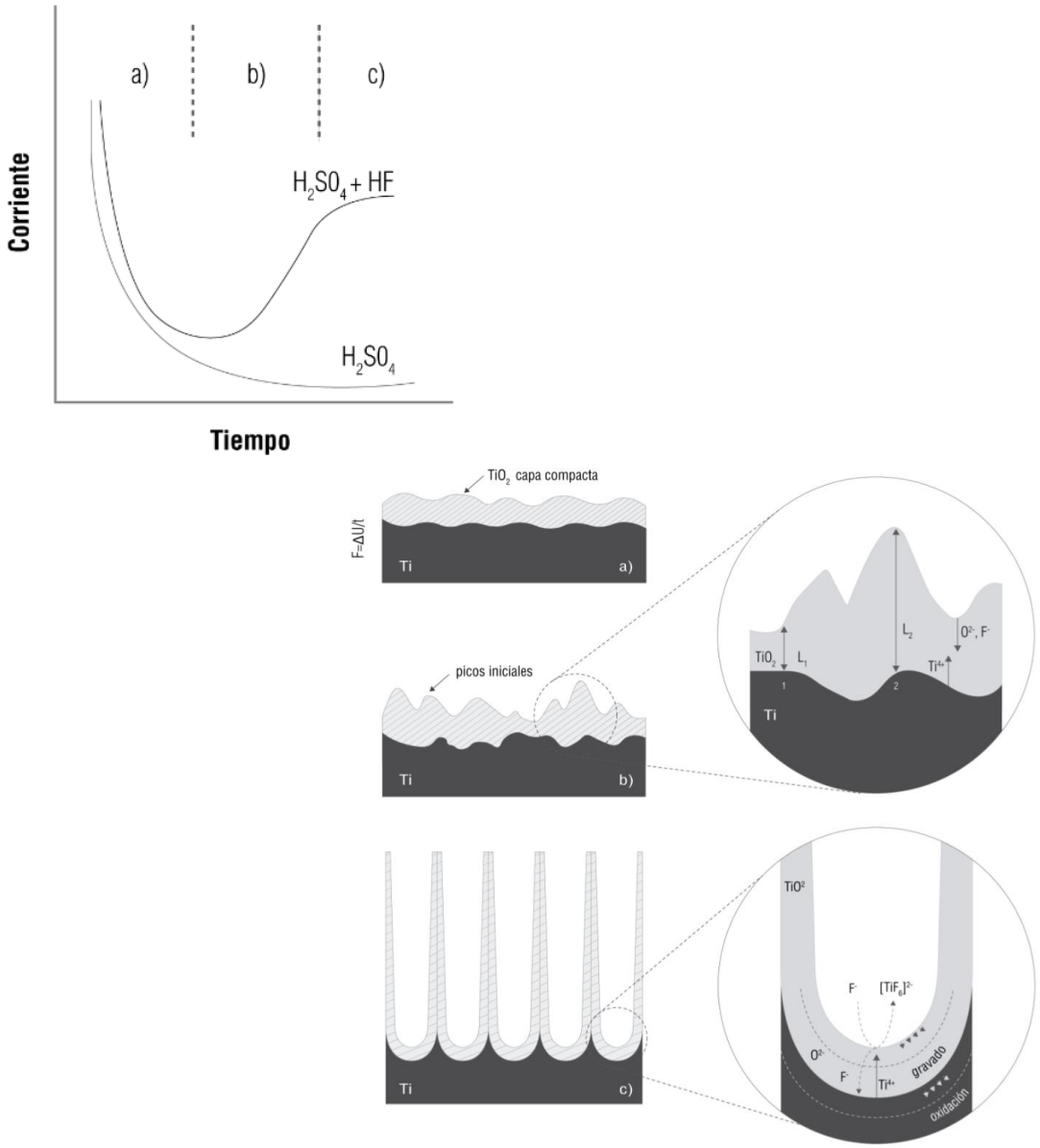


Figura 3. Curva Típica Corriente vs Tiempo.

La gráfica muestra un esquema típico de corriente vs tiempo para la oxidación del Ti en electrolitos con o sin iones F^-. Los diagramas ***a)***, ***b)*** y ***c)*** muestran la morfología correspondiente a la formación del recubrimiento durante las diferentes etapas del proceso. Los esquemas de la derecha muestran los detalles de la transportación de los iones durante las fases ***b)*** y ***c)*** [15].

La curva muestra tres escenarios:

I) En el estado inicial de anodizado la curva esencialmente sigue el caso libre de fluoruros, donde ciertas muestras de sustrato al ser removidas del electrolito dan como resultado una capa compacta del óxido.

II) En el segundo escenario al existir un incremento en la corriente, se inicia la formación de poros irregulares a nano-escala que penetran la capa de óxido original (la corriente aumenta mientras el área reactiva se incrementa).

III) En el tercer escenario la corriente baja de nuevo al momento en que las capas de nano-poros o NTs se forman. Ciertas capas de óxido (capas aleatorias o capas iniciales) se siguen formando y se mantienen como restos que frecuentemente se depositan en la superficie o capa superior cubriendo los NTs después de la anodización [40] [41].

Para las capas mencionadas en el paso III, se han intentado distintos procedimientos para removerlas [41] [42] [39], ya que interfieren en los procesos físico-químicos de transporte obstaculizando e interfiriendo en el desarrollo del tamaño del NT [43] [44]. Después de que la auto-organización en las capas iniciales del óxido se realiza, el tamaño del NT continúa creciendo a una densidad de corriente preferentemente estable. El crecimiento de la capa de óxido es determinado por los efectos de difusión [45] [46] es por esto que la agitación, los efectos de la gravedad [47] y la viscosidad del electrolito influencian en la constante de difusión, volviendo muy importante el control de estos parámetros.

El rol principal de los fluoruros es el de mantener la base de la capa de óxido delgada [48] ya que las primeras capas “imprimen” la morfología de las subsecuentes capas de óxido, esto gracias a una inmediata solvatación de los cationes Ti^{4+} que están en contacto con la interface oxido electrolito. Otro factor importante es que los iones fluoruro son muy pequeños y compiten con la migración de los iones O^{2-} a través de la base del dióxido de TiO_2.

Las nano-capas que se forman en electrolitos conteniendo fluoruros, presentan una forma en “V” a través de su espesor [39] [46] esto es debido a la mayor exposición de las paredes superiores de los NTs ya que estos están más en contacto con el electrolito conteniendo fluoruros (interface óxido-electrolito), desgastando permanentemente las paredes de los NTs durante el proceso de formación de la capa de óxido. Siendo esta parte externa típicamente densa y la parte interna formada por distintos agregados en su contenido. De forma general la **Figura 4** muestra la distribución de la composición de los NTs en la parte superior (interface óxido-electrolito), la parte central y su base (interface óxido-metal).

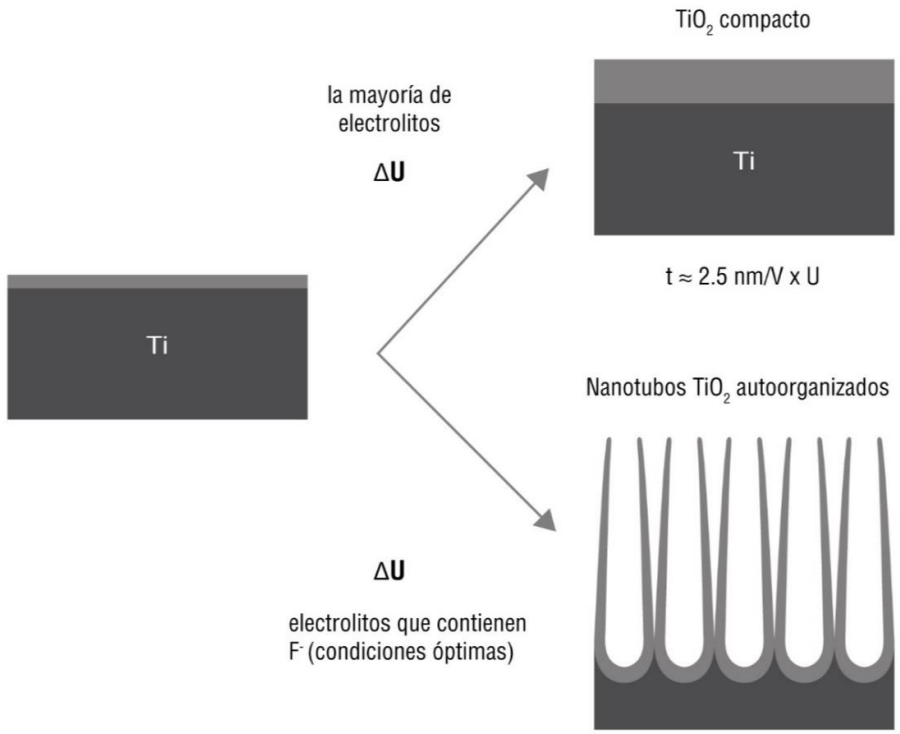


Figura 4. Distribución de la Composición de los NT.

2.3 Factores que afectan la geometría y la composición.

Dependiendo del tipo de electrolito que se utilice, existen factores que afectan la geometría y la composición de las nano-estructuras, de manera general una vez definido el electrolito se ha encontrado que el tiempo de anodizado define la longitud del NT, como se ha descrito anteriormente, el diámetro del NT está controlado de manera lineal por el voltaje que se aplica y la corriente que fluye a través de él tiene efectos sobre el espesor de pared en la formación de NT [49] [50] [48] [51]. Conforme el anodizado ocurre, se generan productos derivados de la reacción, que con el tiempo cambian la conductividad del electrolito [52], limitando el paso de la corriente, dando como resultado variaciones en los diámetros de los NTs en tiempos más largos de anodizado. Es muy importante mencionar que para condiciones de crecimiento acelerado de capas de óxido, estén presentes condiciones óptimas de crecimiento (aleación-electrolito-voltaje-corriente-temperatura-tiempo-agitación).

Estudios en soluciones electrolíticas orgánicas, como las compuestas por etilenglicol, glicerol, o líquidos iónicos a bajos contenidos de agua disuelta en solución, han demostrado formar nano-estructuras donde su composición y morfología presentan diferencias significativas al ser comparadas con las nano-estructuras formadas en electrolitos acuosos, produciendo NTs largos, con diámetros grandes arriba de los 700 nm y una morfología homogénea en las paredes de los NTs [53] [54].

El contenido de agua disuelta en el electrolito afecta la tasa de crecimiento y la velocidad de la disolución química de los NTs de dos formas:

1. El agua disuelta en el electrolito es requerida para la formación del óxido base de los NTs.

2. Acelera la disolución de la capa de NTs en la interface óxido-electrolito, sobre todo si los fluoruros de metal formados son solubles en agua.

Otras observaciones que se reportan frecuentemente en electrolitos con bajos contenidos de agua, es la característica particular del suave acabado superficial de las paredes que forman los NTs, [55] [48] [56] [57]; en contraste, los electrolitos con altos contenidos de agua, muestran ondulaciones sobre la superficie de los NTs. La razón aparente de este efecto es la capa enriquecida con fluoruros entre los tubos, mostrando un aumento en la rapidez de disolución química con respecto a la velocidad de crecimiento del sustrato subyacente; es por esto que estos estudios concluyen que las ondulaciones sobre las paredes de los NTs se pueden atribuir a la fluctuación continua del comportamiento activo y pasivo de las regiones frontera de las capas de óxido [58].

Otro de los métodos para la generación de NTs puede ser bajo condiciones galvanoestáticas es decir, manteniendo la corriente de anodización constante [59]. Sin embargo, esta técnica tiene el inconveniente que el voltaje puede cambiar con el tiempo y de esta manera perder principalmente el control del crecimiento del diámetro del NT. Los trabajos realizados por Taveira y colaboradores [59] muestran que el anodizado bajo corriente constante, en efecto muestra fluctuaciones en el voltaje, razón por la cual el NT continúa creciendo hasta un voltaje crítico, ocasionando un desprendimiento de esta capa e inmediatamente después es reemplazada por una nueva que toma su lugar. La técnica utilizando rampas alternadas de voltaje [60], no muestran resultados con una desviación significativa sobre las realizadas a voltaje constante [38].

En los distintos estudios de los métodos de anodización electroquímica [61] [46] [38] se ha observado y reportado que para la generación de capas de NTs de óxidos en distintos metales el factor clave para la generación de estas morfologías es la concentración de H_2O en la solución. Estos estudios se han ampliado para ver los efectos de las concentraciones de H_2O para la generación de NTs de TiO_2 en electrolitos no-acuosos y han demostrado que el efecto de campo ocasionado por el voltaje es el factor principal debido a la movilidad de los iones fluoruro disueltos en solución [62] [57] [63]. Si el voltaje es disminuido durante la anodización, el crecimiento del tubo se detendrá o se reducirá drásticamente, debido a las fuerzas de campo a través de la base de la capa de óxido, volviéndose estas fuerzas muy bajas para mantener el crecimiento [38].

Los más altos niveles de ordenamiento de capas de NTs de TiO_2 se han encontrado en electrolitos no-acuosos, como el glicerol o el etilenglicol. Los electrolitos orgánicos base etilenglicol han demostrado que bajo condiciones óptimas de electrolito y voltaje [64] [39], se logran capas de NTs con un muy buen ordenamiento, mostrando que para la creación de capas de óxidos ordenadas, se deben encontrar las condiciones óptimas electrolíticas, que consisten en obtener una formulación que nos permita lograr la máxima corriente al menor voltaje que pueda aplicarse, evitando la disolución electrolítica (rompimiento dieléctrico de la capa de óxido).

2.3.1 Factores para Obtener Arreglos Nano-Tubulares.

La presencia de iones fluoruro disueltos en la solución electrolítica es necesaria para la generación de capas ordenadas de TiO_2, estas capas ordenadas dependerán principalmente de las variaciones en la concentración de fluoruros en la solución y la cantidad de H_2O, así como las condiciones de voltaje, corriente y tiempo. La agitación magnética provee de una densidad de corriente local uniforme así como de condiciones de temperatura más apropiadas sobre la superficie del ánodo y es sugerida durante los experimentos.

El control adecuado de estos factores afectan los mecanismos de crecimiento de la capa de óxido, al inicio de este proceso el grabado electroquímico domina y las primeras capas de óxido se forman con la ayuda del campo eléctrico, el óxido comienza a crecer sobre su superficie, donde los iones O^{2-} provenientes del H_2O migran a través de la capa de óxido y reaccionan en la interface metal-óxido, mientras que los cationes de Ti^{4+} son expulsados de la interface metal-óxido a la interface metal-electrolito, como lo explica la siguiente ecuación [65] [14]:

$$Ti + 2H_2O \rightarrow TiO_2 + 4H^+ + 4e^- \qquad (0\text{-}8)$$

De esta forma los iones fluoruro en el electrolito ayudan a la formación de los NTs sobre la superficie del Ti. Sin iones fluoruro F^-, el campo eléctrico se reduce mientras el óxido continua creciendo, lo que lleva a una caída exponencial de la corriente como se muestra en la **Figura 5** [14] [66].

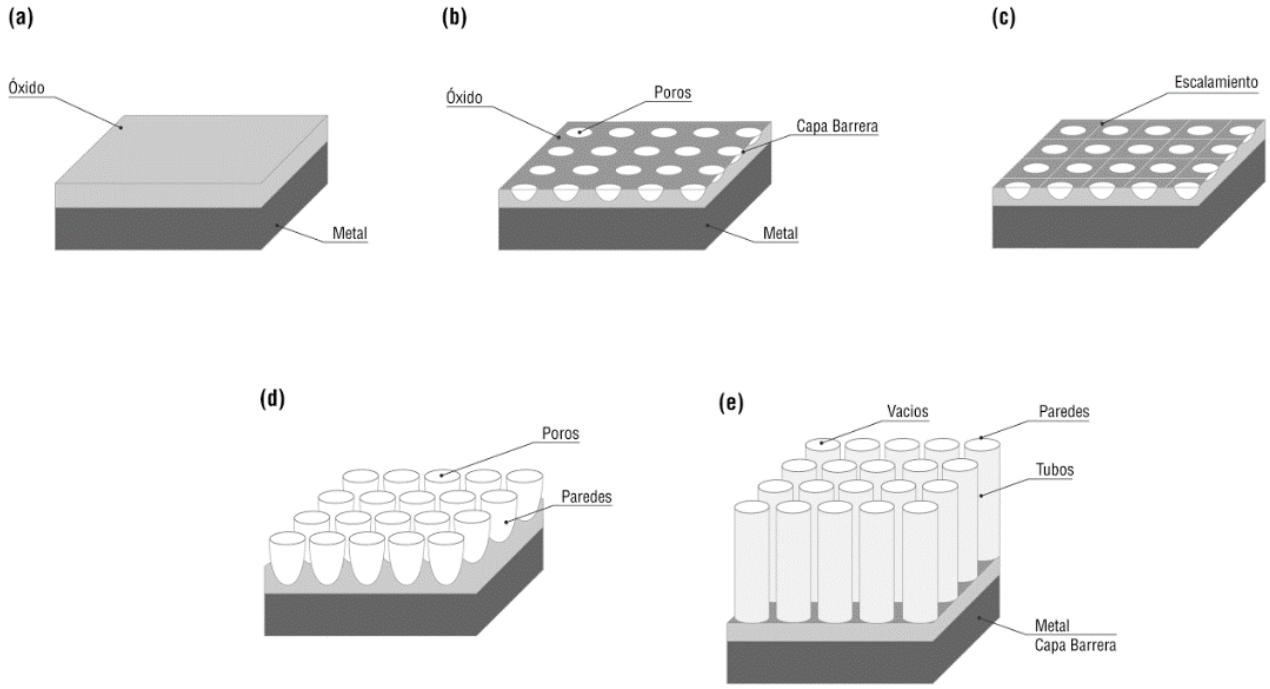


Figura 5. Diagrama esquemático de la evolución de nanotubos (TiO_2) en anodización.

(a) Formación de la capa de óxido; (b) formación de poros en la capa de óxido; (c) escalamiento, formación entre poros; (d) crecimiento de los poros y escalamiento; (e) matriz de nanotubos (TiO_2) completamente desarrollados.

De esta forma los cationes Ti^{4+} son expulsados para formar una capa de precipitado de $Ti(OH)_xO_y$. Todas estas condiciones retardan la formación de la capa de óxido. La presencia de los iones F^- en la solución electrolítica otorga diferentes mecanismos que gobiernan la disolución de los TiO_2 de la siguiente manera:

$$TiO_2 + 6F^- \rightarrow [TiF_6]^{2-} + O^-_2 \qquad (0\text{-}9)$$

Esta disolución lleva a la formación aleatoria de poros, que con las condiciones apropiadas, continúan creciendo conforme a los parámetros de formación de la capa de óxido, ocasionando un incremento en el área activa para la formación de más óxido llevando a un incremento en la corriente. De esta forma los cationes de Ti^{4+} que interactúan con la interface óxido-electrolito reaccionan con los iones F^- para formar especies solubles de TiF_6^{2-}, como se muestra a continuación:

$$Ti^{4+} + 6F- \rightarrow [TiF_6]^{2-} \qquad (0\text{-}10)$$

Conforme el tiempo transcurre los poros continúan creciendo, y bajo condiciones estables comparten cantidades similares de la corriente disponible esparciéndose de forma uniforme. El espesor y profundidad de los poros continua creciendo hasta formar los NTs, esto ocurre solo cuando la tasa de crecimiento de la capa de óxido en la interface metal-oxido es mayor que la disolución en la interface oxido-electrolito. El espesor de la capa de óxido, o longitud del NT se detiene cuando las tasas de crecimiento y disolución se igualan [67].

2.3.2 El Potencial en el Anodizado Electroquímico.

Las nano-estructuras pueden ser logradas solo en un rango específico de potencial anódico (una vez teniendo definido los parámetros del electrolito). Si el voltaje es muy bajo los mecanismos de formación o gravado inicial de la capa de óxido en la interface óxido-electrolito no logran el transporte necesario de especies iónicas en las capas iniciales o base de la capa de óxido en la interface oxido-metal, dando como resultado la formación de poros que no pueden crecer y dar forma a las nano-estructuras. Por otra parte siendo el voltaje muy alto, las tasas de los mecanismos de crecimiento de las capas de óxidos son muy altos con respecto a las tasas de la disolución química, formando con rapidez las capas de óxidos iniciales compactos y estables en conjunto con la impresión inicial porosa, retardando el desarrollo de los NT [65].

2.3.3 Composición Química del Electrolito.

La composición química del electrolito es crucial para la formación de nano-estructuras, especialmente en la formación de NTs de TiO_2. Su influencia depende primordialmente del incremento en la concentración de iones F^-, ya que los NTs no pueden formarse si la disolución química es muy alta o muy baja, solo ciertas concentraciones de iones F^- pueden favorecer la formación de NTs. La bibliografía sugiere concentraciones en los rangos de 0.05 a 0.3 % de iones F^- en contenido disuelto en la solución electrolítica [14] [68]. La viscosidad del electrolito es otro factor importante que influencia la generación de NTs, en electrolitos acuosos esta viscosidad se incrementa o disminuye según el porcentaje de contenido de agua disuelto en la solución electrolítica, siendo los de mayor contenido de agua disuelta en solución los de menor viscosidad.

2.3.4 Temperatura del Electrolito.

Los efectos de la temperatura en electrolito tienen cierta influencia en la formación de la capa de óxidos, para la formación de NTs de TiO_2 se ha observado que el incremento en la temperatura del electrolito ocasiona una disminución en la longitud y espesor de las paredes del NT [18]. Esto quiere decir que incrementando la temperatura del electrolito, se incrementa la disolución química de la capa de óxido, reduciendo o limitando la longitud y el espesor de pared del NT. Por otra parte disminuyendo la temperatura del electrolito se obtienen NTs de TiO_2 con mayores longitudes y espesores de pared, concluyendo que una baja temperatura ayuda a mejorar estos parámetros morfológicos. Sin embargo, una temperatura muy baja lleva a que los óxidos saturen los espacios entre NTs dando una apariencia de nano-poros hexagonal al acabado superficial [68].

2.3.5 Efectos de la Distancia entre el Ánodo y el Cátodo.

El proceso de anodizado electroquímico involucra la interacción de 2 electrodos; el ánodo y el cátodo, sumergidos en una solución electrolítica. Este arreglo es necesario para el intercambio de iones entre los electrodos y la distancia entre los electrodos afecta la densidad de corriente. Los experimentos muestran claramente como la densidad de corriente en estado estable disminuye gradualmente si la distancia entre los electrodos aumenta, de igual manera la fuerza del campo eléctrico disminuye, ya que está ligada a la caída de la resistencia. Los incrementos en la separación de los electrodos originan una disminución en el movimiento de la cantidad de iones en el ánodo ya que el campo eléctrico no es lo suficientemente fuerte debido a la distancia [14].

La separación de los electrodos es una variable que depende del tipo de cátodo que se elija, el tamaño del área a anodizar, de las propiedades del electrolito y del tipo de arreglo o configuración en la celda electroquímica.

2.4 Agua Súper Oxidada (ASO).

El agua súper oxidada (ASO) es ampliamente conocida por su gran variedad de propiedades no toxicas, anti-bacteriales, desinfectantes e incluso terapéuticas. Es utilizada para el tratamiento de distintos padecimientos y su utilización es muy diversa, desde métodos intravenosos, por aspersión, oral, y cutánea, solo por mencionar algunos. Se puede utilizar desde el tratamiento de heridas hasta incluso para la mejora del funcionamiento del sistema inmunológico [37].

Las bondades del ASO se atribuyen principalmente al balance en la mezcla química que posee y sus especies oxidantes, que incluyen algunos ácidos hipoclorosos (HOCl), hipocloritos (OCl^-, NaClO), oxígeno disuelto (O_2), gases hidrógeno (H_2) y cloro (Cl_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cationes hidrógeno (H^+), cantidades correspondientes de superoxidos ($*O_2^-$, HO_2), ozono (O_3), entre otras formas activas de especies de oxigeno (*OCl, $*HO^-$) [69]. Razones principales para su utilización como base en la generación de electrolitos acuosos para estudios sobre sus propiedades e influencia en la generación de nano-estructuras.

2.3.1 Electrólisis en Soluciones Salinas.

La electrólisis es la base para la generación de ASO y es considerado un método relativamente simple y de bajo costo, utilizando soluciones salinas o soluciones con mayores concentraciones de soluto en el medio externo salino (NaCl y H_2O) [69] que otorga propiedades anti-bacterianas compatibles con organismos al modificar la composición química de la solución. Algunos ejemplos son: la producción de agua clorada, blanqueadores y peróxidos de hidrógeno. De forma general la electrólisis se puede describir como el uso de métodos que consisten en exponer soluciones salinas al paso de corriente, utilizando barreras selectivas de iones entre arreglos de electrodos con el objetivo de separar eficientemente moléculas específicas y eliminar subproductos no deseados [69].

El ASO es considerada una solución ideal en su uso como desinfectante, ya que ha demostrado ser muy efectiva en la descontaminación de organismos patógenos, siendo su composición ligeramente ácida, (pH 5.0-6.5) es ideal para su utilización en organismos vivos, es amigable con el medio ambiente y puede controlar o prevenir una amplia gama de bacterias e infecciones virales [37]. Algunos de los parámetros ideales encontrados en ASO comercial son: 250 mg/L de concentración de cloro disuelto en solución, niveles de pH 6.19, y un potencial de óxido reducción (ORP) de 974 mV, dando una efectividad del 100% al ser utilizado como desinfectante de materiales sólidos, siendo su efectividad superior a la de cloros disueltos en solución (1:1000 vol/vol) [15] [37].

Algunas de las excelentes propiedades anteriormente descritas, hacen que la utilización de ASO para la generación de electrolitos acuosos en la modificación superficial con nano-estructuras, sobre Ti y la aleación Ti_6Al_4V por los métodos de oxidación anódica sea de especial interés, la evaluación de las morfologías de las superficies modificadas y el aporte a las propiedades químicas de estos electrolitos es el objetivo principal del presente trabajo de investigación, y como posible resultado incrementar las propiedades de bio-compatibilidad de las nano-estructuras formadas sobre las superficies modificadas las cuales serán desarrolladas por otras líneas de investigación.

Capítulo 3. Síntesis de NTs de TiO_2 por Métodos de Anodizado Electroquímico.

"La esencia de la ciencia es que se autocorrige."

COSMOS, Carl Sagan, 1980

El presente capítulo centra la información del trabajo experimental, las mediciones y evaluaciones realizadas, el diseño y fabricación de los instrumentos y herramientas utilizados para la generación de ASO y en la utilización del método de anodizado electroquímico, los parámetros de control seleccionados durante el proceso de anodización anódica para la formación de capas de nano-estructuras de TiO_2 en las diferentes condiciones de voltaje, tiempo, solución electrolítica, temperatura, acabado superficial, agitación y tipo de aleación. Se justifica la selección de los diseños experimentales, se detalla el desarrollo del ASO y de los electrolitos base ASO a diferentes concentraciones de etilenglicol y NH_4F. La preparación y tratamientos previos de las muestras de Ti y Ti_6Al_4V, así como los instrumentos de medición para el análisis de resultados.

3.1 Selección del Método para el Diseño Experimental.

El diseño de experimentos (DOE) tiene la finalidad de explicar los efectos de las variables de entrada (factores) sobre nuestras variables de salida (respuestas) resumiendo las distintas series de corridas en las que se realizan los cambios deliberados de entrada. Con la finalidad de que los datos obtenidos se analicen he identifiquen las condiciones del proceso y los componentes que influyen en los resultados de salida, para determinar cuál es la configuración más óptima de estos factores para una mejor obtención de los resultados propuestos.

Existen diferentes tipos de diseños experimentales: diseños factoriales, diseños de superficie de respuesta, diseños de mezcla y diseños de Taguchi. Debido a las características de la presente investigación el método experimental que más se adecua a nuestras presentes necesidades es el método Taguchi ya que este incluye diseños de 2, 3, 4 y 5 niveles, así como diseños de niveles mixtos.

3.1.2 Diseño Experimental Metodología Taguchi.

Los experimentos fueron diseñados utilizando la metodología Taguchi también llamada arreglos ortogonales, ya que estos permiten elegir el proceso que funciona con mayor consistencia durante la experimentación; reconociendo que no todos los factores que causan variabilidad serán controlados. A los factores que no se pueden controlar se les llama factores de ruido [70]. Esta metodología intenta identificar factores controlables (factores de control) que minimizan el efecto de los factores de ruido. Durante el experimento, se manipularon los factores de ruido para hacer que la variabilidad nos permita determinar la configuración óptima de los factores de control para que nuestro proceso sea robusto ante la variación causada por los factores de ruido. Ofreciéndonos una respuesta de salida más confiable y consistente, independientemente del entorno en el que se utilice.

El proceso se inicia identificando y definiendo los factores de control y ruido:

1. Definición de Factores de Ruido:

   I. Temperatura (Temperatura Ambiente).

   II. Error de Equipo (Fuente de Poder 50 – 100 mV).

2. Definición Factores de Respuesta:

   A. Diámetro del Nanotubo (Y1).

   B. Longitud del Nanotubo (Y2).

   C. Espesor de Pared (Y3).

   D. Densidad de Nanotubos por área (Y4).

Una vez que fueron identificados estos factores varios diseños de experimentos con combinaciones individuales fueron realizados, cada uno de estos se explicará y presentará de forma independiente en su respectiva sección en el capítulo 0.

.

3.2 Reactivos para la Generación de Electrolitos Base ASO.

Los tres reactivos principales utilizados para la generación de los electrolitos acuosos utilizados en la experimentación son:

- Etilenglicol ($C_2H_6O_2$)
- Fluoruro de Amonio (NH_4F)
- ASO nivel comercial Microdacyn60.

La composición general del ASO nivel comercial Microdacyn® tiene las siguientes características [71]:

Tabla 1. Composición del agua súper oxidada Microdacyn®.

Compuesto	Composición (%Agua/Agua)	Composición (mg/L)
Hipo clorito de Sodio	0.00357	35.7
Acido hipocloroso (HClO)	0.00252	25.2
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.011055	110.6
Agua súper oxidada	99.98	999.8

*Con un pH de 6.2-7.8, potencial oxido reducción >800 mV y una osmolaridad de 13mOsm/kg.

La composición del ASO nivel comercial Microdacyn60® utilizada en los experimentos tiene las siguientes características:

Tabla 2. Composición del agua súper oxidada comercial (Microdacyn60®).

Composición	
Sodio<55ppm	Cloro <80ppm
HClO	H_2O_2
ClO	O_3
Cl_2	O_2

*Combinados estos iones no son más de 55ppm.

Tabla 3. Valores del agua súper oxidada comercial (Microdacyn60®).

Nomenclatura	Valor	Unidad
Potencial Oxido Reducción (ORP)	1.1	V
Cloro Disponible (AC)	20<AC<60	ppm
NaCl (Cloruro de Sodio)	0.1	% x Litro
pH	<2.7	

3.3 Instrumentos Utilizados en la Caracterización de las Mediciones.

Como se mencionó en la sección 3.1.2 hay cuatro factores de respuesta principales en las mediciones de los ensayos electroquímicos de anodizado sobre las muestras de Ti y la aleación Ti_6Al_4V, que son: 1- diámetro del nanotubo, 2- longitud del nanotubo, 3- espesor de pared y 4- densidad de nanotubos por área. Los instrumentos utilizados para la medición de estas características son:

- Microscopia electrónica de barrido (SEM)
- Microscopia de fuerza atómica (AFM).
- Espectroscopia por dispersión de rayos X (EDX)

En los ensayos de electrolisis por corriente directa para la generación de ASO se utilizaron:

- Medidor de Acidez (pH).
- Medidor de partículas (ppm).
- Medidor del potencial oxido reducción (ORP).

2.3.2 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).

Las mediciones fueron realizadas utilizando microscopia de fuerza atómica (AFM) Newport XY Translation Stage Modelo 401, **Figura 6**. La mecánica del funcionamiento general del AFM consiste de una punta afilada en cantiléver que se utiliza para escanear la superficie de la muestra. Esta punta está hecha principalmente de silicio con un radio de curvatura de la punta en la escala nano-métrica. Cuando la punta se acerca a la superficie de la muestra, las fuerzas que están entre la punta y la muestra conducen a una deflexión de acuerdo con la ley de Hooke, como se muestra en la **Figura 7**.

Figura 6. Microscopio de fuerza atómica (AFM).

Las fuerzas que se miden en el AFM incluyen la fuerza mecánica de contacto, fuerzas de Van der Waals, fuerzas de capilaridad, fuerza de enlaces químicos, fuerzas electrostáticas, etc. Además de estas fuerzas adicionalmente se pueden medir de manera simultánea otras fuerzas esto gracias al uso de puntas especiales, pero esto es dependiente del tipo de AFM y las configuraciones que este permita. De manera general la deflexión del sensor se mide en un punto gracias a un láser reflejado desde la superficie superior del sensor en cantiléver hasta un arreglo de fotodiodos. Otros métodos que se utilizan son el interferómetro óptico, sensor capacitivo o cantiléver AFM piezo-resistivo. Los sensores fabricados con elementos piezo-resistivos actúan como una galga extensiometrica a deformación usando el puente Wheatstone en el arreglo del circuito eléctrico que mide la resistencia eléctrica como deformación en cantiléver o deflexión, aun a pesar de ser que el arreglo de puente de Wheatstone es muy preciso este método no es tan sensible como la deflexión por láser o con el uso del interferómetro.

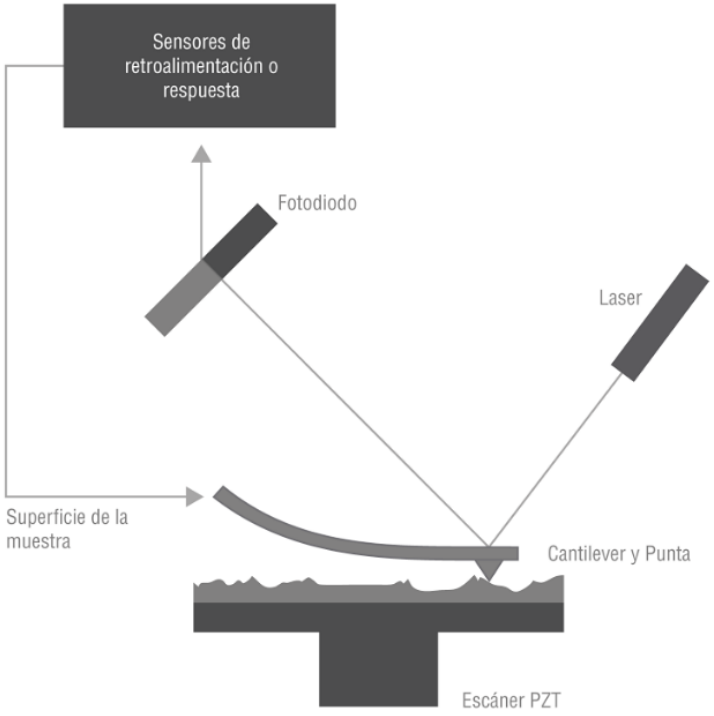


Figura 7. Diagrama esquemático de la microscopia de fuerza atómica (AFM).

El uso del microscopio de fuerza atómica es utilizado en nuestra investigación para examinar principalmente rugosidad o factores de aspereza de las superficies del TiO_2 así como algunas de las características principales del NT, como: diámetro, espesor de pared, longitud, y densidad de NT por cm^2, sin embargo estas últimas cuatro características son mejor apreciadas utilizando la técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM).

2.3.3 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).

El método de microscopia electrónica de barrido (SEM) es ampliamente utilizado en distintos métodos de análisis, ya que es una técnica muy poderosa en la producción de imágenes de alta resolución gracias a las interacciones que se pueden realizar entre los electrones y la materia sujeta a estudio, algunos de estos métodos de análisis pueden ser: estudios morfológicos o de superficie, análisis micro-estructurales y nano-estructurales (dependiendo de la resolución del microscopio), análisis de componentes o elementos de composición (equipado con el detector de energía/ dispersor de ondas de rayos X, o EDX), compuestos químicos, mapeos elemental, entre otros. Estudio realizado con el modelo de Orsay Physics, como se muestra en la **Figura 8**.

Figura 8. Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).

3.4 Diagrama de Procesos para la Síntesis de Nano-Estructuras de TiO_2.

A continuación la **Figura 9** se muestra el diagrama de flujo general del proceso realizado para la síntesis de capas de nano-estructuras de TiO_2, por el método de anodizado electroquímico.

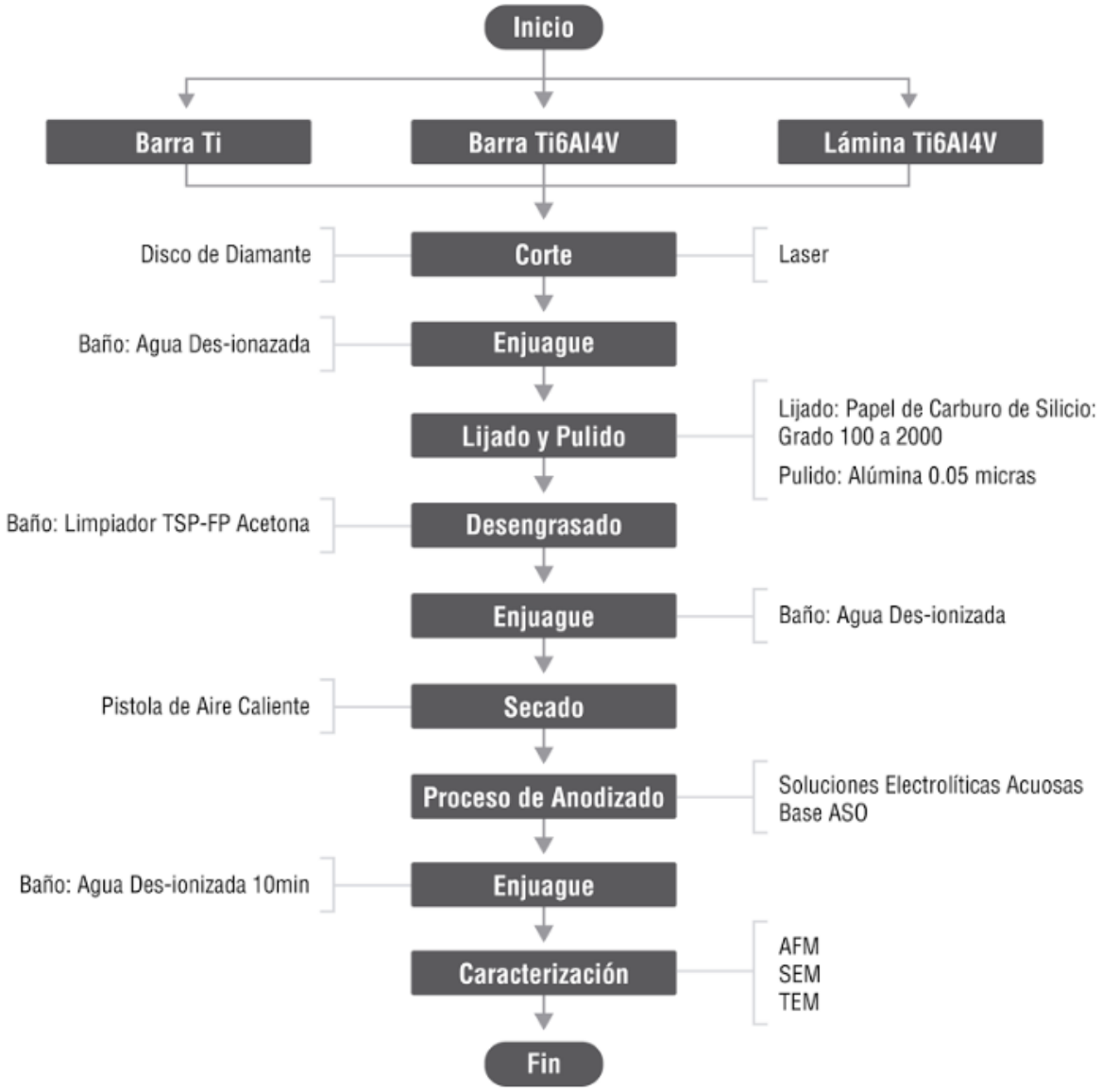


Figura 9. Diagrama de flujo general.

3.5 Configuración para el Proceso de Anodizado Electroquímico.

La **Figura 10** muestra un esquema del arreglo utilizado para la realización de los experimentos utilizando la técnica de anodizado electroquímico. El ánodo o metal a anodizar, es conectado a una fuente de poder en la terminal positiva (+), y el cátodo a la terminal negativa (-), para el anodizado de Ti y la aleación de Ti_6Al_4V. La fuente de poder es necesaria para forzar el proceso de corrosión asistida, (anodizado).

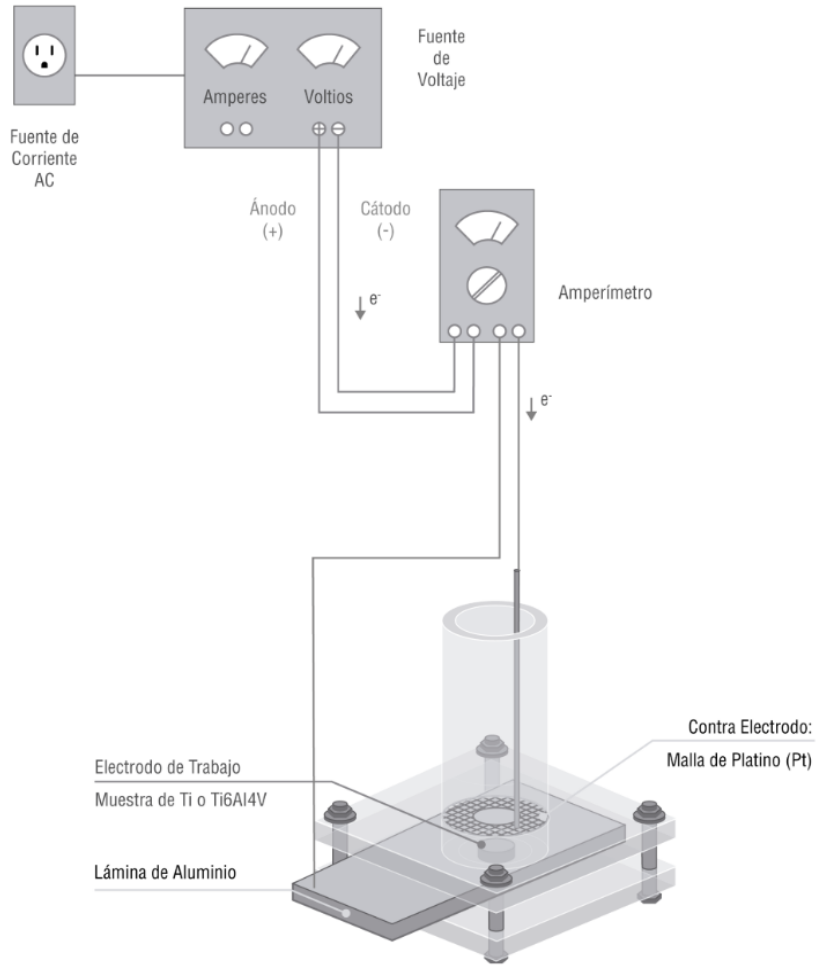


Figura 10. Esquema Detallado del Arreglo Electroquímico.

3.5.1 Diseño de Celda Electroquímica para el Proceso de Anodizado.

El diseño de la celda utilizada para el método de polarización anódica fue diseñado de acuerdo a la celda estándar CFD-13 Coating Flat Cell de Scribner y Asociados Inc. adecuada para nuestras necesidades particulares de configuración con la intensión de agilizar la manipulación de las muestras. Los componentes principales de esta celda son el electrodo de trabajo (ánodo) y contra electrodo (cátodo). Las características generales del diseño se describen en la **Figura 11**.

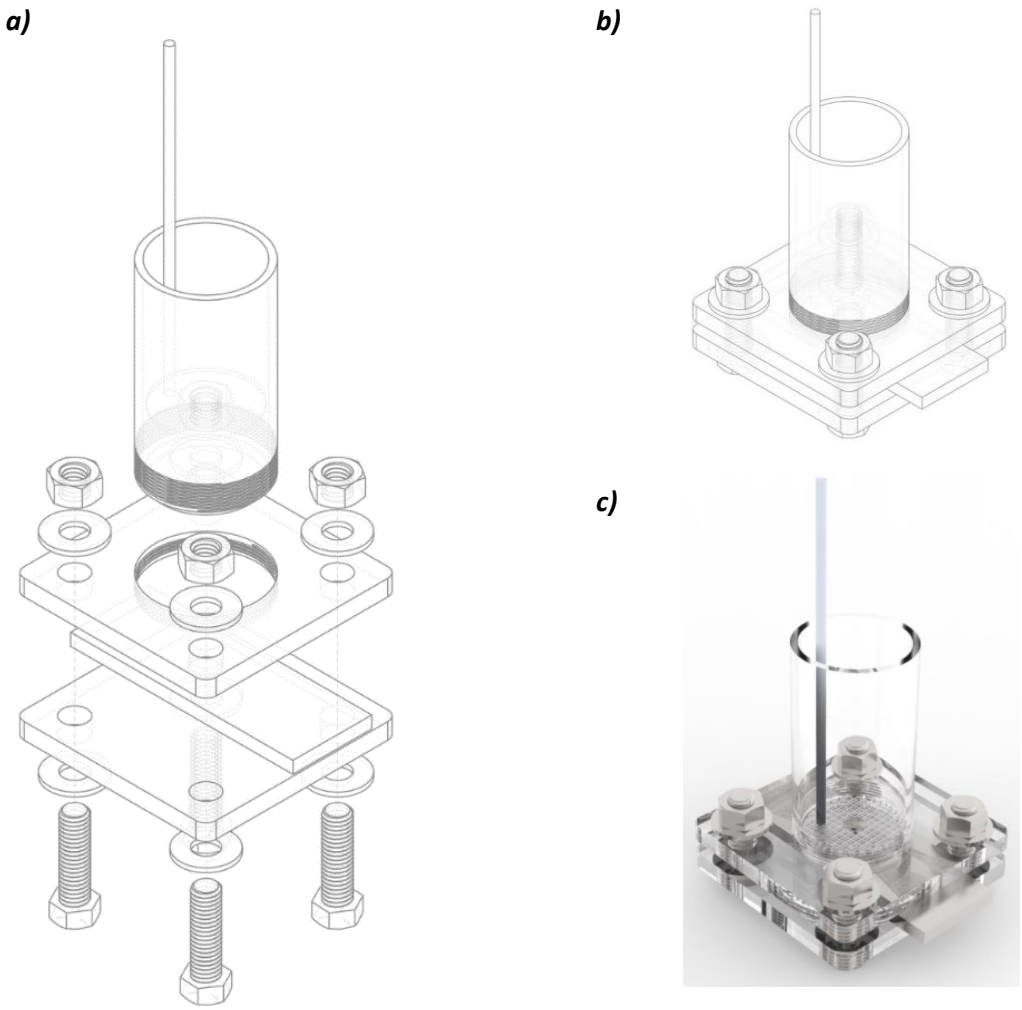


Figura 11. Celda Electroquímica Modificada.

a) Explosión de componentes de la Celda, b) Celda ensamblada, c) Propuesta final.

La celda consta de tres componentes principales fabricados de acrílico, los tornillos, tuercas y rondanas seleccionados para su ensamble son de acero inoxidable.

El electrodo de trabajo entra en contacto con el electrolito a través de un orificio que se encuentra ubicado en el fondo del componente cilíndrico que contiene al electrolito y de donde se sujeta el contra electrodo de Platino (Pt), una placa de aluminio de 6 mm de espesor se encuentra ubicado entre el electrodo de trabajo y el contra electrodo para cerrar el circuito y permitir el paso del flujo de corriente con un orificio escalonado especialmente colocado para ensamblar con las muestras de Ti y la aleación T_6Al_4V evitando movimientos excesivos después del montaje y controlar de manera precisa las superficies de contacto entre el ánodo, el cátodo y el electrolito, de esta manera solo la superficie de la muestra de Ti o Ti_6Al_4V de 1 cm^2 queda en contacto con el electrolito. La superficie expuesta consta de un sello de plástico impermeable para evitar fugas del electrolito.

La malla de platino (Pt) o contra electrodo es utilizada debido a sus propiedades inertes contra las soluciones electrolíticas utilizadas durante el proceso de anodizado electroquímico, debido a las características de la celda electroquímica, la distancia entre ambos electrodos es de 2 cm. La **Figura 12** muestra la configuración final de la celda descrita así como una escala en centímetros que permite conocer algunas de sus dimensiones básicas.

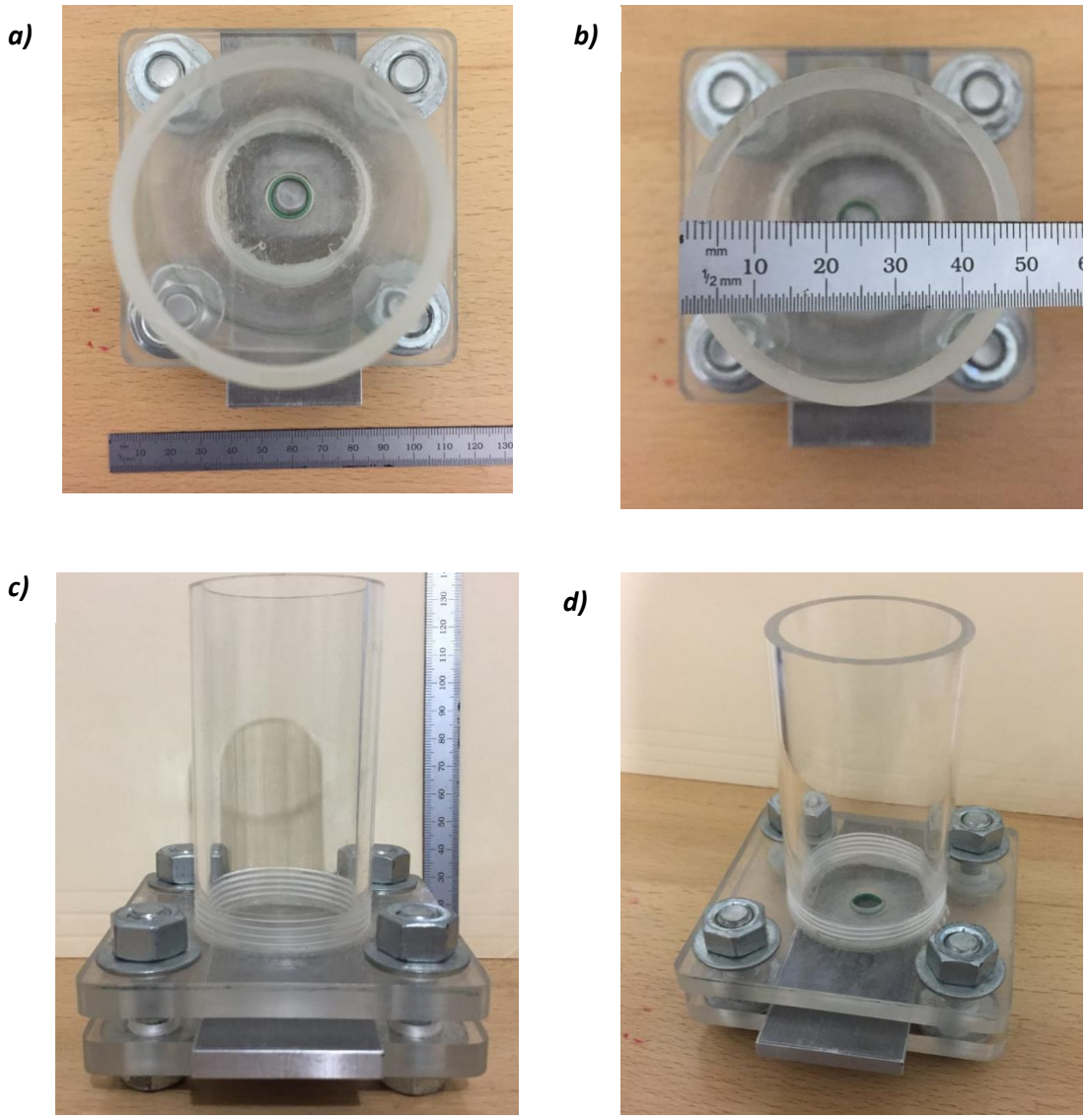


Figura 12. Celda Electroquímica para Anodizado.

a) y b) Vistas superiores, c) Vista frontal, d) Vista en isométrico.

3.5.2. Diseño de Celda para el Proceso de Electrólisis por Corriente Directa.

La electrólisis por corriente directa se realiza gracias a dos membranas de poliéster (Anicónica y Catiónica) ubicadas entre electrodos de titanio platinado y la solución salina, H_2O con contenidos de NaCl (Cloruro de Sodio), el voltaje se aplica a los electrodos de titanio platinado forzando el intercambio iónico, ocasionando que del lado del ánodo se comiencen a elevar los niveles en contenidos de O_2 y Cl_2, y del lado del cátodo se concentran grandes cantidades de H_2 [37]. El agua electrolizada altamente ácida (SAEW de sus siglas en inglés o ASO agua súper oxidada como la hemos estado llamando en el presente trabajo de investigación) es generada en el lado del ánodo. La ASO es definida si cumple con los siguientes parámetros mínimos: niveles de pH menores a 2.7, potenciales de óxido reducción (ORP) mayores a 1.1 V y concentraciones de cloruro (AC) entre 20-60 ppm [37].

La **Figura 13** muestra el esquema general para la generación de ASO. Los parámetros utilizados de voltaje, y contenidos de NaCl en solución serán descritos con mayor detalle más adelante. [37]

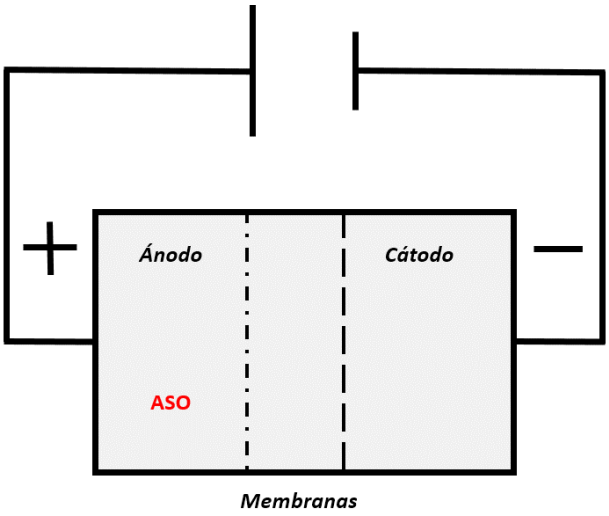


Figura 13. Electrólisis por Corriente Directa, Esquema General.

En el ánodo el proceso de intercambio iónico eleva los niveles en contenidos de O_2 y Cl_2 como lo describen las siguientes ecuaciones:

$$H_2O \rightarrow ½\ O_2 + 2H^+ + 2e^- \quad (0\text{-}1)$$

$$2Cl^- \rightarrow Cl_2 + 2e^- \quad (0\text{-}2)$$

$$Cl_2(aq) + H2O \leftrightarrow HClO + HCl \quad (0\text{-}3)$$

Mientras que del lado del cátodo se concentran grandes cantidades de H_2:

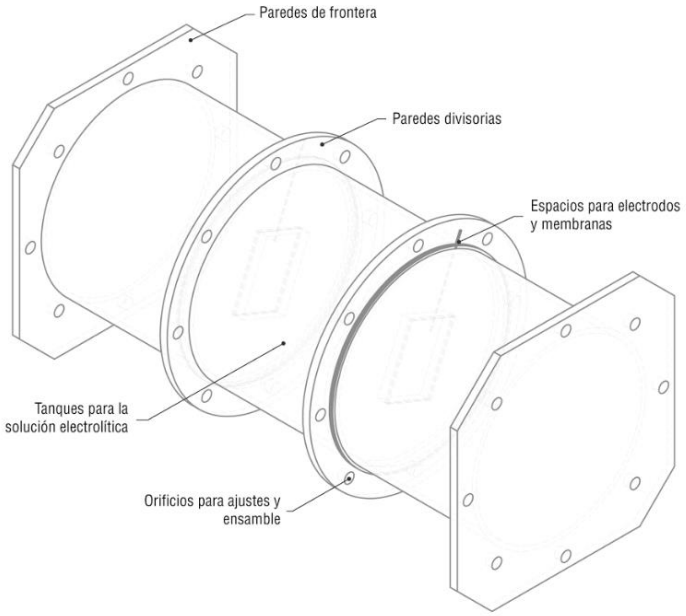
$$H_2O + 2e^- \rightarrow ½\ H_2 + OH^- \quad (0\text{-}4)$$

Las distintas propuestas de estos aparatos fueron diseñados y fabricados con la intensión de encontrar una configuración óptima para la fabricación de la celda que se utiliza en el proceso de electrolisis por corriente directa para la generación de ASO bajo condiciones específicas en el laboratorio respetando los parámetros descritos en la **Tabla 3** para valores del ASO comercial (Microdacyn60®). Posteriormente el ASO obtenida es utilizada como uno de los componentes principales en la generación de los electrolitos acuosos en los ensayos electroquímicos para la generación de capas de NT de TiO_2.

3.5.3. Prototipo 1: Celda para Electrólisis por Corriente Directa.

El esquema y prototipo 1 se presenta en la **Figura 14**.

a)



b)

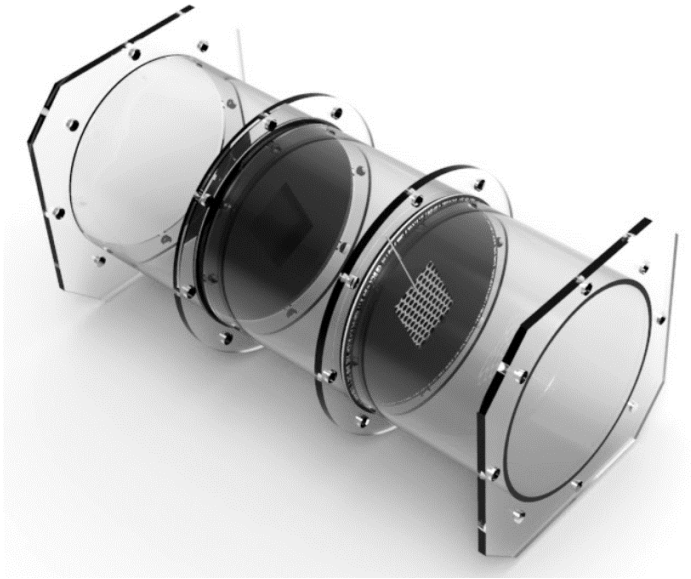


Figura 14. Prototipo 1: Celda Electroquímica para Electrólisis por Corriente Directa.

a) Esquema general, b) Propuesta final.

El prototipo 1 mostrado en la **Figura 14** muestra el arreglo general de la celda, fabricada de acrílico, consta de 3 estaciones cilíndricas las cuales permiten el almacenamiento de la solución salina con una capacidad de 1.3 litros por estación y una capacidad total de 3.9 litros, estas tres estaciones están divididas por paredes que ubican en una posición ideal los electrodos de Ti platinado y las membranas de poliéster para el ánodo y el cátodo. Bombas y mangueras para la agitación de la solución son colocadas entre las estaciones (no mostradas en la **Figura 14**) así como llaves para la salida y entrada de flujo. La **Figura 15** muestra la celda en su configuración final utilizada en el proceso de electrólisis por corriente directa utilizando este prototipo.

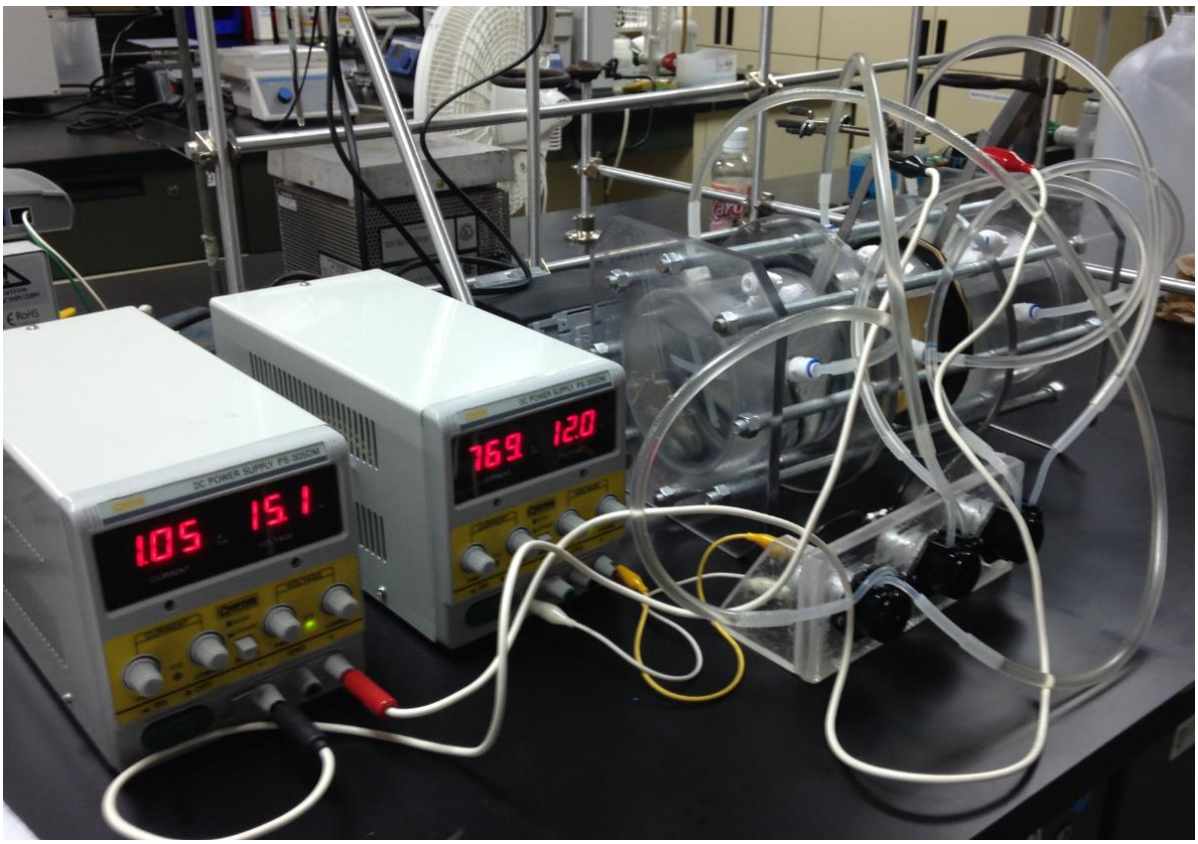


Figura 15. Prototipo 1: Configuración Final.

3.5.4. Prototipo 2: Celda para Electrólisis por Corriente Directa.

El esquema del prototipo 2 se presenta en la **Figura 16**.Esta configuración pretende una mayor rapidez en la manipulación de las soluciones salinas así como el poder tener un mejor acceso durante el monitoreo de sus propiedades durante el proceso de electrolisis por corriente directa. Las cámaras están separadas por paredes de acrílico que no permiten filtraciones gracias a un arreglo donde la membrana y el electrodo de titanio platinado quedan oprimidos sellando los compartimientos por la presión distribuida ejercidas por las paredes entre las cámaras y sellos de neopreno.

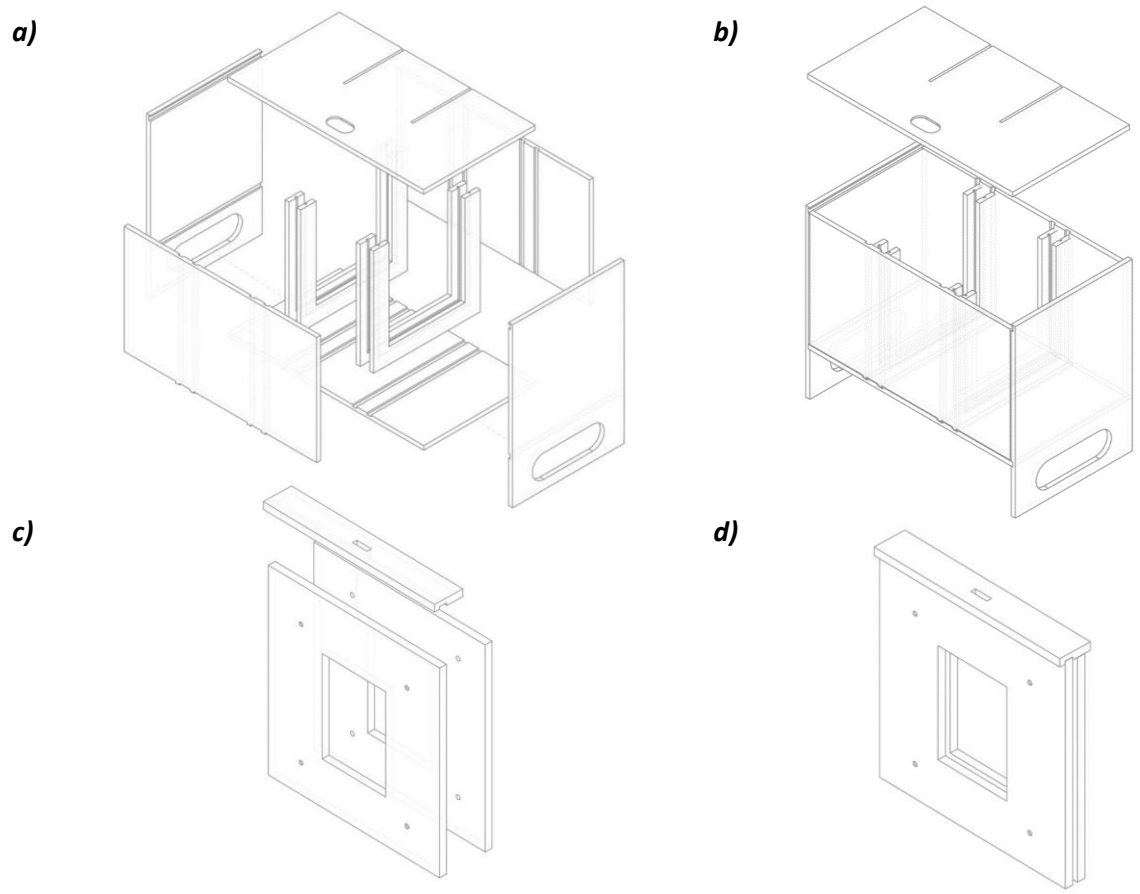


Figura 16. Prototipo 2: Celda Electroquímica para Electrólisis por Corriente Directa.

a) Vista en explosión de componentes principales, b) Vista de ensamble, c) Vista de componentes de paredes divisoras, d) Vista de paredes ensambladas.

La fotografía de la **Figura 17** muestra el prototipo 2 de la celda electroquímica utilizada para la electrólisis por corriente directa para la generación de ASO.

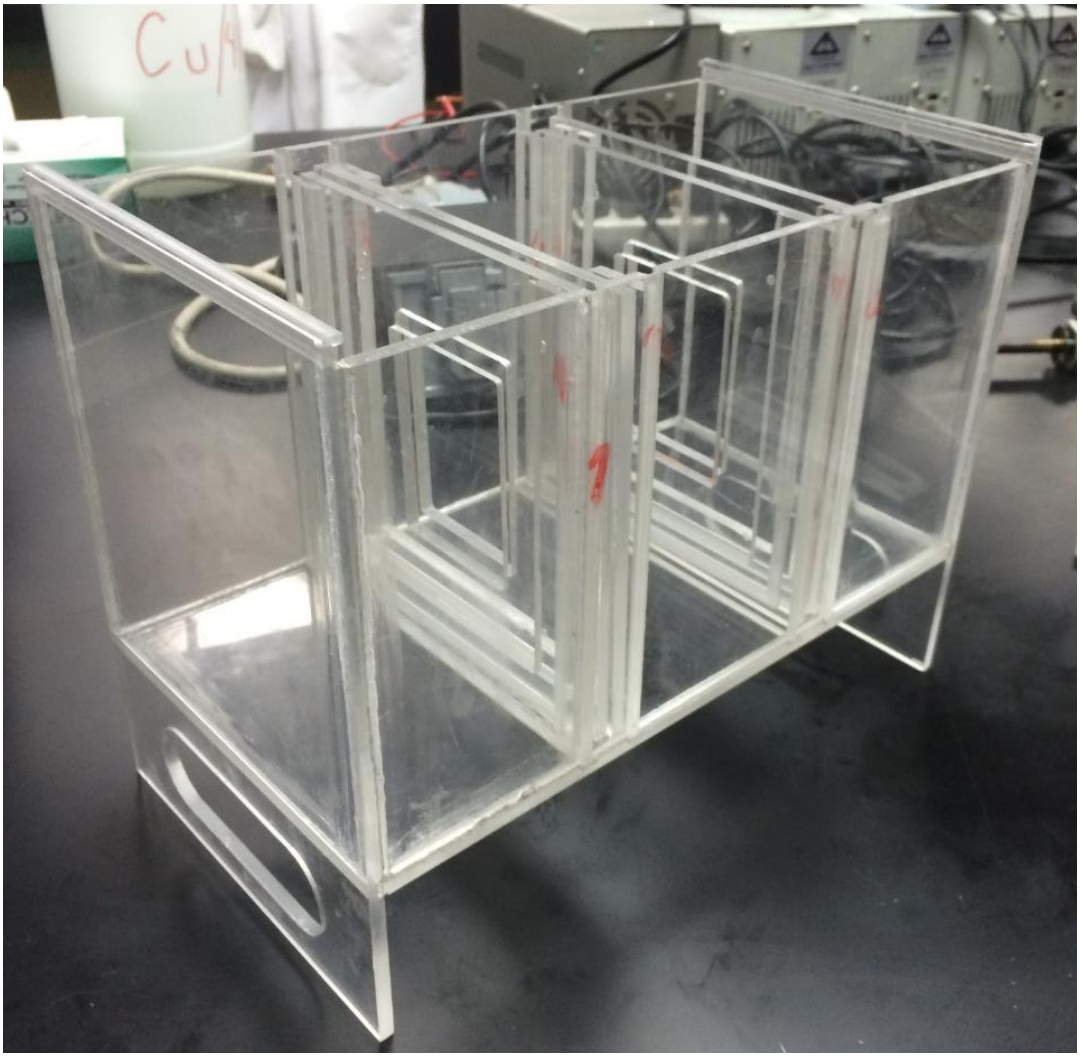


Figura 17. Prototipo 2: Celda Electroquímica para Electrólisis por Corriente Directa.

3.5.5. Prototipo 3: Celda para Electrólisis por Corriente Directa.

El esquema del prototipo 3 se presenta en la **Figura 18**, basándonos en el prototipo 2 esta nueva configuración está diseñada con compartimientos individuales, las membranas de poliéster y el electrodo de titanio platinado quedan oprimidos entre las paredes individuales de cada compartimiento unidas por tornillos de acero inoxidable ejerciendo fuerzas de comprensión distribuidas sobre el perímetro de interface entre los compartimientos sellando y aislando las soluciones.

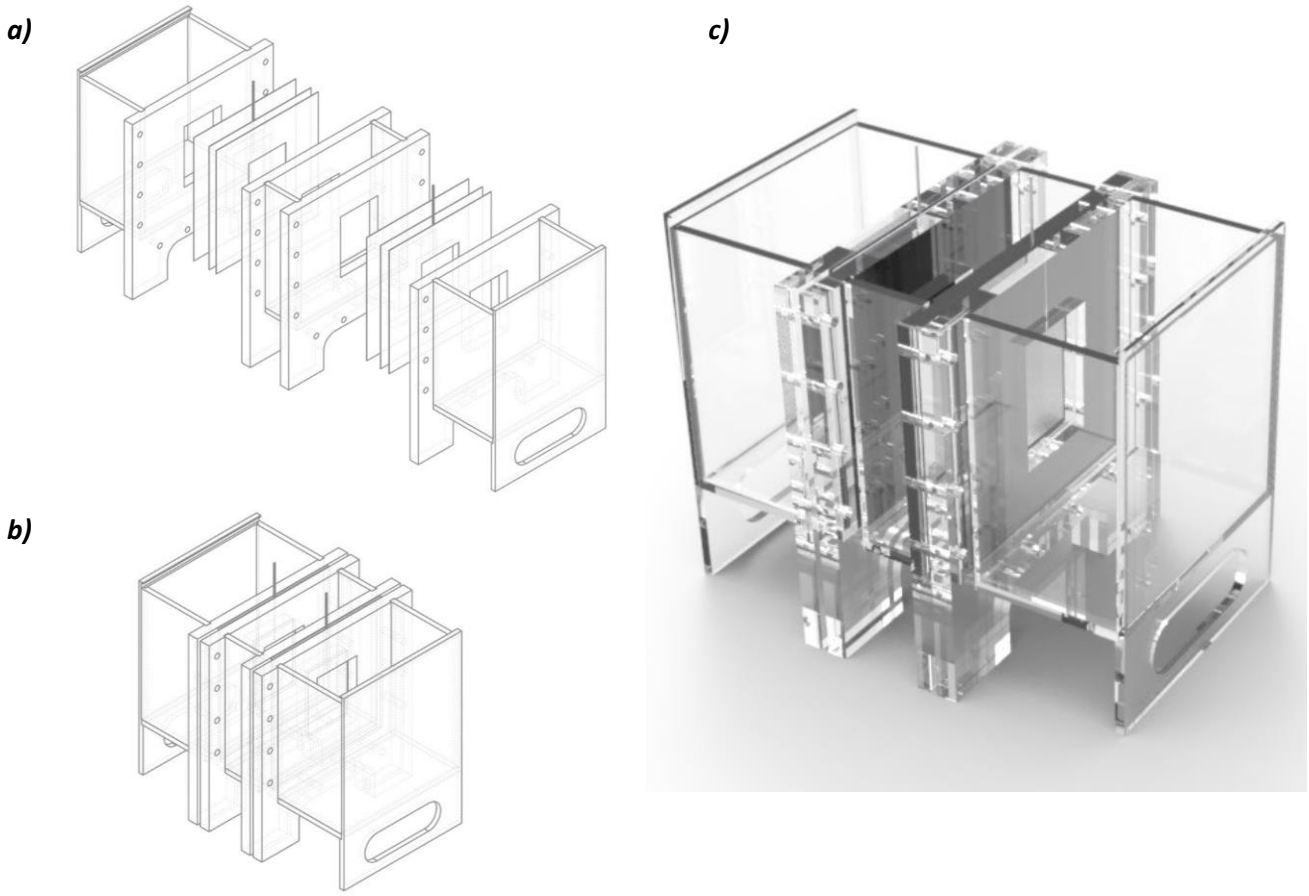
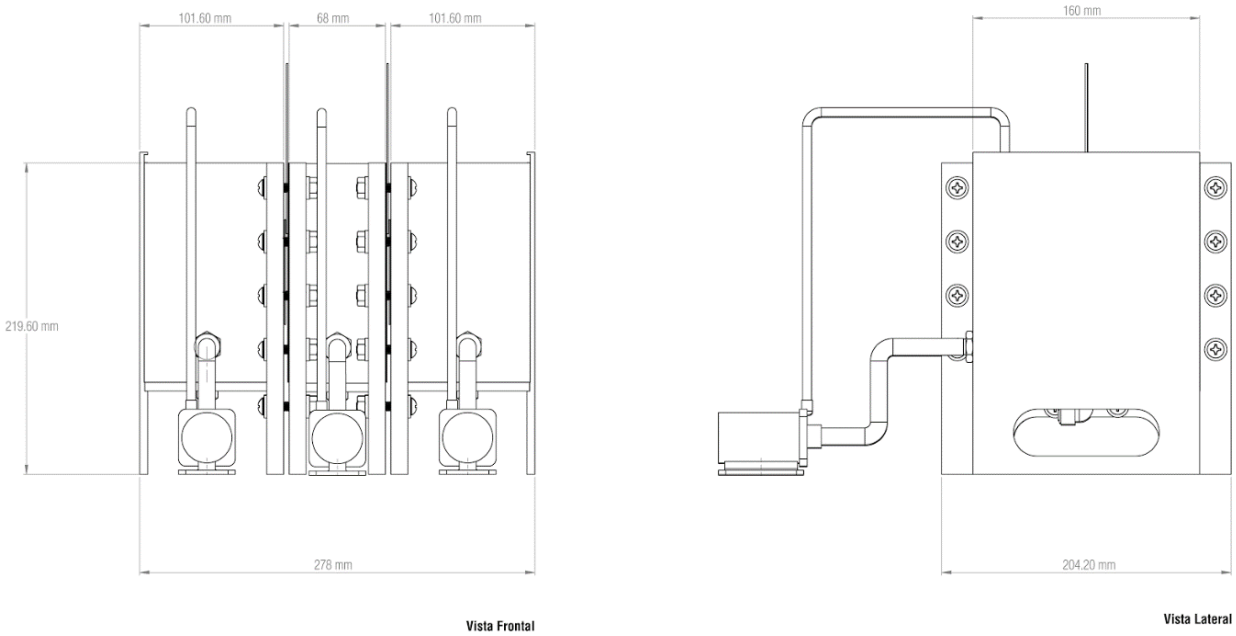


Figura 18. Prototipo 3: Celda Electroquímica para Electrólisis por Corriente Directa.

a) Vista en explosión de componentes principales, b) Vista de ensamble, c) Propuesta final.

El esquema de la **Figura 19** muestra las características físicas y dimensiones básicas del arreglo final de la celda para la generación de ASO.

a)



b)

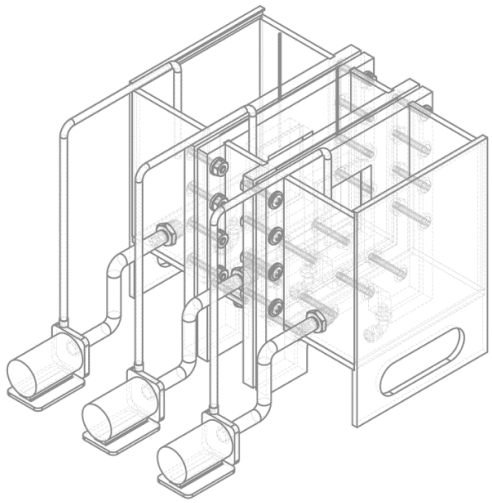


Figura 19. Características Físicas del Arreglo Final de la Celda para la Generación de ASO.

a) Vistas frontales y laterales con dimensiones básicas, b) Vista de ensamble final en isométrico.

El esquema de la **Figura 20** muestra el diagrama detallado del arreglo definitivo de la celda para la generación de ASO.

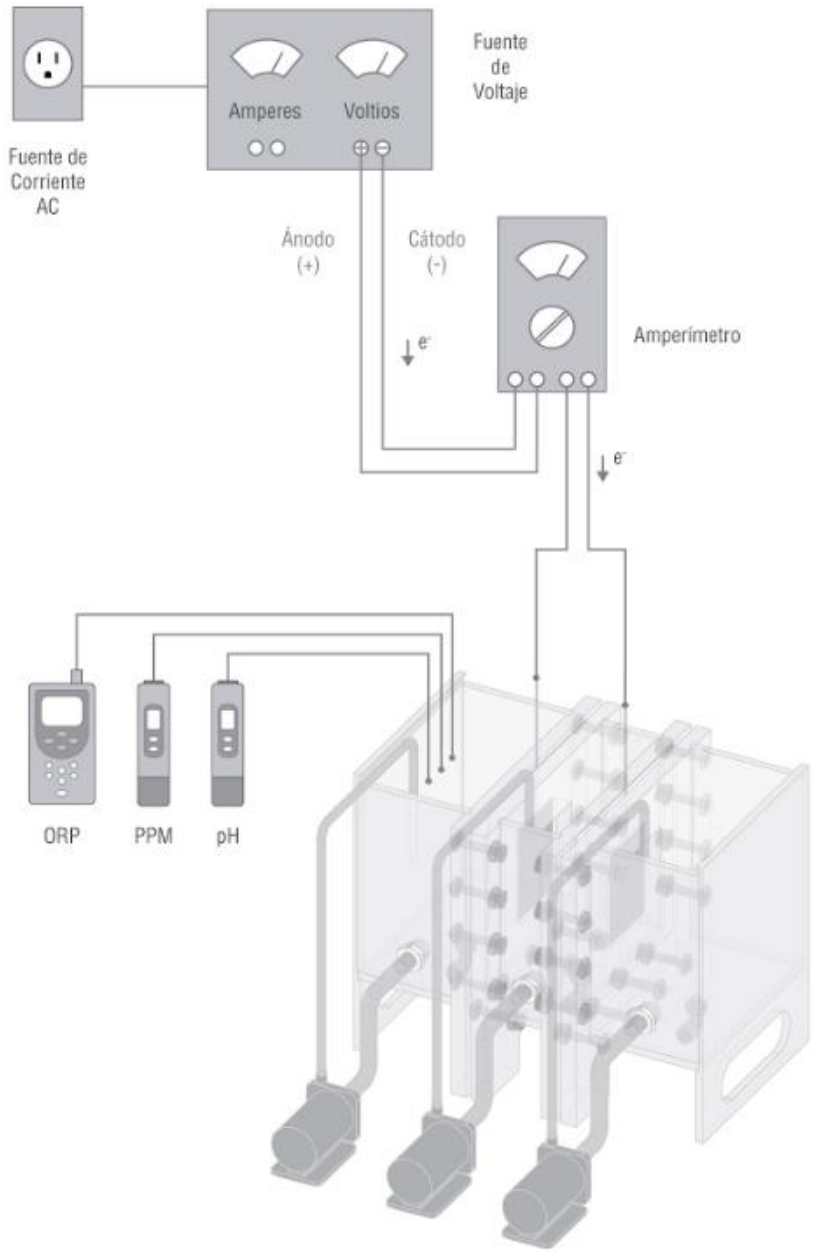


Figura 20. Diagrama Detallado para la Generación de ASO.

La fotografía de la **Figura 21** muestra la celda electroquímica utilizada para la electrólisis por corriente directa para la generación de ASO.

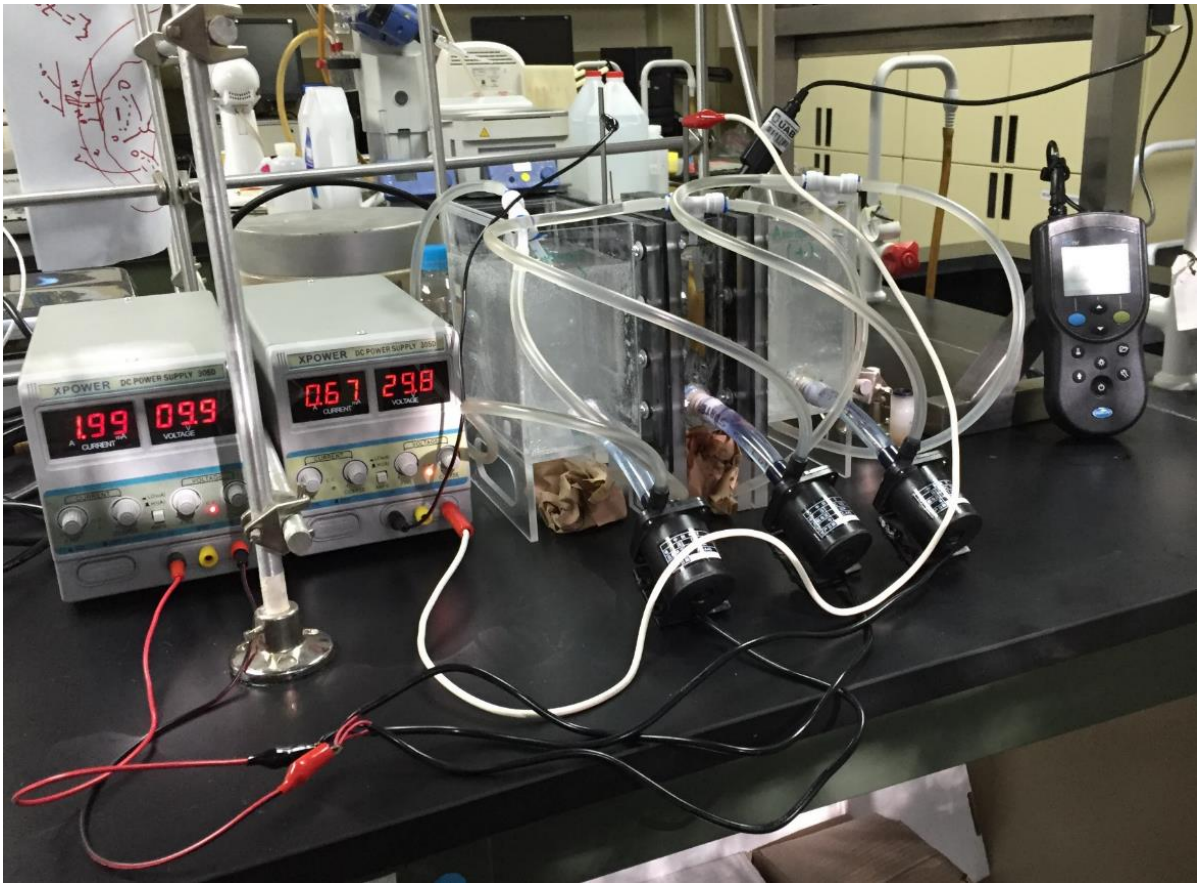


Figura 21. Prototipo 3: Celda Electroquímica para Electrólisis por Corriente Directa.

3.6 Preparación de las Muestras de Ti y Ti_6Al_4V.

Los experimentos de anodizado fueron realizados utilizando muestras de titanio con una composición nominal de 99% Ti (Titanio Grado 2) y la aleación Ti_6Al_4V (Titanio-Aluminio-Vanadio). Las superficies de análisis para las muestras fueron extraídas de barras en frio para la aleación Ti Grado 2 y la aleación Ti_6Al_4V, adicionalmente se obtuvieron muestras de una placa para la aleación Ti_6Al_4V y de láminas respectivamente para ambas aleaciones; obteniendo cupones con una superficie nominal promedio de 1.3 cm^2, con un espesor promedio de 2 mm para los cupones extraídos de la barra y la placa, así como un espesor promedio menor a 0.25 mm para los cupones obtenidos de la lámina, con un área expuesta de aproximadamente 1 cm^2 para la celda electroquímica descrita en la **Figura 22**.

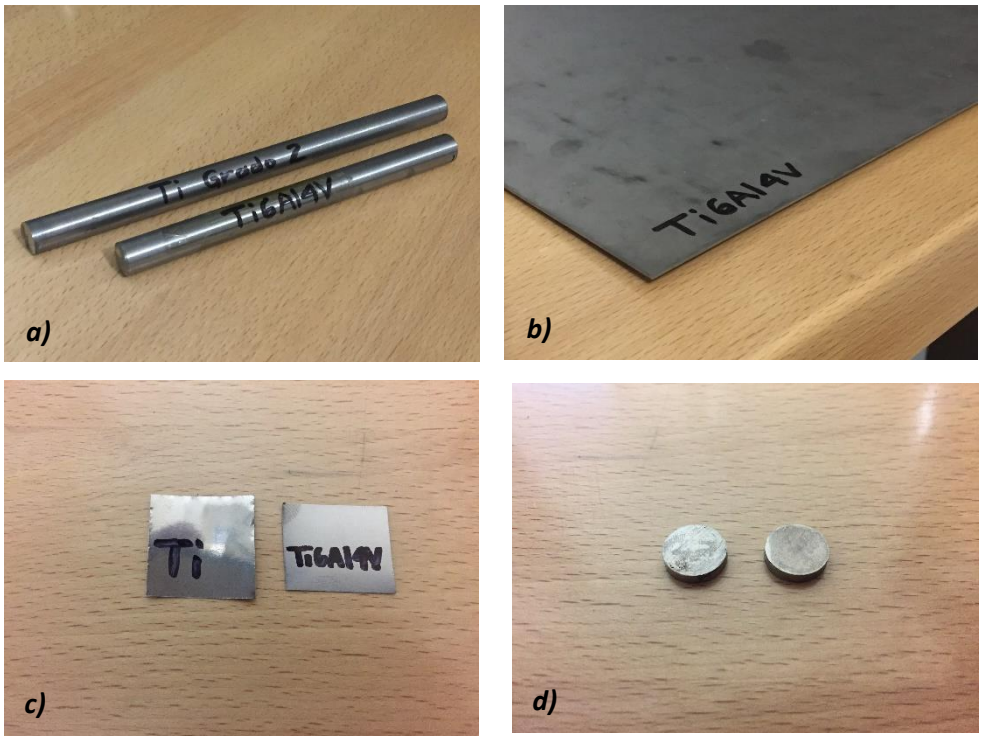


Figura 22. Material base muestras de Ti y Ti_6Al_4V.

a) Barra Ti Grado 2 y Aleación de Ti_6Al_4V, b) Placa aleación Ti_6Al_4V, c) Laminas de Ti y Ti_6Al_4V respectivamente, d) Cupones de Ti y Ti_6Al_4V de 1.3 cm^2 y 2 mm de espesor.

3.6.1 Tratamientos Previos y Posteriores de las Muestras de Ti y Ti_6Al_4V.

El tratamiento previo al anodizado de las muestras utilizadas se realizó de acuerdo al estándar ASTM G1-81 (Preparación, Limpieza y Evaluación de Especímenes en Corrosión). De manera general el proceso se describe a continuación.

Las muestras previamente cortadas se desengrasan en un recipiente con acetona en baño ultrasónico por 10 minutos, la superficie de las muestras se desbastan con papel lija de carburo de silicio iniciando con una rugosidad de 100 y reduciéndola en intervalos comerciales conocidos, ejemplo: 120, 150, 180, 200, respectivamente hasta llegar a una rugosidad de 2000. Posteriormente se pule con alúmina de 0.005 micras hasta obtener un acabado espejo. Después de que el proceso de pulido mecánico fue completado el proceso de enjuague, desengrasado y baño ultrasónico se repite con la intención de eliminar cualquier residuo que pudiera contaminar la superficie generado durante el pulido. Una vez anodizada cada una de las muestras se bañan en el ultrasónico con agua desionizada por 10 minutos para intentar remover cualquier residuo no deseado de la superficie de la capa de óxido recién formada, posteriormente son secadas con aire, el proceso se ilustra en el diagrama de flujo de la **Figura 9**.

3.6.2 Preparación de las capas de TiO_2.

Una vez que las muestras de Ti o la aleación de Ti_6Al_4V están preparadas, se coloca sobre la placa de aluminio (electrodo de trabajo), y utilizando la celda electroquímica descrita en el capítulo 3.5.1 se coloca en posición el contra-electrodo de platino, se vierte dentro de la celda el electrolito acuoso a temperatura ambiente (25 C), y se procede al anodizado. Los experimentos se realizaron por triplicado, la variabilidad de las condiciones y parámetros establecidos de cada uno de los procesos de anodizado para su estudio se describen respectivamente de manera individual en cada sección en su apartado correspondiente en el capítulo 0.

Capítulo 4. Experimentos y Análisis de Resultados.

"Decir que cada especie de cosa esta dotada de una cualidad especifica oculta por la cual actúa y produce efectos manifiestos, equivale a no decir nada; pero derivar de los fenómenos dos o tres principios generales de movimiento, y acto seguido explicar de qué modo se deduce de estos principios manifiestos las propiedades y las acciones de todas las cosas corpóreas, sería dar un gran paso."

Isaac Newton, Óptica.

El presente capitulo muestra los resultados obtenidos en la caracterización de superficies de NT de TiO_2 utilizando el método de anodización electroquímica. Los diferentes parámetros utilizados derivados de los diseños de experimentos, voltaje, corriente, tiempo, formulación electrolítica y tipo de aleación serán explicados a detalle en este capítulo en su respectiva sección.

4.1 Panorama General de Experimentación.

Las principales contribuciones del presente estudio son el de reducir los tiempos de anodizado en la síntesis de NT que actualmente envuelven tiempos superiores a los 30 minutos, los rangos propuestos son de: 20, 10 y 5 minutos. Los potenciales aplicados generalmente se encuentran entre los valores o incrementos lineales constantes entre los 60 y 20 V, en este sentido se proponen potenciales constantes o incrementos lineales entre los valores de 5 a 30 V, los potenciales propuestos se basan en las características únicas que el ASO puede otorgar en la formación, arreglo y propiedades físicas de los NT de TiO_2 sobre la superficie, es importante definir la composición del electrolito, las variaciones en los porcentajes de contenidos de ASO y etilenglicol en la solución con especial interés en la obtención de capas de NT de TiO_2 manteniendo concentraciones bajas en contenidos de NH_4F (<0.1%M).

4.2 Diseño de Experimentos para Soluciones Electrolíticas y Resultados Previos.

A continuación se muestran los parámetros base para el estudio de las soluciones electrolíticas para cada 100 ml de solución, las combinaciones propuestas derivadas del diseño de experimentos y los estudios previos realizados, los detalles de estos estudios previos se muestran en la referencia: [15].

4.2.1 Soluciones Electrolíticas Acuosas Base ASO.

El diseño de experimentos fue utilizando la metodología Taguchi para 10 factores a 3 niveles y se muestra a continuación en la **Tabla 4** [15].

Tabla 4. Definición de niveles y factores [15]**.**

Factor	Variable	Definición	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
1	A	% de Etilenglicol-Agua Súper Oxidada (ml)	50-50	25-75	0-100
2	B	Tiempo (min)	5	10	20
3	C	Soluto (gr)	0.25	0.5	0.75
4	D	Voltaje (V)	20	40	60
5	AB	Interacciones entre factores independientes			
6	BC				
7	BD				
8	AC				
9	CD				
10	AD				

El resultado del diseño de experimentos propone las soluciones de la **Tabla 5**, y el arreglo mostrado en la **Tabla 6** muestra las interacciones a los distintos niveles para cada factor independiente. La **Tabla 5** muestra las soluciones propuestas en este estudio y de las cuales se desprenden las soluciones utilizadas en la presente investigación.

Tabla 5. Tabla de Soluciones Propuestas *[15]*.

Solución	Soluto NH_4F (gr)	Etilenglicol (ml)	ASO (ml)
1	0.25	50	50
2	0.5	50	50
3	0.75	50	50
4	0.75	25	75
5	0.25	25	75
6	0.50	25	75
7	0.50	0	100
8	0.75	0	100
9	0.25	0	100

4.2.2 Resultados Experimentales Previos.

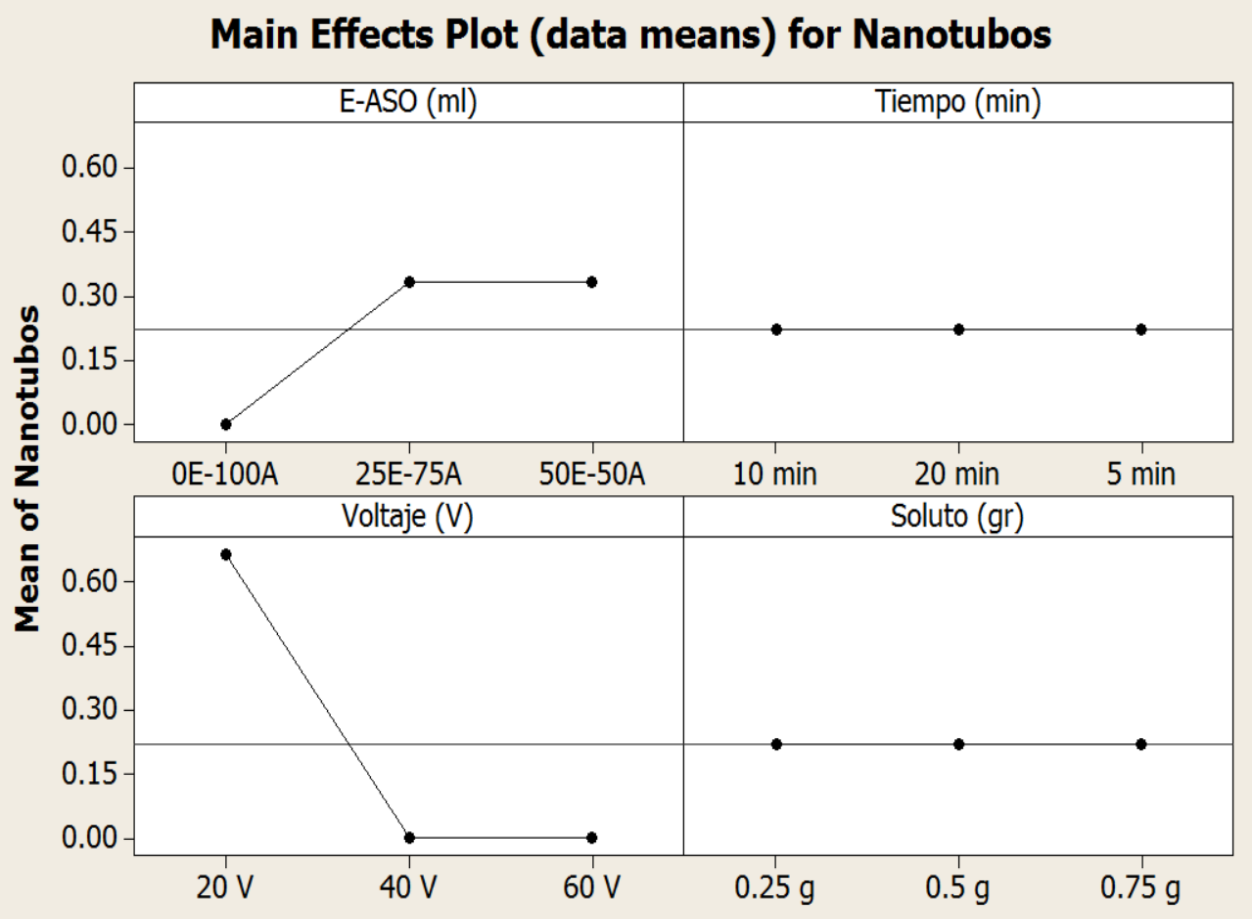
Los resultados que se muestran a continuación son el resumen del análisis presentado en la referencia [15], resultados base y continuación del presente estudio. Definidos los factores dependientes e independientes de las soluciones electrolíticas utilizando la metodología Taguchi se propone un arreglo L27 para 10 factores a 3 niveles, con un factor de respuesta (nanotubos) y se realizan los ensayos electroquímicos como lo muestra la **Tabla 6** para a aleación Ti_6Al_4V.

El análisis estadístico (media de los efectos principales e interacción de las medias) se realizó utilizando la herramienta MiniTAB 14, la **Tabla 7** y **Tabla 8** muestra los resultados gráficos obtenidos de los experimentos electroquímicos propuestos en la **Tabla 6** para la obtención de capas de TiO_2 con NT y define las soluciones electrolíticas optimas que son utilizadas en el presente estudio para la modificaciones superficial del Ti y la aleación Ti_6Al_4V, mostradas en la **Tabla 10** y **Tabla 11**.

Tabla 6. Factores dependientes e independientes, arreglo L27 para 10 factores 3 niveles [15]**.**

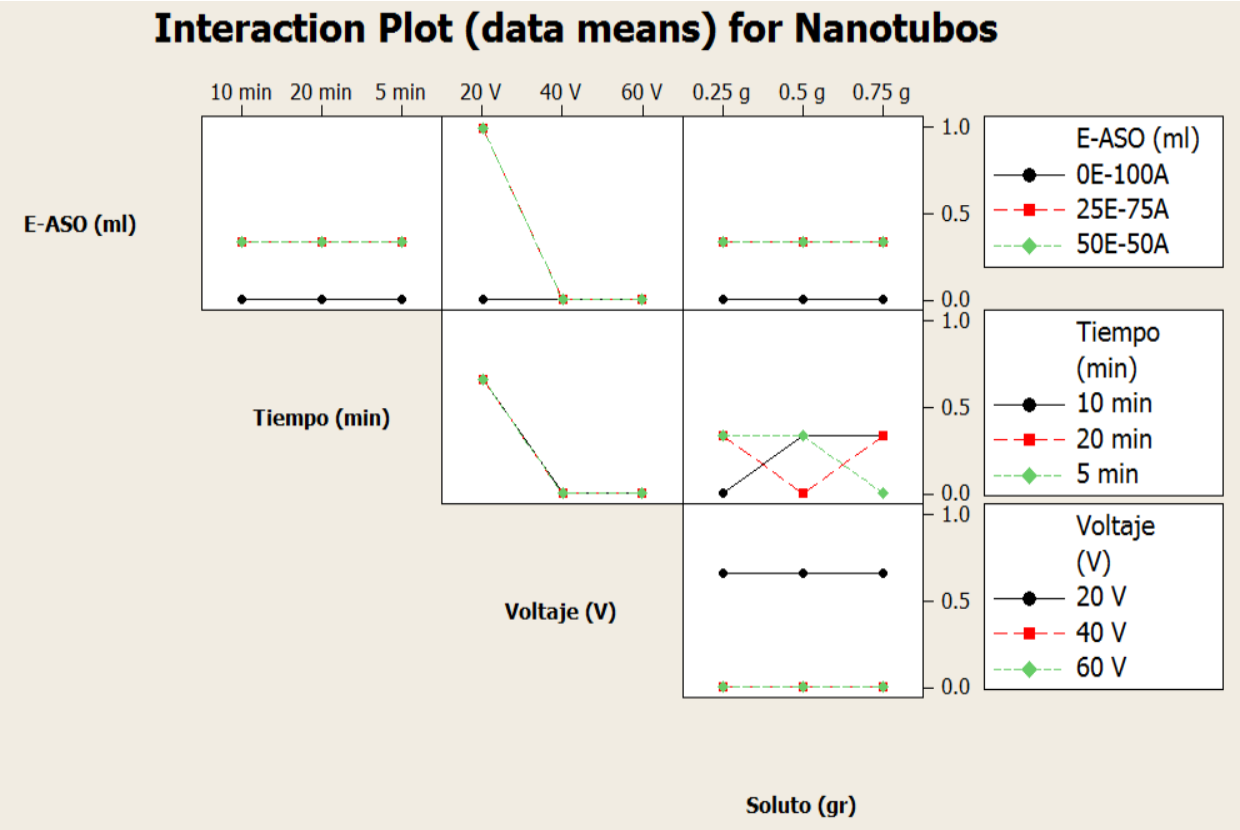
Numero			A	B	D	C	Y_1
Experimento	**Muestra**	**Solución**	**Relación E-ASO (ml)**	**Tiempo de Anodizado (min)**	**Voltaje (V)**	**Soluto (gr)**	**Nanotubos**
1	M1	1	50E-50ASO	5 min	20 V	0.25 g	Si
2	M2	2	50E-50ASO	5 min	40 V	0.5 g	No
3	M3	3	50E-50ASO	5 min	60 V	0.75 g	No
4	M4	3	50E-50ASO	10 min	40 V	0.75 g	No
5	M5	1	50E-50ASO	10 min	60 V	0.25 g	No
6	M6	2	50E-50ASO	10 min	20 V	0.5 g	Si
7	M7	2	50E-50ASO	20 min	60 V	0.5 g	No
8	M8	3	50E-50ASO	20 min	20 V	0.75 g	Si
9	M9	1	50E-50ASO	20 min	40 V	0.25 g	No
10	M10	4	25E-75ASO	5 min	40 V	0.75 g	No
11	M11	5	25E-75ASO	5 min	60 V	0.25 g	No
12	M12	6	25E-75ASO	5 min	20 V	0.5 g	Si
13	M13	6	25E-75ASO	10 min	60 V	0.5 g	No
14	M14	4	25E-75ASO	10 min	20 V	0.75 g	Si
15	M15	5	25E-75ASO	10 min	40 V	0.25 g	No
16	M16	5	25E-75ASO	20 min	20 V	0.25 g	Si
17	M17	6	25E-75ASO	20 min	40 V	0.5 g	No
18	M18	4	25E-75ASO	20 min	60 V	0.75 g	No
19	M19	7	0E-100ASO	5 min	60 V	0.5 g	No
20	M20	8	0E-100ASO	5 min	20 V	0.75 g	No
21	M21	9	0E-100ASO	5 min	40 V	0.25 g	No
22	M22	9	0E-100ASO	10 min	20 V	0.25 g	No
23	M23	7	0E-100ASO	10 min	40 V	0.5 g	No
24	M24	8	0E-100ASO	10 min	60 V	0.75 g	No
25	M25	8	0E-100ASO	20 min	40 V	0.75 g	No
26	M26	9	0E-100ASO	20 min	60 V	0.25 g	No
27	M27	7	0E-100ASO	20 min	20 V	0.5 g	No

Tabla 7. Media de los efectos principales para la obtención de NT.



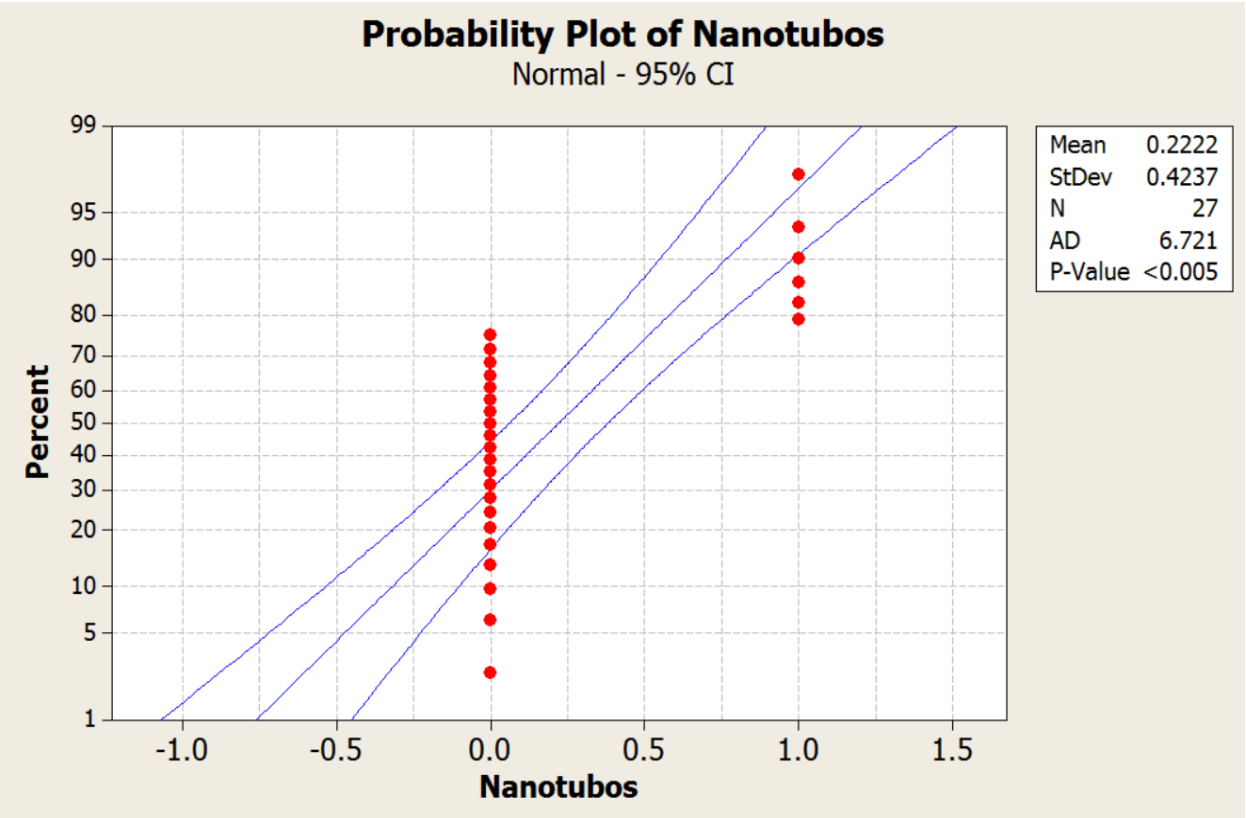
Bajo el único factor de respuesta para estos experimentos, el lograr capas NTs de TiO_2 bajo las condiciones antes señalas, el análisis de los efectos principales nos indica que para las soluciones electrolíticas en concentraciones de 25E-75A y 50E-50A, a potenciales de 20 V, es como se logran obtener resultados favorables para la obtención de estas capas. Independientemente del tiempo y la cantidad de soluto disuelto en la solución.

Tabla 8. Interacciones de las medias para la obtención de NT.



Las interacciones de la medias nos confirman lo anteriormente expuesto y nos ofrecen mayor información respecto a las combinaciones de las variables para la obtención de resultados favorables. Las soluciones electrolíticas que contienen proporciones en los rangos de 25E75A y 50E-50A, a potenciales de 20 V, y dependiendo el tipo de solución electrolítica los rangos de tiempo son los propuestos de 5 a 20 min e independientes para el tipo de solución.

Tabla 9. Grafica de probabilidad para la obtención de NT.



La grafica de probabilidad nos muestra el valor de la media y la desviación estándar para estos experimentos, así como nos indica la probabilidad de ocurrencia para el total de los 27 experimentos realizados. Valores no significativos debido a la naturaleza de los resultados de estos experimentos. Los valores de los análisis estadísticos serán analizados e interpretados en un mayor detalle en el capítulo 4.11.

De estos análisis se resume en la **Tabla 10** los resultados óptimos y se listan los experimentos para la obtención de capas de NT de TiO_2 así como las soluciones en la **Tabla 11**.

Tabla 10. Resumen de ensayos óptimos para la obtención de NT.

Numero			A	B	D	C	Y_1
Experimento	**Muestra**	**Solución**	**Relación E-ASO (ml)**	**Tiempo de Anodizado (min)**	**Voltaje (V)**	**Soluto (gr)**	**Nanotubos**
1	M1	1	50E-50ASO	5 min	20 V	0.25 g	Si
6	M6	2	50E-50ASO	10 min	20 V	0.5 g	Si
8	M8	3	50E-50ASO	20 min	20 V	0.75 g	Si
12	M12	6	25E-75ASO	5 min	20 V	0.5 g	Si
14	M14	4	25E-75ASO	10 min	20 V	0.75 g	Si
16	M16	5	25E-75ASO	20 min	20 V	0.25 g	Si

Tabla 11. Soluciones óptimas para la obtención de NT utilizando ASO.

Solución	Soluto NH_4F (gr)	Etilenglicol (ml)	ASO (ml)
1	0.25	50	50
2	0.5	50	50
3	0.75	50	50
4	0.75	25	75
5	0.25	25	75
6	0.50	25	75

De los resultados mostrados en **Tabla 10** se concluyen las soluciones a estudiar y quedan definidos los parámetros óptimos para la obtención de capas de NT de TiO_2 en la aleación Ti_6Al_4V. De estas soluciones y parámetros se derivarán nuevos experimentos que evaluarán la obtención de capas de TiO_2 para Ti y la aleación Ti_6Al_4V, así como la creación en el laboratorio y utilización de ASO para las soluciones electrolíticas definidas en la **Tabla 11**, y base de los siguientes experimentos.

4.3 Anodización Electroquímica: Efectos de la Variación en el Tiempo, Ti_6Al_4V.

La **Tabla 12** muestra el resumen general de los experimentos realizados por triplicado con variación en el tiempo, voltaje y solución electrolítica constante, para la aleación Ti_6Al_4V. Los resultados por espectroscopia por difracción de rayos X o XPS indican claramente que la formación de la capa de óxido está compuesta principalmente por Ti. Los resultados obtenidos por microscopia electrónica de barrido o SEM indican que la formación de la capa de TiO_2 que se forma en los primeros minutos del proceso **Figura 23** (1 min) logra imprimir sobre la superficie de la capa de óxido las primeras líneas que promueve el crecimiento de nano-estructuras tubulares, logrando en los siguientes minutos (5 min) crear capas de nano-poros o NT, como se muestra en la **Figura 24**. Sin embargo, con el incremento del espesor de la capa de óxido se origina la caída de corriente, ocasionando que la disolución química de la capa de óxido tenga mayor influencia en los minutos restantes **Figura 25** (10 min) logrando diluir la nano-estructura antes de su consolidación, solo dejando ver la impresión de las primeras capas donde se logra apreciar incrementos en formación tubular, pero que debido al corto periodo de tiempo esta no logra formase en su totalidad. Este comportamiento puede atribuirse a la concentración de NH_4F en la solución electrolítica 50E-50ASO, que para tiempos cortos (T<10 min) se estarían sugiriendo menores concentraciones de NH_4F (NH_4F<0.5) disuelto en solución, mismos que han demostrado tener mejores resultados. Debido a la resolución de las imágenes estos resultados no se consideran concluyentes para las condiciones dadas y se realizan otros estudios, presentados en el 4.4.

Tabla 12. Experimentos: variación en el tiempo.

Numero			A	B	Y_1
Experimento	**Muestra Ti_6Al_4V**	**Solución**	**Tiempo de Anodizado (min)**	**Voltaje (V)**	**Nanotubos**
1	M1	2	5 min	20 V	No
2	M2	2	10 min	20 V	Si
3	M3	2	20 min	20 V	No

Tabla 13. Muestra 1: variación en el tiempo.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos
1	M1	2	1	20	No

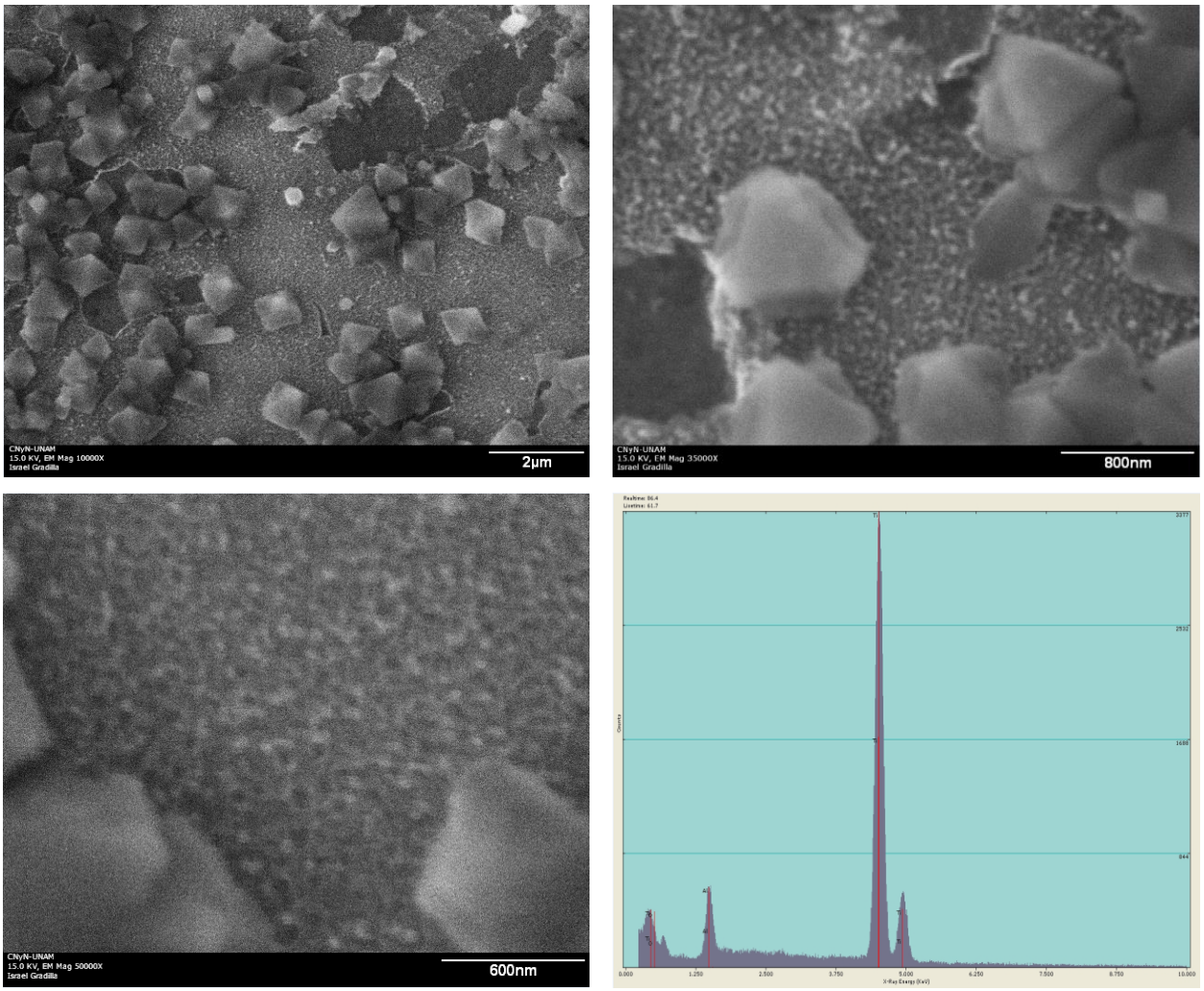


Figura 23. Muestra M1, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 1 min a 20V (SEM y EDX).

Tabla 14. Muestra 2: variación en el tiempo.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos
2	M2	2	5	20	Si

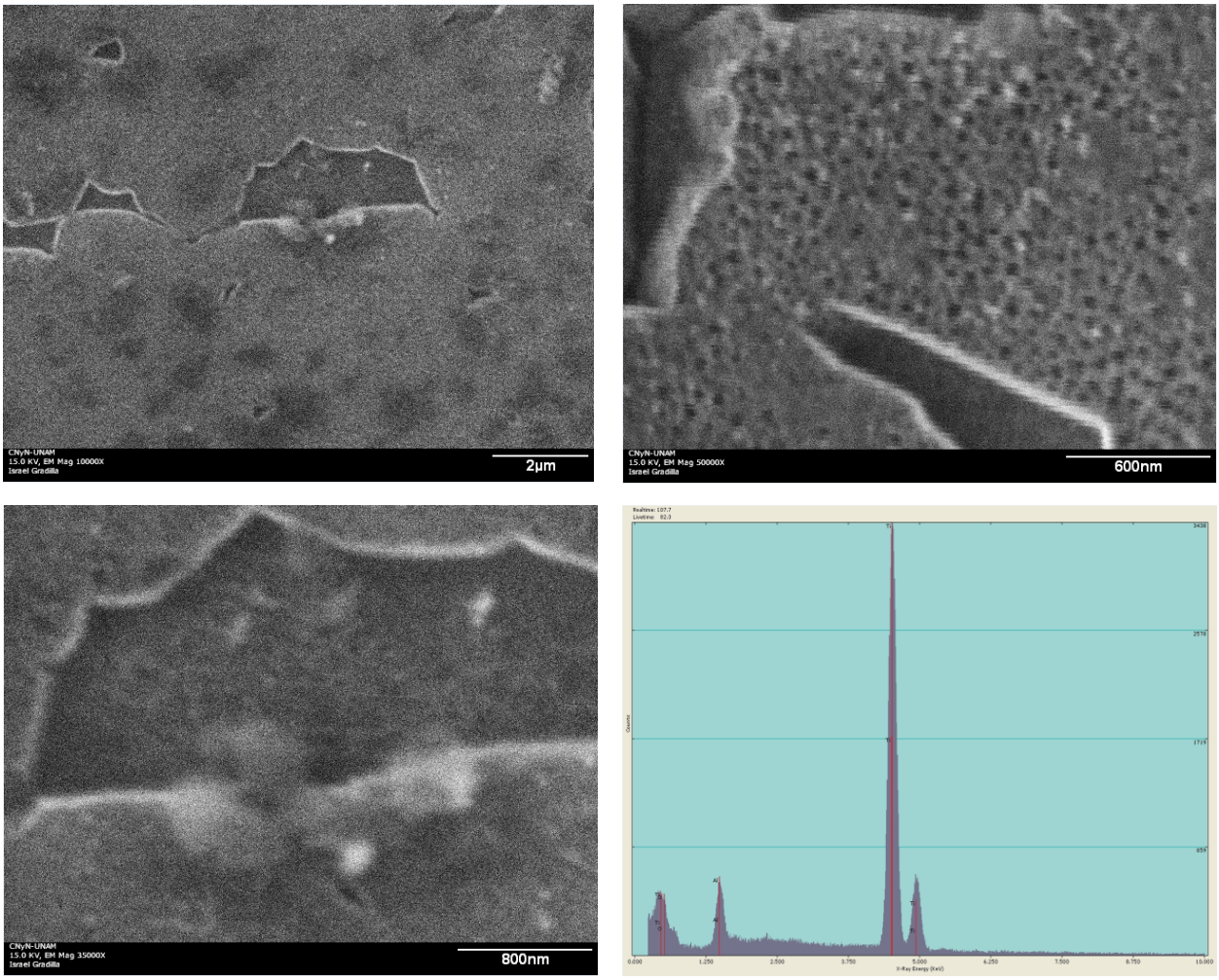


Figura 24. Muestra M2, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 5min a 20V (SEM y EDX).

Tabla 15. Muestra 3: variación en el tiempo.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1
Experimento	**Muestra**	**Solución**	**Tiempo de Anodizado (min)**	**Voltaje (V)**	**Nanotubos**
3	**M3**	**2**	**10**	**20**	**No**

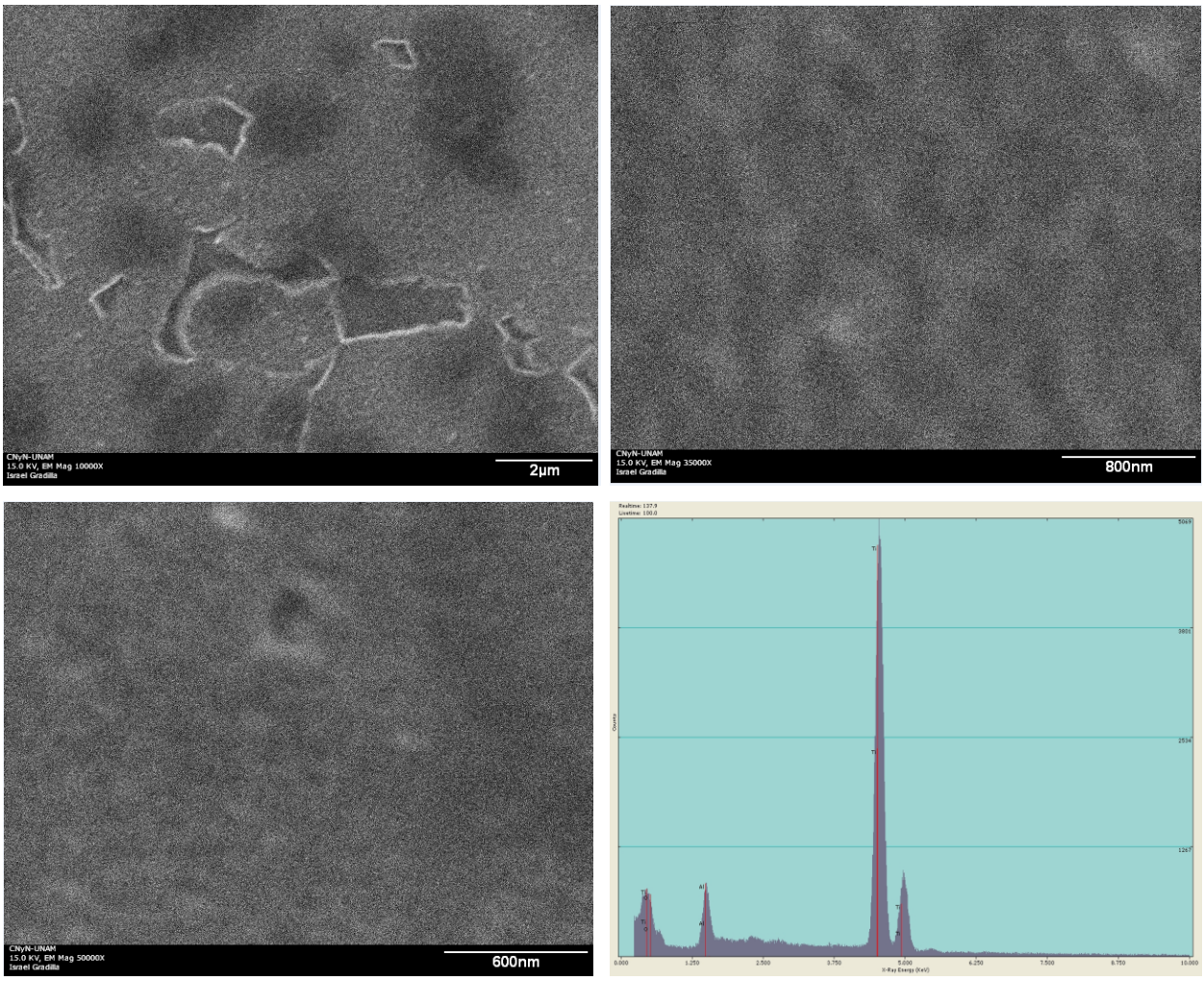


Figura 25. Muestra M3, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 10min a 20V (SEM y EDX).

4.4 Anodización Electroquímica: Parámetros Constantes Ti y Ti_6Al_4V.

Los siguientes experimentos evalúan el anodizado electroquímico sobre Ti y la aleación Ti_6Al_4V a parámetros constantes como lo sugieren los resultados del experimento 2 de la **Tabla 12**, potencial 20 V, tiempo 10 min, solución electrolítica 2, para la obtención de capas de NT de TiO_2, cada uno de estos experimentos se realizó por triplicado.

Tabla 16. Muestra 4: condiciones constantes (Ti_6Al_4V).

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetros de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
4	M4	2	10	20	100	460	12	1.5

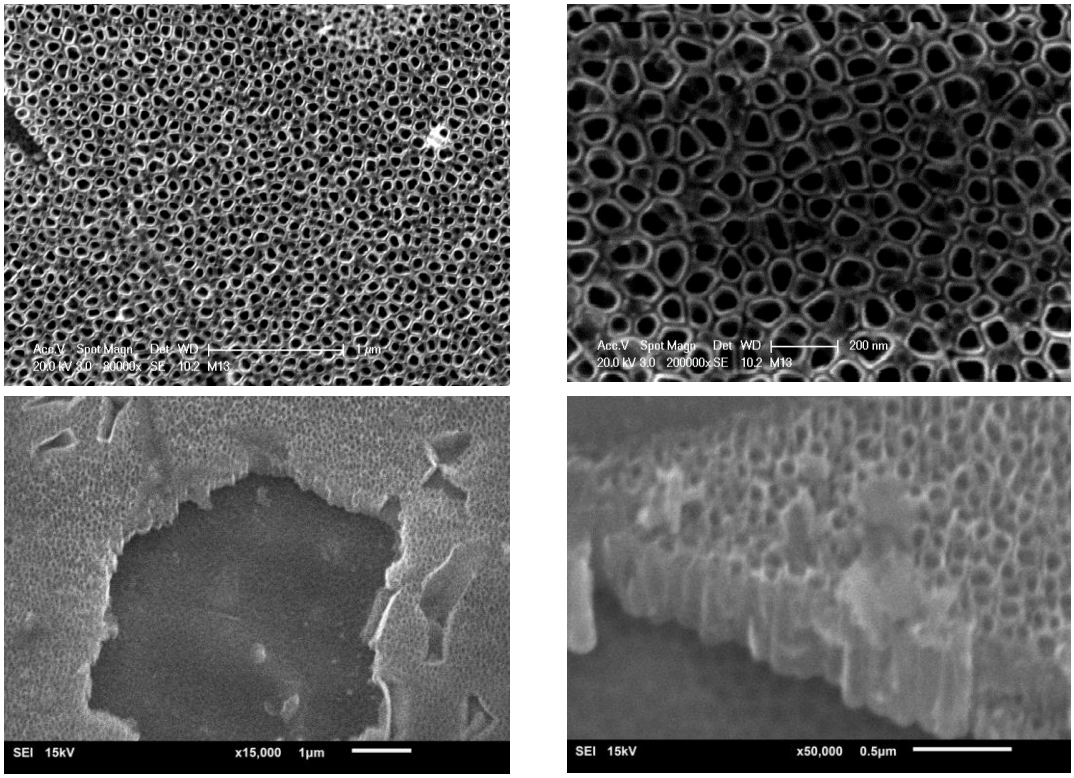


Figura 26. Muestra M4, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 10min a 20V (SEM).

Tabla 17. Muestra 5: condiciones constantes (Ti).

Aleación: Ti			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetros de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
5	M5	2	10	20	100	460	12	1.5

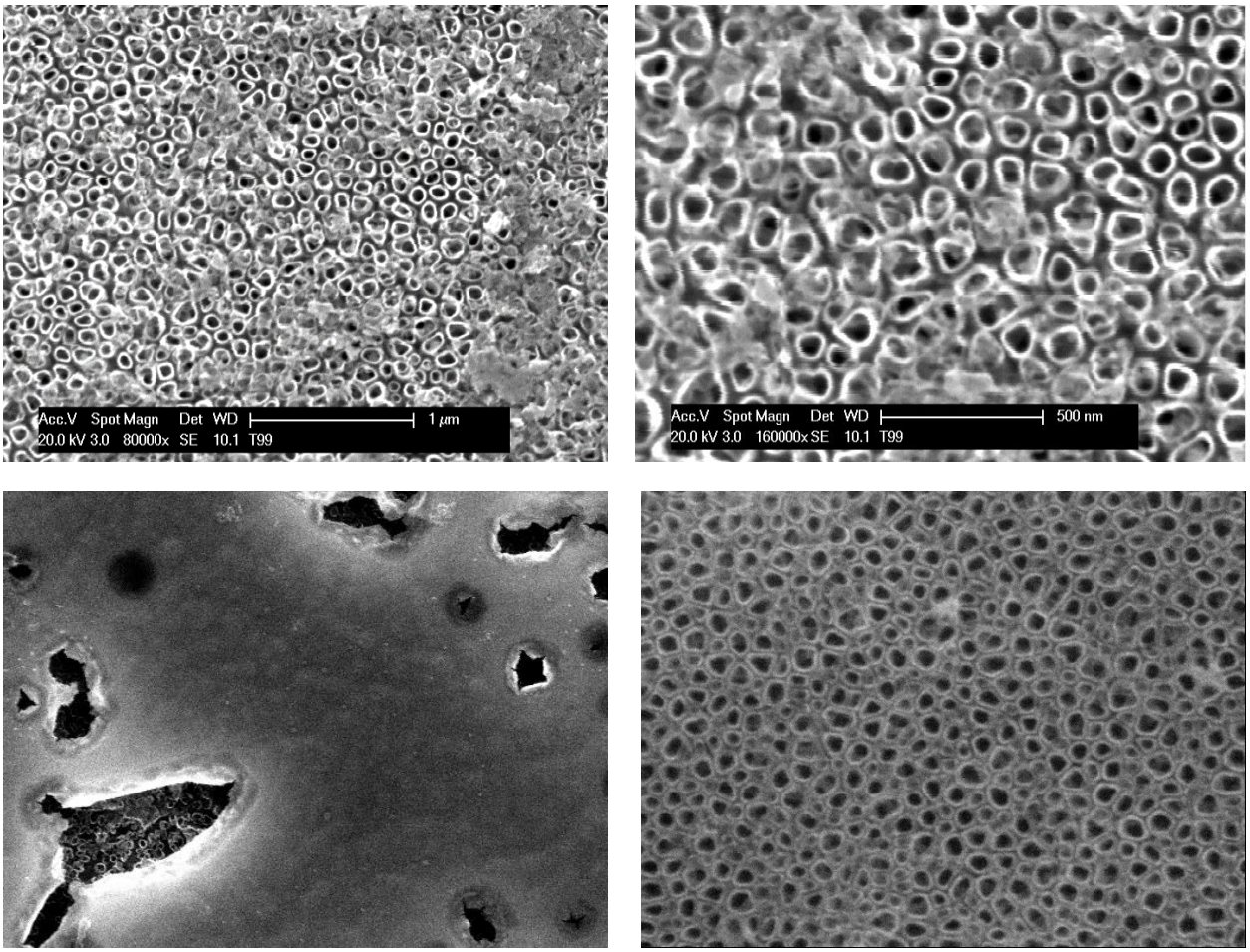


Figura 27. Muestra M5, aleación Ti, solución 2, 10min a 20V (SEM).

Los estudios de los resultados obtenidos por SEM muestran diámetros promedio de nanotubos en el rango de los 90-100 nm, con espesores de pared de 10-12nm y longitudes promedio de NT de 450 a 500 nm. La densidad de NT se midió directamente de la capa de TiO_2, obteniendo resultados entre los valores promedio de 1. 5 a 1.65 gr.cm^3. Los resultados son muy similares para Ti y la aleación Ti_6Al_4V, confirmando la obtención de NT de TiO_2 con estos parámetros.

4.4.1 Resultados por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).

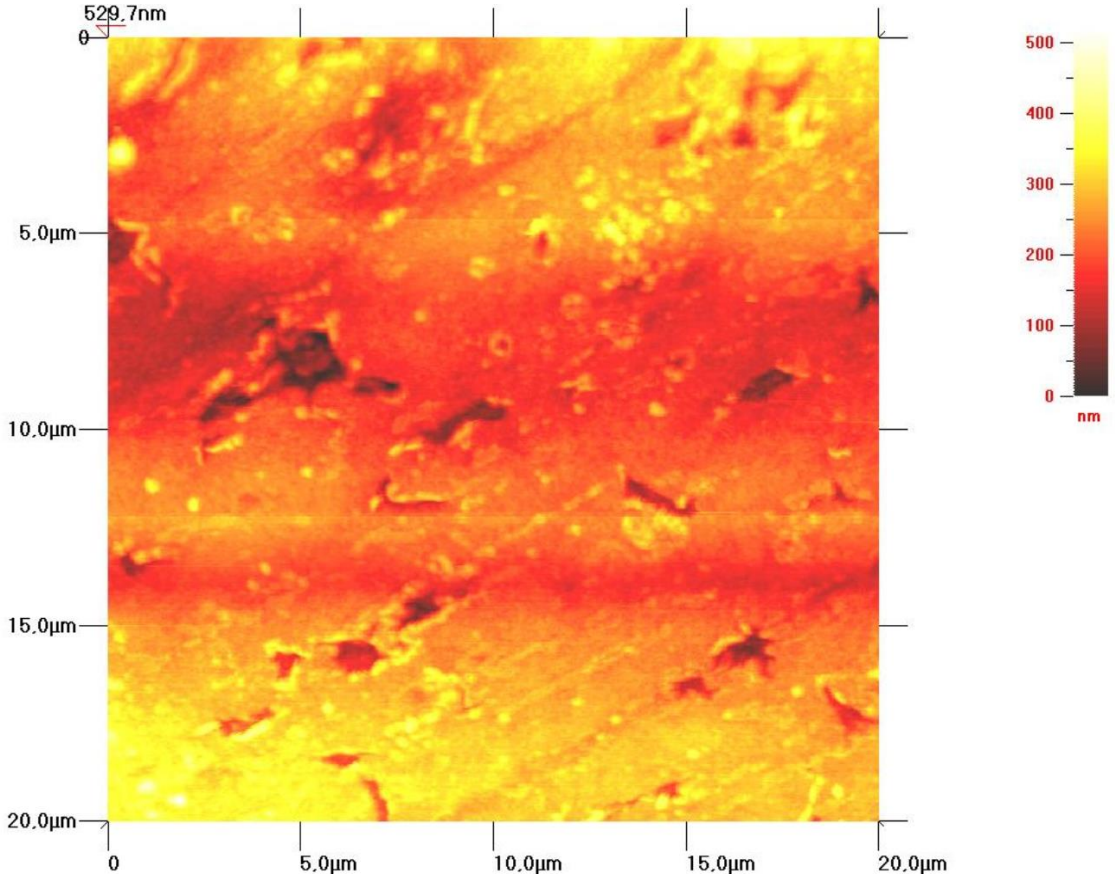


Figura 28. Muestra M4, aleación Ti_6Al_4V, rugosidad promedio 200 a 300 nm (AFM).

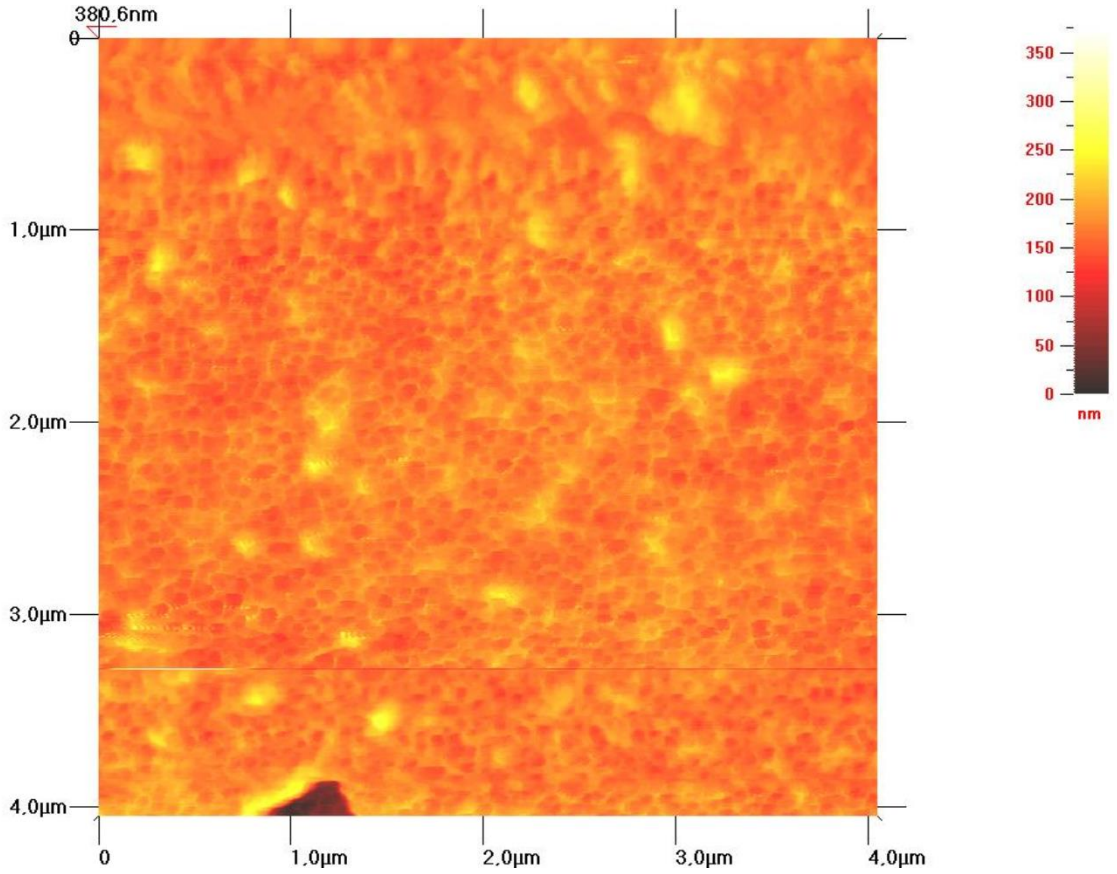


Figura 29. Muestra M5, aleación Ti, rugosidad promedio 200 a 300 nm (AFM).

La microscopia de fuerza atómica o AFM muestra resultados en los valores promedio de la rugosidad de la superficie medidos de ambas muestran en los rangos de los 200 a 300 nm, confirmando los valores obtenidos por SEM. La **Figura 28** nos muestra la topografía y las dimensiones medidas para la muestra de Ti_6Al_4V y la **Figura 29** para la muestra de Ti. Ambas microscopias fueron realizadas sobre las superficies anodizadas con los parámetros descritos en la **Tabla 16** y **Tabla 17** respectivamente.

4.5 Anodización Electroquímica: Variabilidad Electrolítica Ti y Ti_6Al_4V.

Los experimentos realizados y descritos en la sección 4.2 muestran resultados claros sobre las soluciones electrolíticas óptimas para la generación de capas de NT de TiO_2 en los rangos propuestos, ahora en esta sección evaluaremos algunos de estos resultados obtenidos variando los parámetros en el contenido de soluto en las soluciones electroquímicas así como el uso de ASO y agua desionizada para la anodización de la aleación Ti_6Al_4V, buscando conocer la influencia de la variación en las concentraciones de soluto en solución así como la aportación o variabilidad que tiene del uso de soluciones base ASO o agua desionizada, utilizando tiempos cortos de 5 min.

Tabla 18. Soluciones electrolíticas variabilidad de parámetros.

Solución	Soluto NH_4F (gr)	Etilenglicol (ml)	ASO (ml)	Agua Desionizada (ml)
2	0.5	50	50	0
10	0.5	50	0	50
11	0	0	50	0
12	0	50	50	0
13	0	0	0	50

Para las soluciones descritas en la **Tabla 18** se realizaron anodizados con diferentes valores de potencial, estos valores serán descritos en cada una de las tablas correspondientes para cada anodizado. Cada experimento se realizó por triplicado. Los resultados son como se explican a continuación.

Tabla 19. Muestra 6: variabilidad de parámetros (Ti_6Al_4V).

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos
6	M6	2	5	5	Si

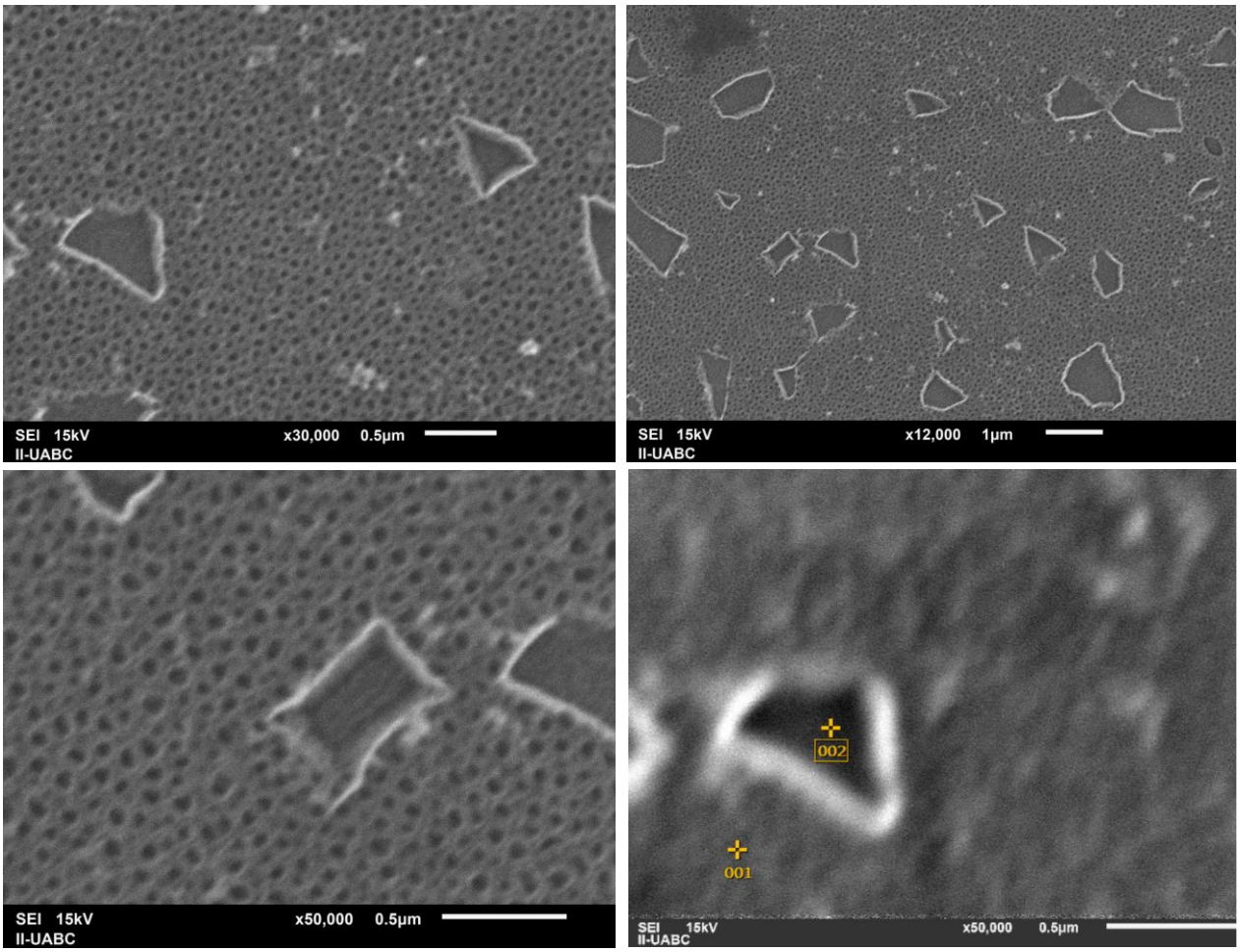


Figura 30. Muestra M6, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 5min a 5V (SEM).

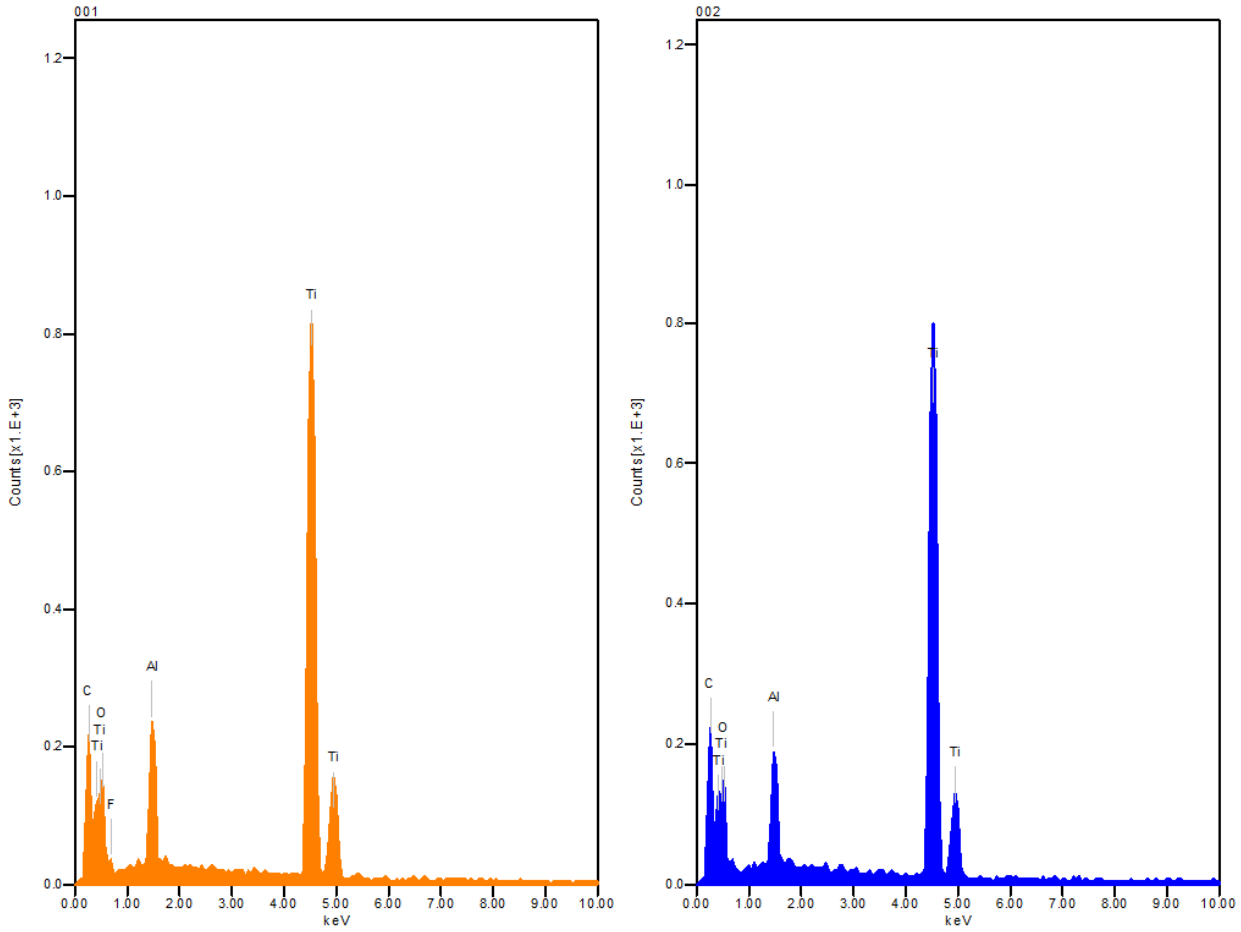


Figura 31. Muestra M6, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 5min a 5V (EDX).

La solución 2 definida en la **Tabla 11** y **Tabla 18** muestra un comportamiento muy consistente en las propiedades que otorga a la modificación superficial de la aleación Ti_6Al_4V, aun con la variación en el voltaje y la reducción en el tiempo de anodizado, confirmando su optimo desempeño al momento de buscar obtener capas de TiO_2 con NT con diámetros en el rango de los 100 nm. La evaluación por XPS muestra claramente la composición de la capa de TiO_2 confirmando su composición química.

Tabla 20. Muestra 7: variabilidad de parámetros (Ti_6Al_4V).

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos
7	M7	10	5	5	Si

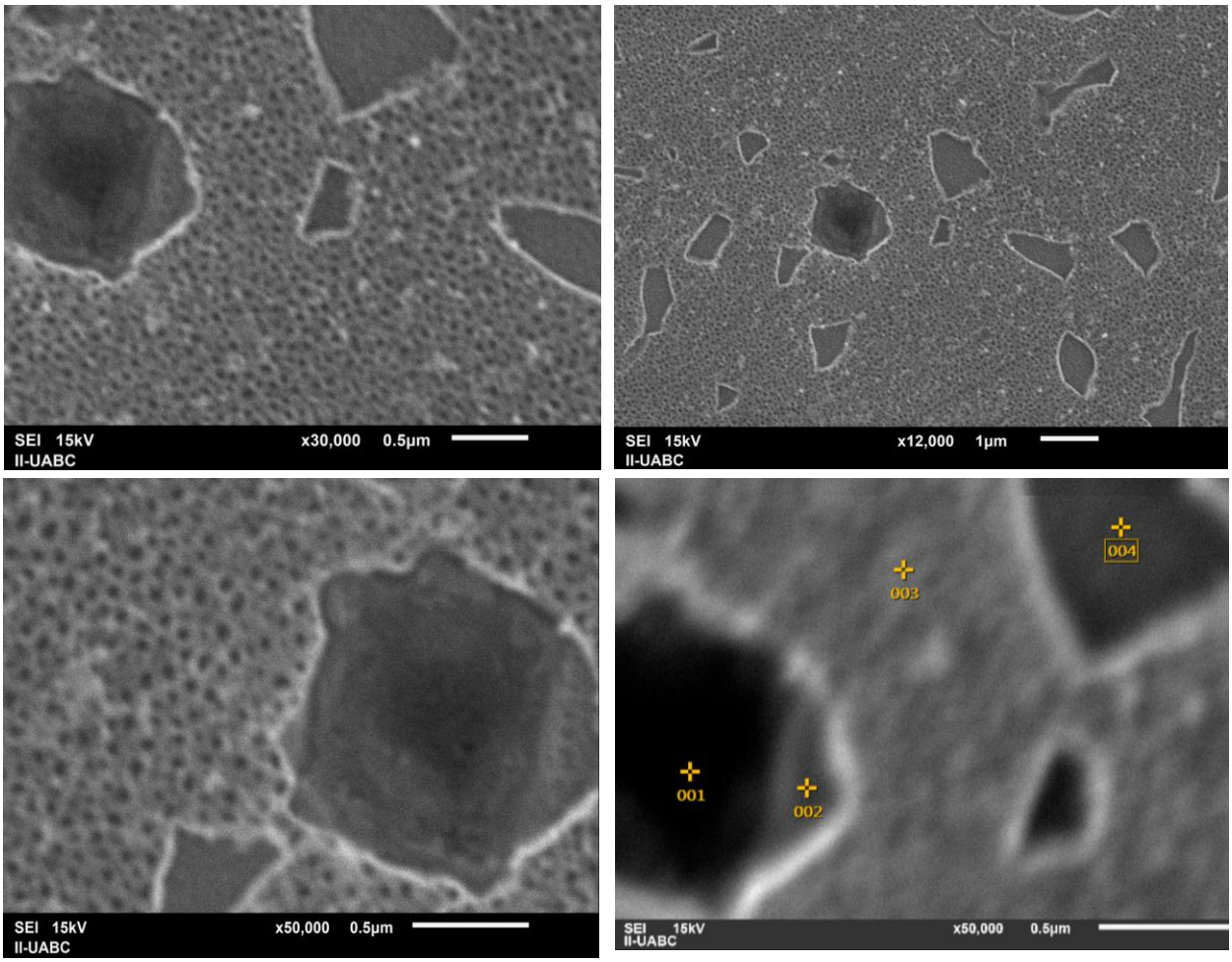


Figura 32. Muestra M7, aleación $Ti6_Al_4V$, solución 10, 5min a 5V (SEM).

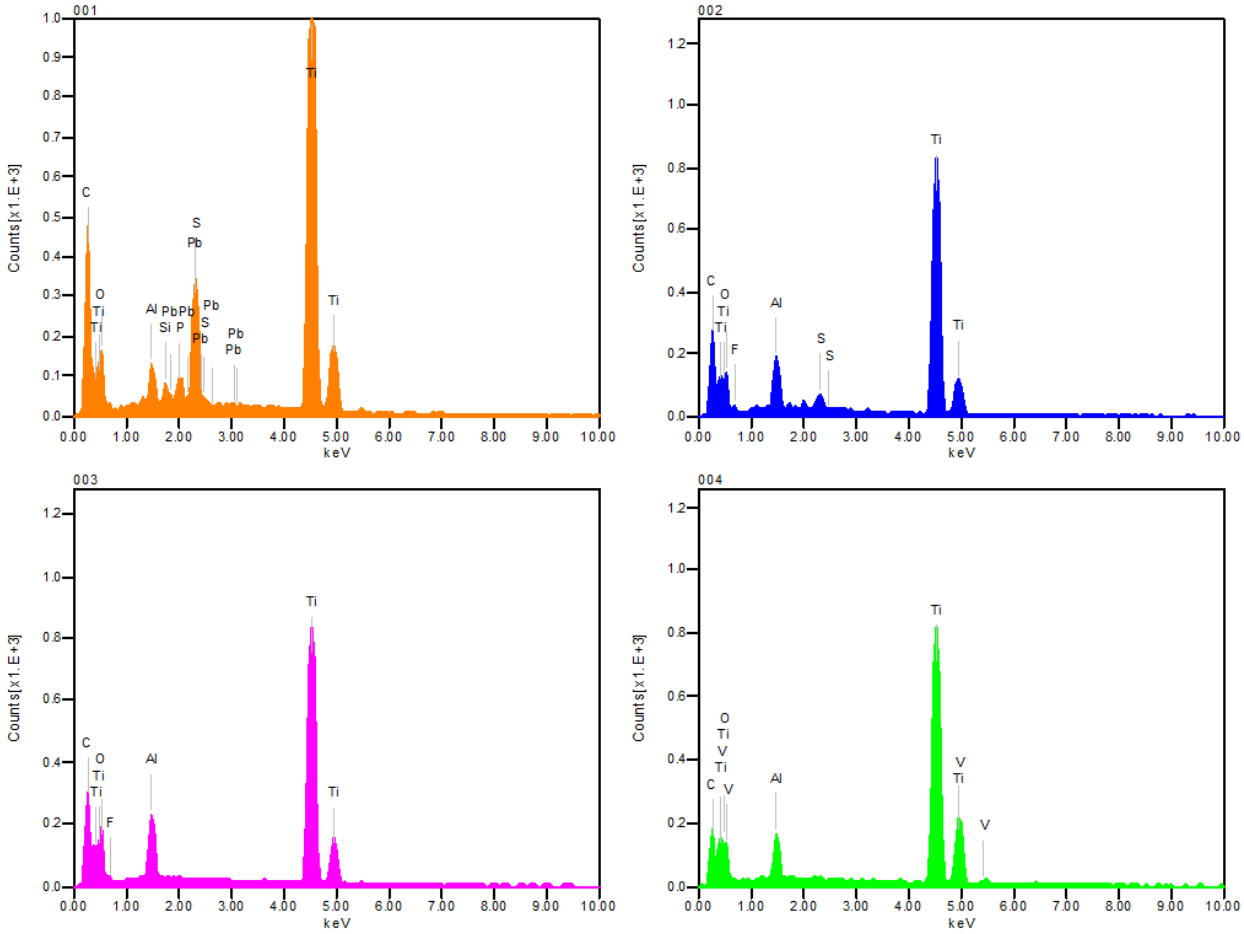


Figura 33. Muestra M7, aleación Ti_6Al_4V, solución 10, 5min a 5V (EDX).

La solución 10 definida en la **Tabla 18** muestra un comportamiento muy similar en las propiedades que otorga a la modificación superficial de la aleación Ti_6Al_4V con respecto a la solución 2, a condiciones idénticas de potencial y tiempo de anodizado, confirmando lo reportado en la literatura para soluciones de tercera generación utilizando agua desionizada al momento de buscar obtener capas de TiO_2 con NT con diámetros en el rango de los 100 nm. La evaluación por XPS muestra claramente la composición de la capa de TiO_2 confirmando su composición química principalmente compuesta por Ti.

Tabla 21. Muestra 8: variabilidad de parámetros (Ti_6Al_4V).

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos
8	M8	11	5	5	No

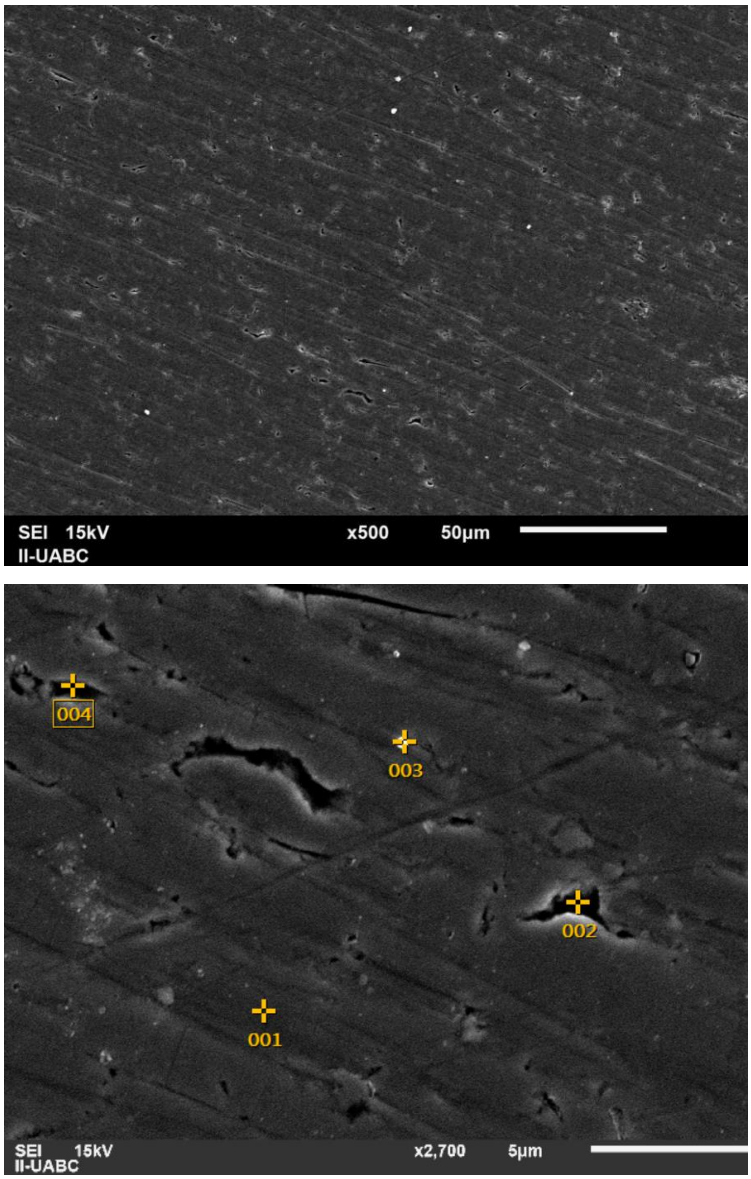


Figura 34. Muestra M8, aleación $Ti6_Al_4V$, solución 11, 5min a 5V (SEM).

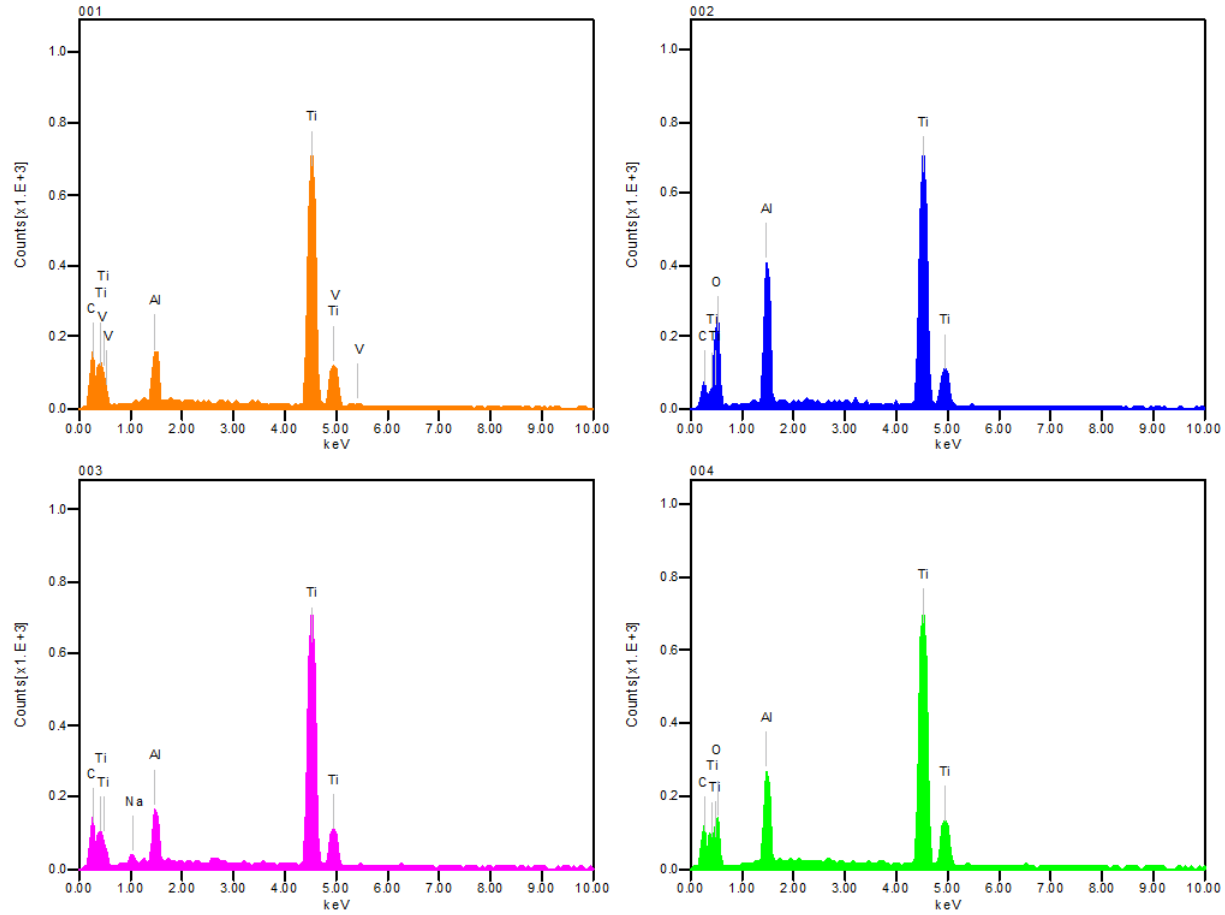


Figura 35. Muestra M8, aleación Ti_6Al_4V, solución 11, 5min a 5V (EDX).

La solución 11 definida en la **Tabla 18** muestra la formación de capas de óxido de apariencia laminar homogénea compacta sobre la superficie de la muestra, confirmado con los incrementos en el porcentaje de O, de la misma forma podemos observar claramente algunas de las líneas generadas por el proceso de pulido al momento de trabajar las muestras, y así como algunos de los otros constituyentes propios de la aleación, como lo indica la evaluación de la composición química en estos puntos utilizando EDX, confirmando la presencia de Ti y Al sobre la capa de TiO_2. Los tiempos cortos y la falta de iones fluoruro en la solución son los principales factores por los cuales se atribuyen a estas capas de TiO_2 estas morfologías, confirmando la necesidad de la presencia de iones fluoruro en la solución electrolítica.

Tabla 22. Muestra 9: variabilidad de parámetros (Ti_6Al_4V).

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos
9	M9	12	5	5	No

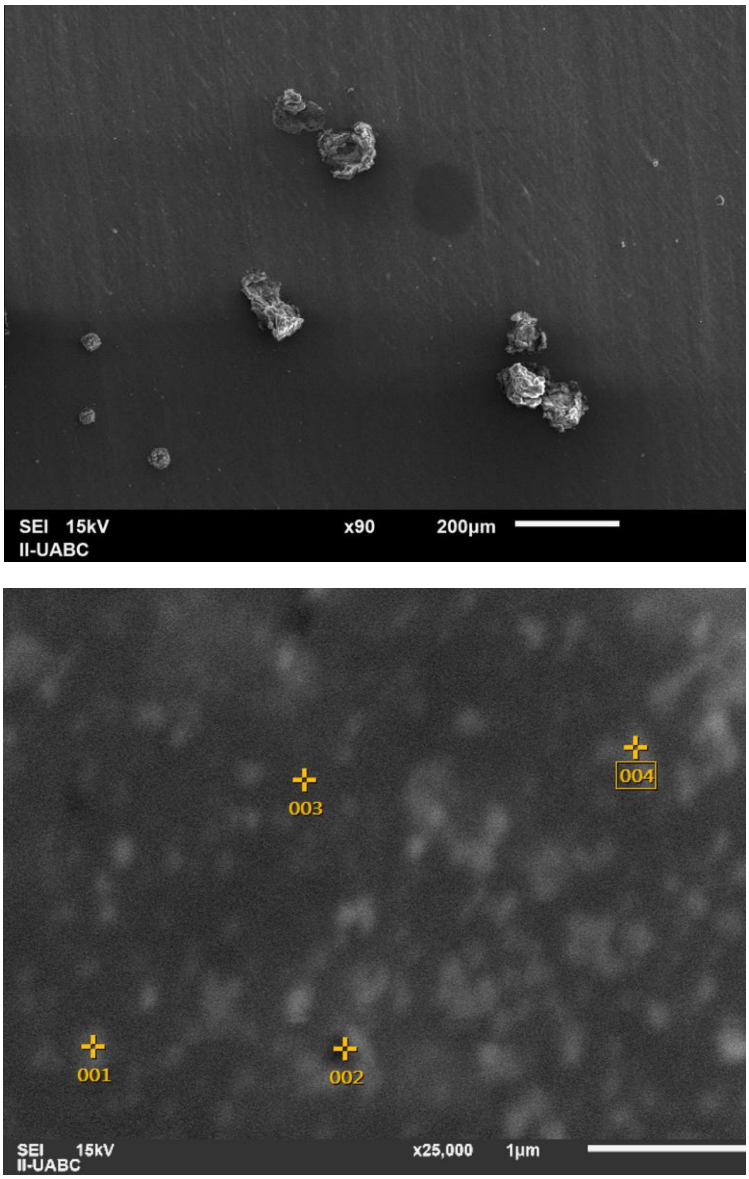


Figura 36. Muestra M9, aleación $Ti6_Al_4V$, solución 12, 5min a 5V (SEM).

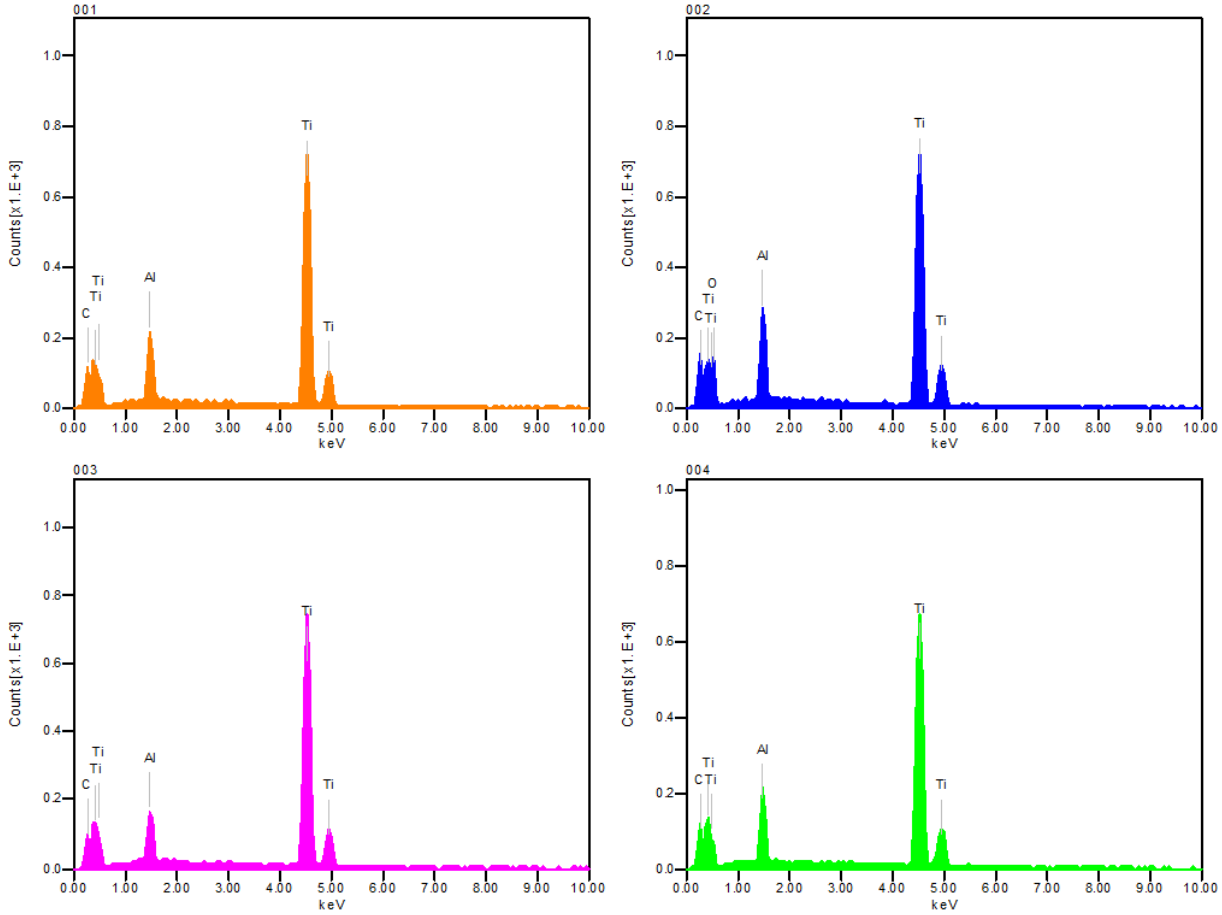
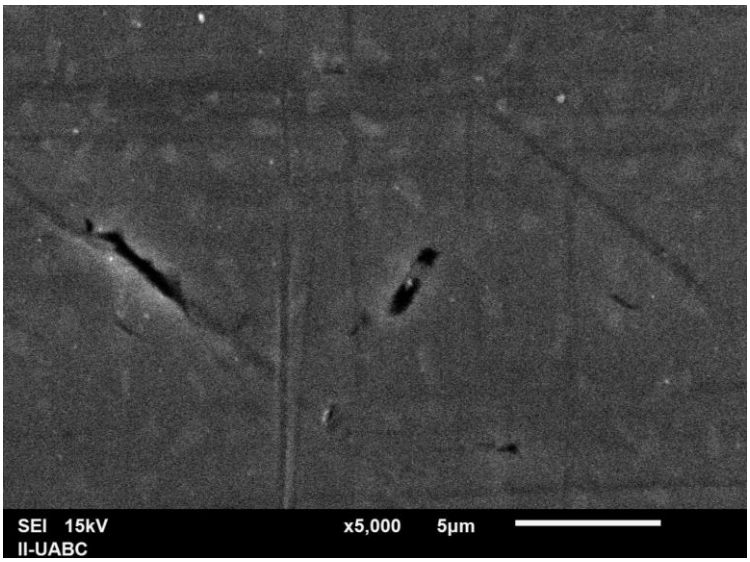


Figura 1- 37. Muestra M9, aleación Ti_6Al_4V, solución 12, 5min a 5V (EDX).

La solución 12 definida en la **Tabla 18** muestra la formación de capas de óxido de apariencia homogénea compacta sobre la superficie de la muestra, también se pueden observar algunos de los otros constituyentes propios de la aleación sobre la superficie después de la evaluación química utilizando EDX. Se puede confirmar a Ti como el principal constituyente de la capa de óxido. Los tiempos cortos y la falta de iones fluoruro en la solución a pesar de la adición de Etilenglicol como surfactante es el principal factor por el cual la capa de TiO_2 muestra esta morfología, confirmando una vez más la necesidad de la presencia de iones fluoruro, contrariamente de las propiedades que le otorga el ASO a la solución electrolítica.

Tabla 23. Muestra 10: variabilidad de parámetros (Ti_6Al_4V).

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos
10	M10	13	5	5	No



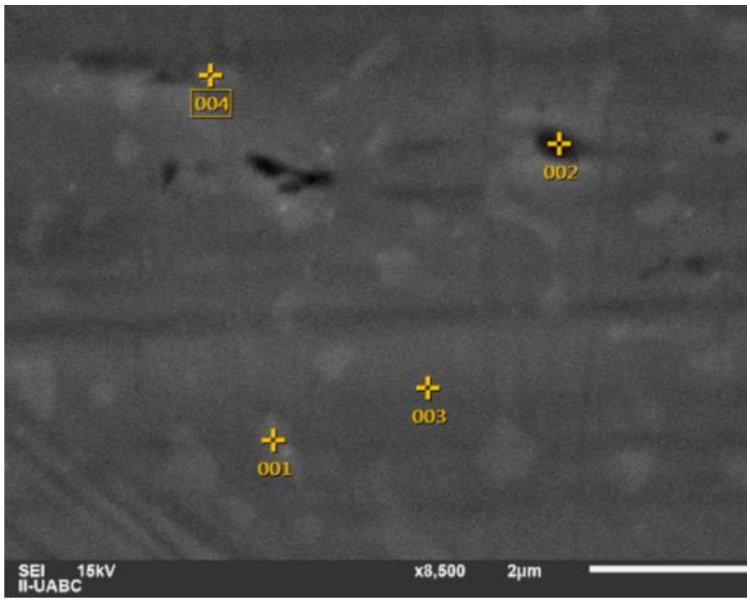


Figura 38. Muestra M10, aleación $Ti6_Al_4V$, solución 13, 5min a 5V (SEM).

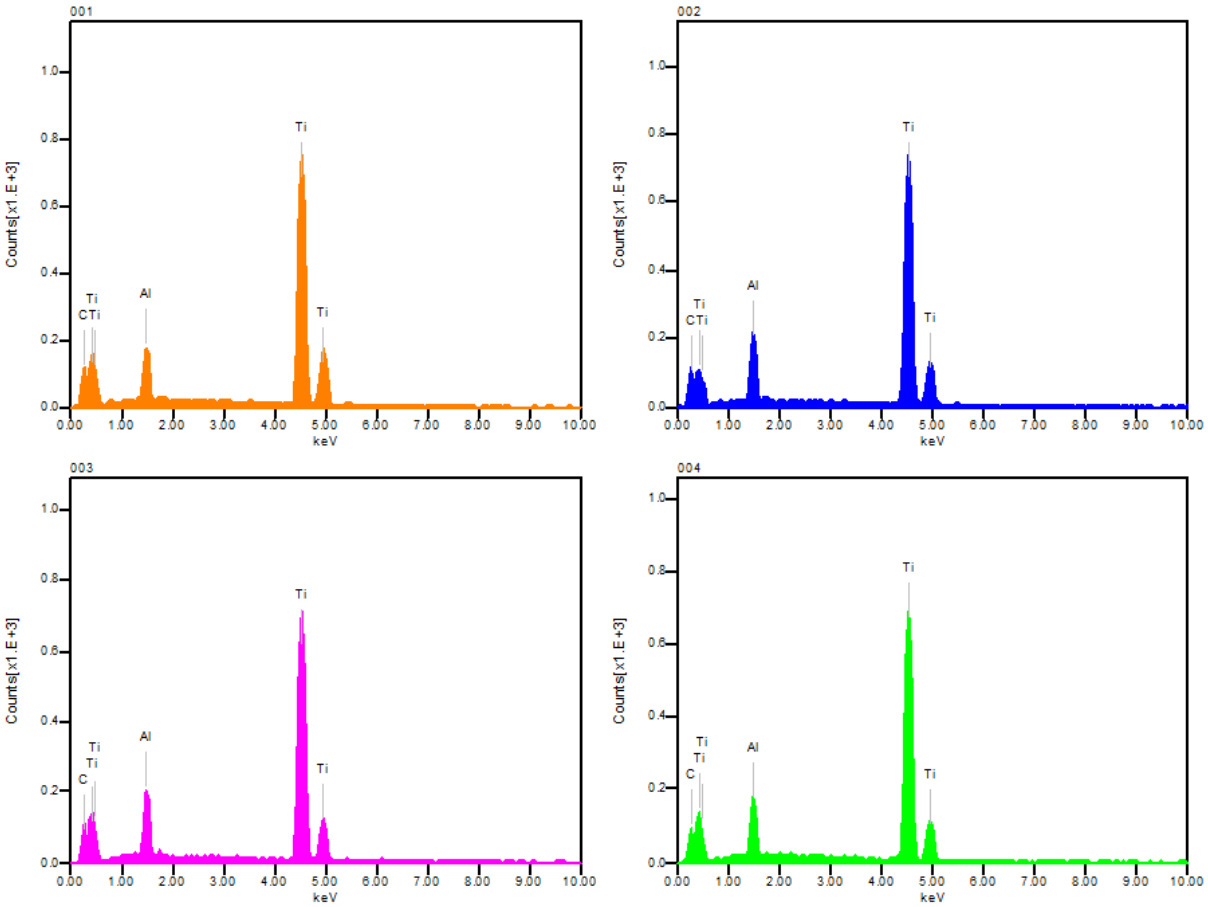


Figura 39. Muestra M10, aleación Ti_6Al_4V, solución 13, 5min a 5V (EDX).

La solución 13 definida en la **Tabla 18** muestra la formación de capas de óxido donde los primeros picos comienzan a aparecer sobre la superficie propia de la aleación Ti_6Al_4V, de apariencia homogénea un poco menos compacta a las anteriores sin ninguna morfología en particular, como cuando es expuesta a un ambiente altamente corrosivo. La evaluación de la composición química utilizando EDX, confirma los principales constituyentes de la capa de óxido, Ti y Al. Los tiempos cortos y la falta de iones fluoruro así como un surfactante como el etilenglicol en la solución son los principales factores por el cual se forma esta capa de TiO_2, confirmando así la necesidad de la presencia de iones fluoruro en la solución electrolítica.

El resumen de los resultados obtenidos de los experimentos con las soluciones descritas en la **Tabla 18** se presenta en la **Tabla 24**. Estos valores confirman la necesidad de la utilización de iones fluoruro en la solución electrolítica para la generación de capaz de NT de TiO_2.

Tabla 24. Resultados en la variabilidad de parámetros (Ti_6Al_4V).

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1
Experimento	**Muestra**	**Solución**	**Tiempo de Anodizado (min)**	**Voltaje (V)**	**Nanotubos**
6	**M6**	**2**	**5**	**5**	**Si**
7	**M7**	**10**	**5**	**5**	**Si**
8	**M8**	**11**	**5**	**5**	**No**
9	**M9**	**12**	**5**	**5**	**No**
10	**M10**	**13**	**5**	**5**	**No**

4.6 Anodización Electroquímica: Variabilidad en Tiempos Cortos, Ti y Ti_6Al_4V.

La variación en el tiempo ha demostrado ser el factor de mayor influencia en la longitud de los NT formados en la capa de óxido con las soluciones que han confirmado resultados positivos en la obtención de capas de NT de TiO_2. Sin embargo la evaluación del comportamiento de la capa de TiO_2 en sus inicios es de vital importancia, por este motivo evaluaremos para el Ti distintos niveles de tiempo, reduciéndolos a valores entre los 10 segundos y los 3 minutos para la solución 2 definida en la **Tabla 11**, así como su comparación superficial de una muestra en blanco.

Se incluyó en la evaluación superficial la aleación Ti_6Al_4V con la solución 2 en tiempos de 10min a potenciales de 20V, como lo muestra en resumen en la **Tabla 25**. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Tabla 25. Variabilidad en el Tiempo Ti y Ti_6Al_4V.

				B	C	Y1	Y2
Experimento	Muestra	Solución	Material	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos	Diámetros de los Nanotubos (nm)
11	M11	2	Ti_6Al_4V	10	20	Si	70-90
12	M12	2	Ti	0.17	20	No	-
13	M13	2	Ti	0.5	20	No	-
14	M14	2	Ti	1	20	No	-
15	M15	2	Ti	2	20	No	-
16	M16	2	Ti	3	20	No	-
17	M17	Blanco	Ti	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco

Tabla 26. Muestra 11: variabilidad en el Tiempo (Ti_6Al_4V).

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos	Diámetros de los Nanotubos (nm)
11	M11	2	10	20	Si	70-90

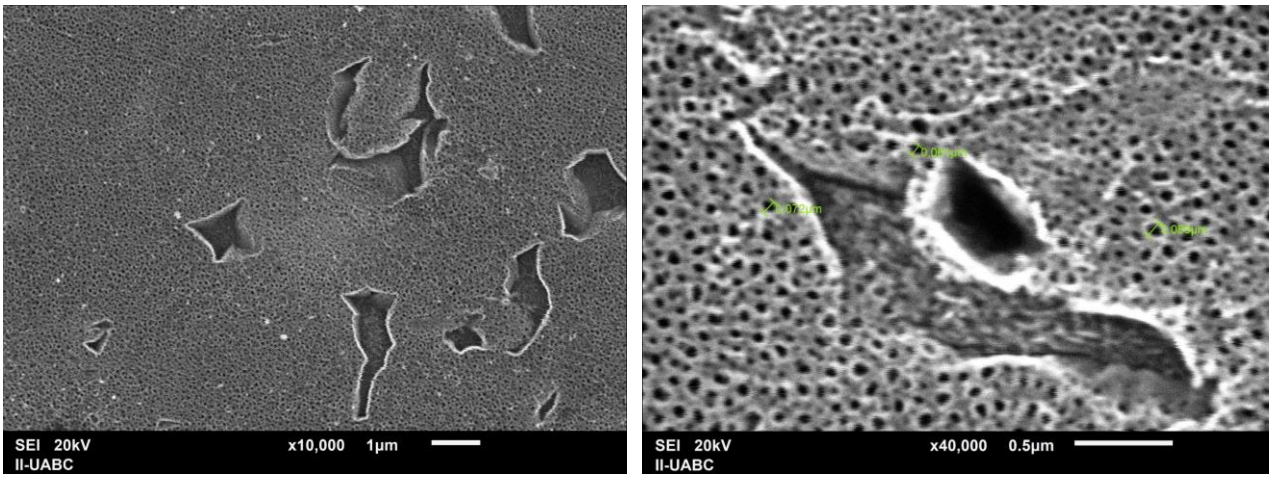


Figura 1- 40. Muestra M11, aleación Ti6$_A$l$_4$V, solución 2, 10min a 20V (SEM).

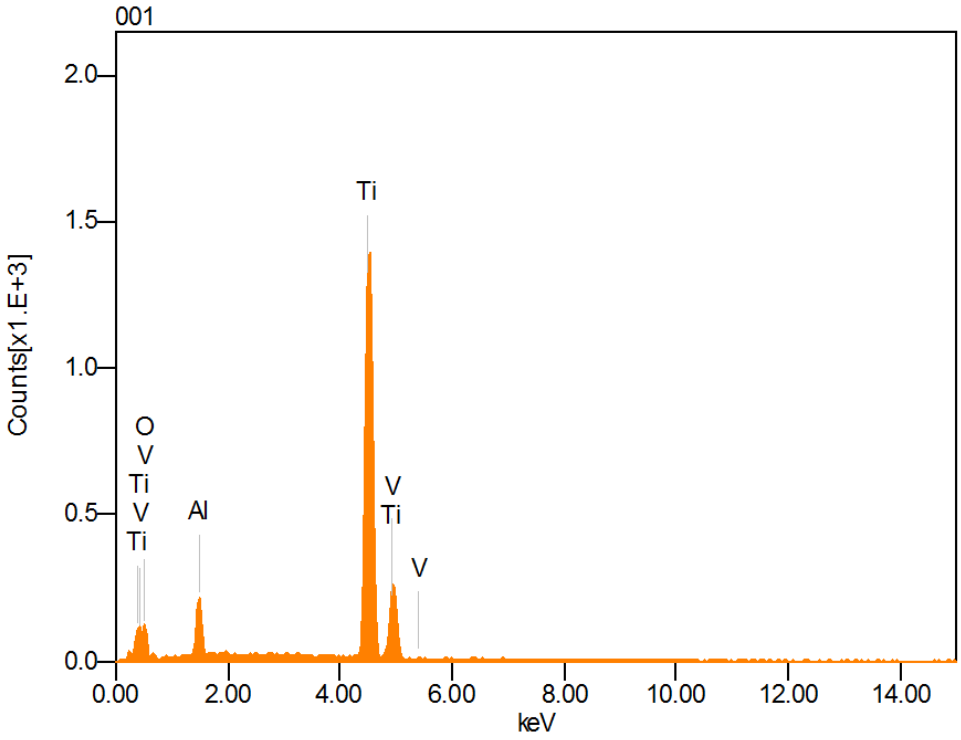


Figura 1- 41. Muestra M11, aleación Ti_6Al_4V, solución 2, 10min a 20V (EDX).

Las características morfológicas para las superficies utilizando la aleación Ti_6Al_4V para los parámetros descritos en la **Tabla 27** muestran resultados que confirman lo obtenido en el apartado 4.4. El análisis por EDX muestra los constituyentes principales de la capa de óxido Ti,Al y V componentes de la propia aleación.

Tabla 27. Muestra 12: variabilidad en el Tiempo (Ti).

Aleación: Ti			B	C	Y1	Y2
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos	Diámetros de los Nanotubos (nm)
12	M12	2	0.17	20	No	-

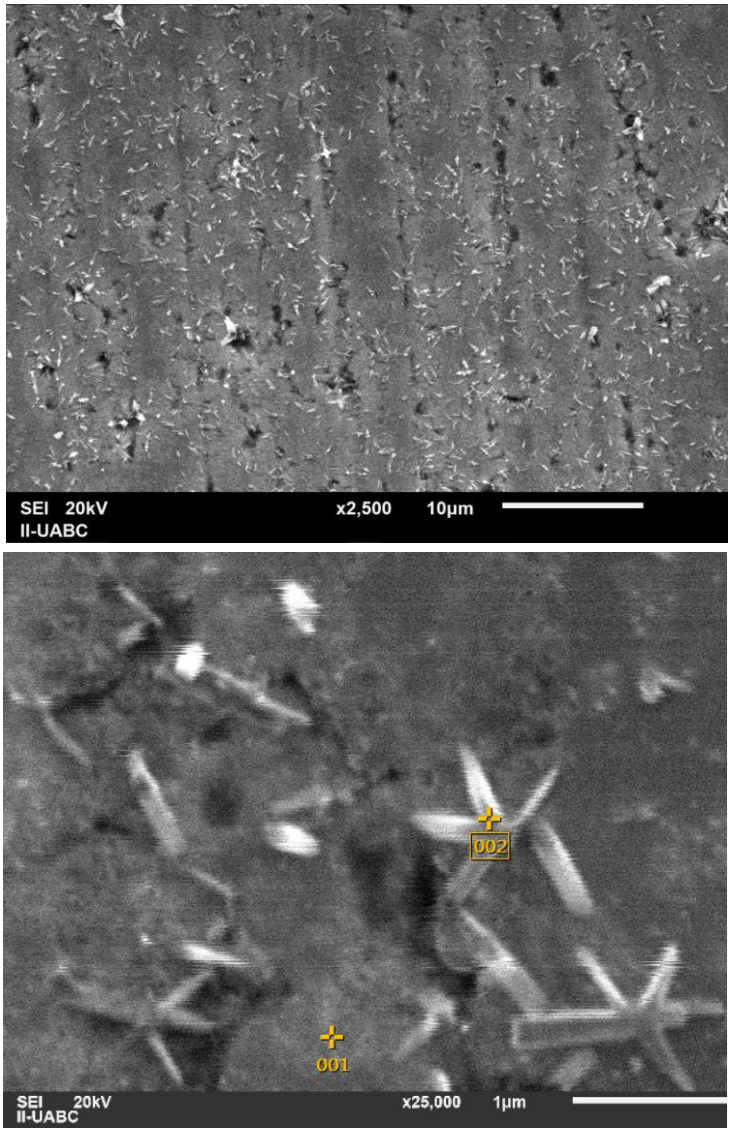


Figura 1- 42. Muestra M12, Ti, solución 2, 0.17 min a 20V (SEM).

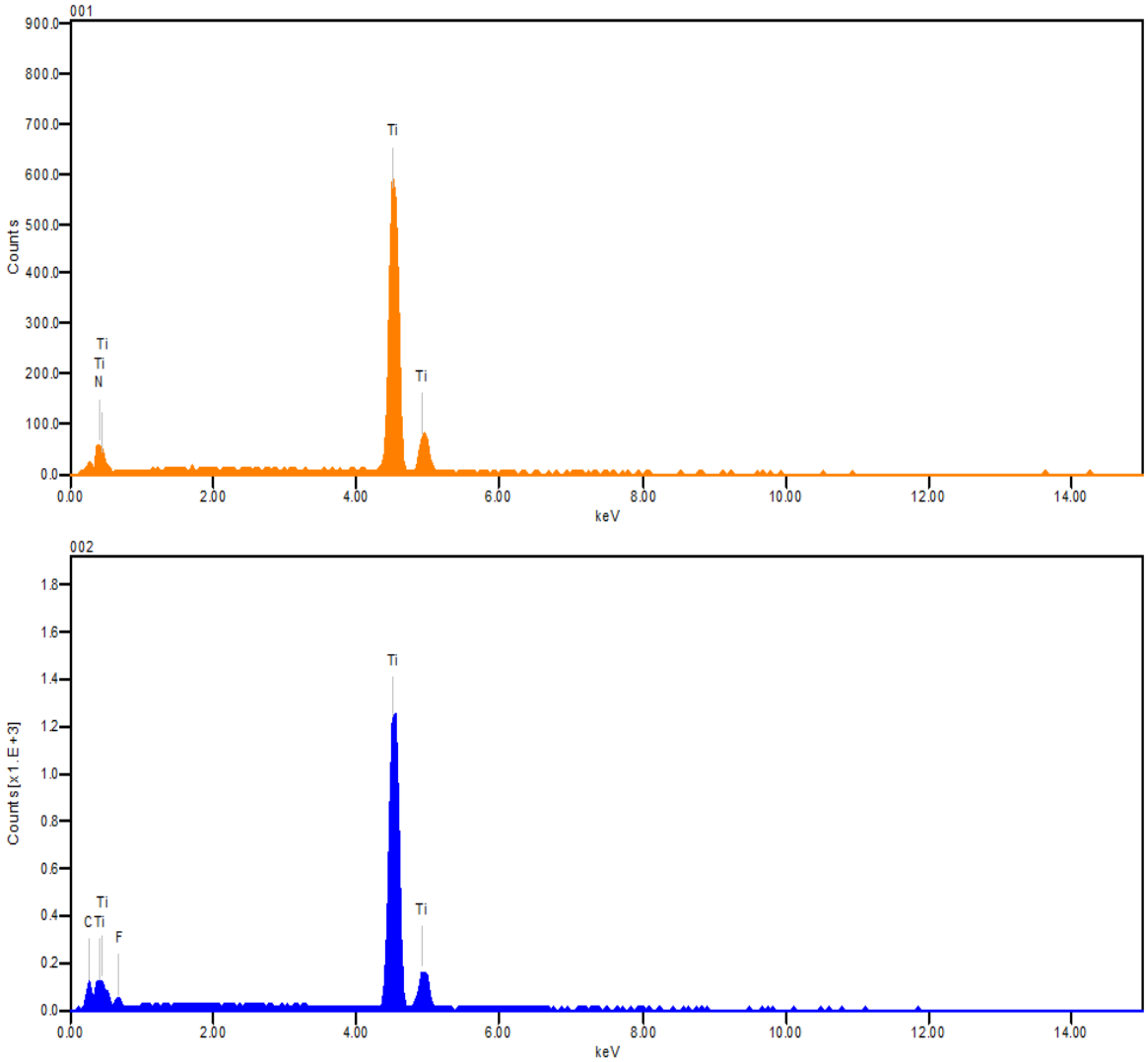


Figura 1- 43. Muestra M12, Ti, solución 2, 0.17min a 20V (EDX).

Las imágenes por SEM de la **Figura 1- 42** muestran la superficie modificada para los parámetros descritos en la **Tabla 27**, 10seg a 20V. Estas imágenes muestran los inicios en la formación de la capa de óxido, siendo de manera aleatoria rápidamente al contacto con el medio electrolítico la capa de óxido inicia su formación, en la imagen se pueden apreciar puntos con concentraciones de Ti sobre toda la superficie de la capa de óxido formada, tal y como lo confirma el análisis por EDX.

Tabla 28. Muestra 13: variabilidad en el Tiempo (Ti).

Aleación: Ti			B	C	Y1	Y2
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos	Diámetros de los Nanotubos (nm)
13	M13	2	0.5	20	No	-

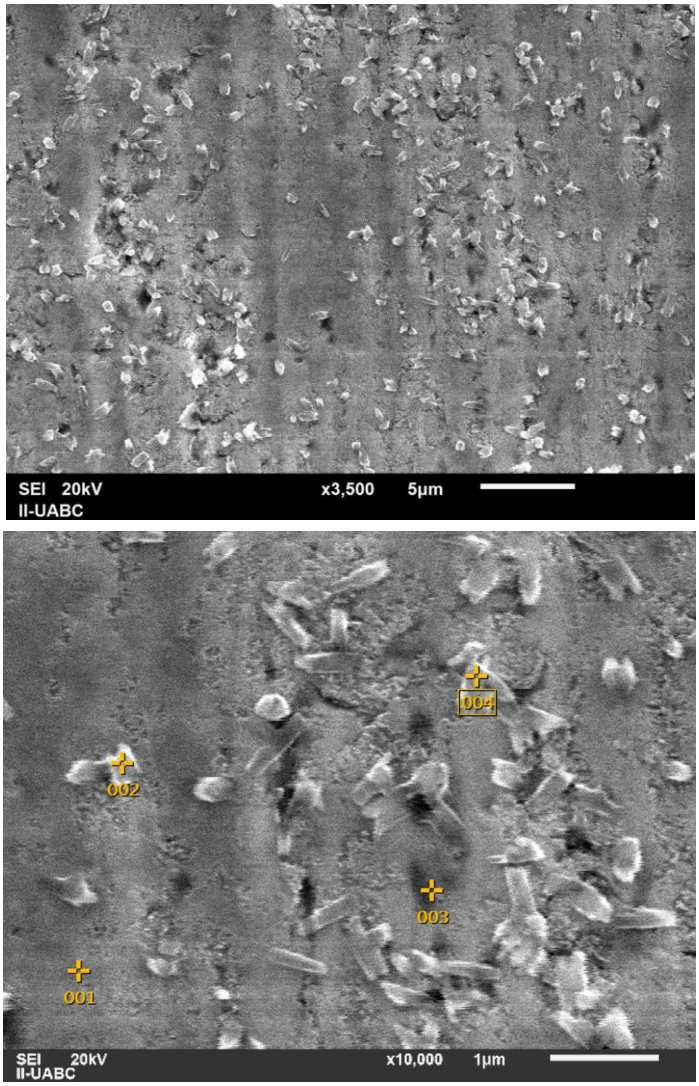


Figura 1- 44. Muestra M13, Ti, solución 2, 0.5min a 20V (SEM).

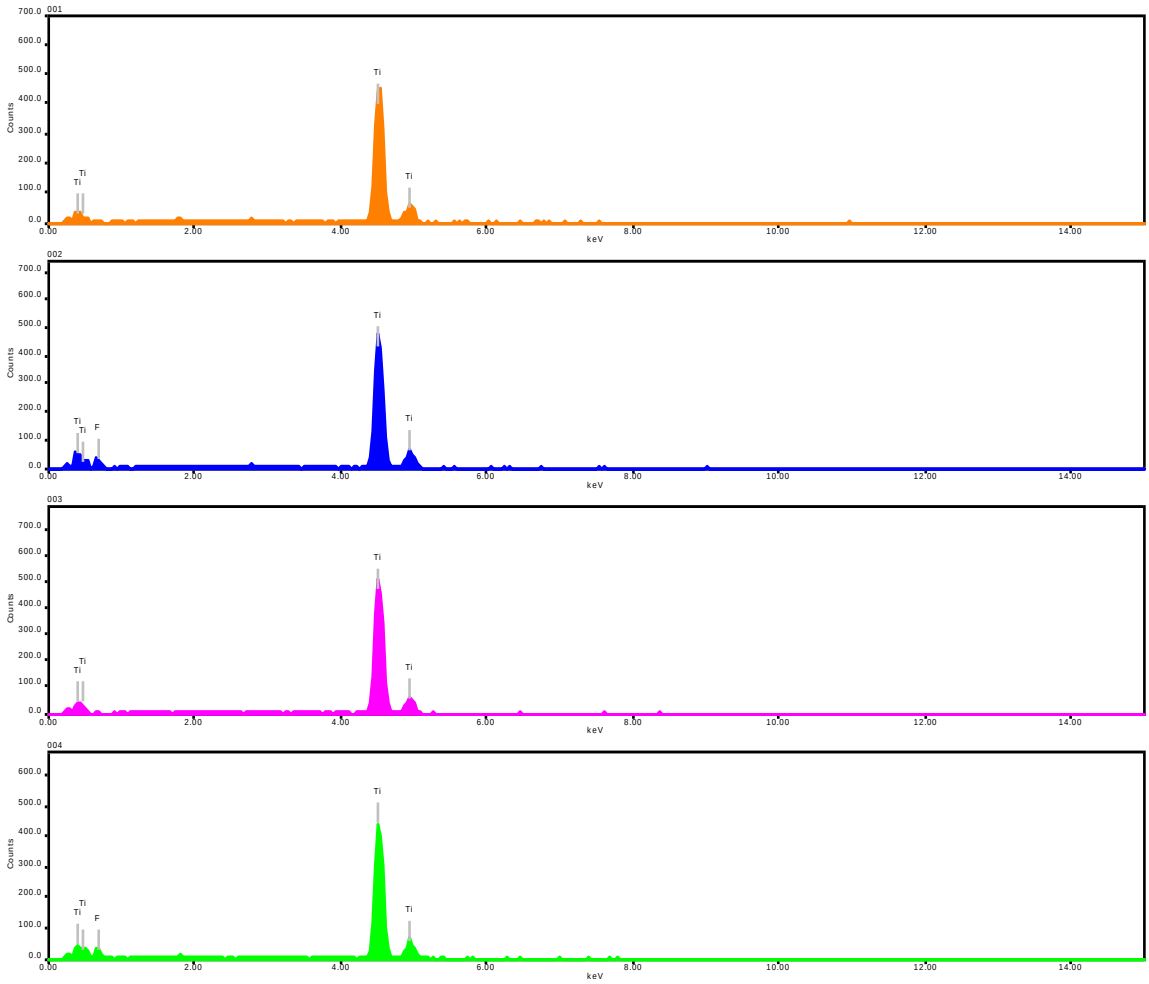


Figura 1- 45. Muestra M13, Ti, solución 2, 0.5min a 20V (EDX).

Las imágenes de la **Figura 1- 44** (SEM) muestran la superficie modificada para los parámetros descritos en la **Tabla 28**, 30seg a 20V. Estas imágenes muestran (en continuidad con el experimento anterior) como la formación de la capa de óxido de manera acelerada y aleatoria en contacto con el medio electrolítico sigue su desarrollo, con una apariencia esponjosa pero compacta con puntos aleatorios con concentraciones de Ti sobre toda la superficie de la capa de óxido, el análisis por EDX muestra las características del constituyente principal del óxido, Ti. Tambien se puede observar presencia de iones F en los pliegues, lo que sugiere que en las primeras fases la formación de NTs se origina en puntos localizados, como picaduras de forma homogénea.

Tabla 29. Muestra 14: variabilidad en el Tiempo (Ti).

Aleación: Ti			B	C	Y1	Y2
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos	Diámetros de los Nanotubos (nm)
14	M14	2	1	20	No	-

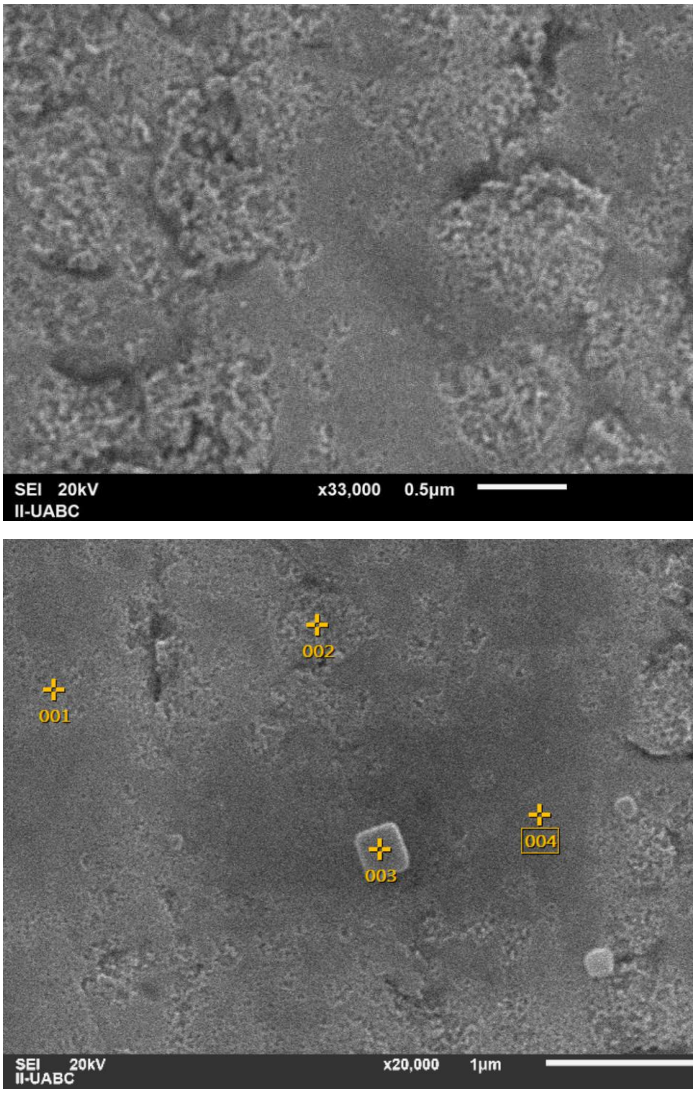


Figura 1- 46. Muestra M14, Ti, solución 2, 1min a 20V (SEM).

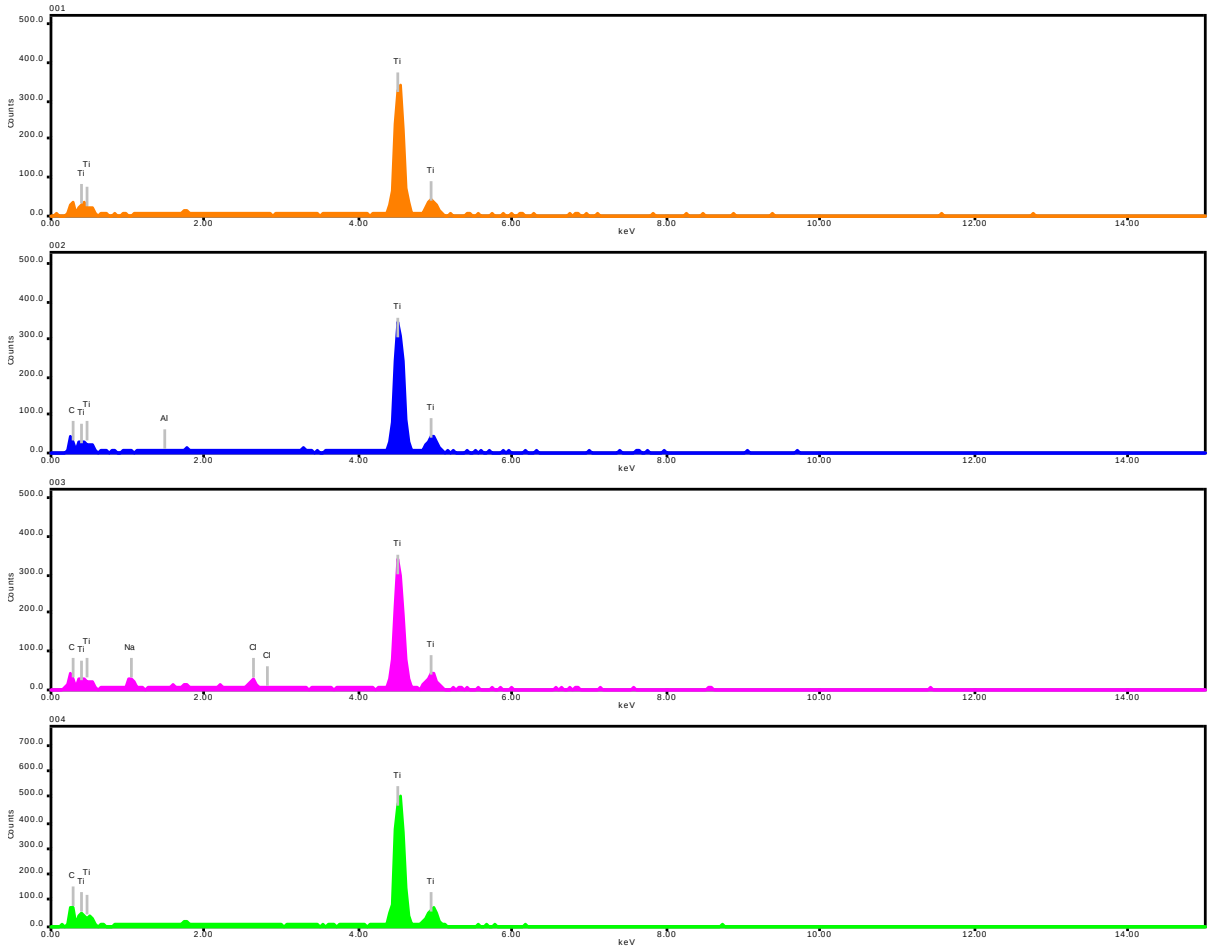


Figura 1- 47. Muestra M14, Ti, solución 2, 1min a 20V (EDX).

Las imágenes de la **Figura 1- 46** (SEM) muestran la evolución de la superficie modificada para los parámetros descritos en la **Tabla 29**, 1min a 20V. La capa de óxido luce mucho más homogénea y las primeras impresiones de poros pueden ser observadas sobre la superficie, el análisis por EDX muestra las características del constituyente principal del óxido, Ti.

Tabla 30. Muestra 15: variabilidad en el Tiempo (Ti).

Aleación: Ti			B	C	Y1	Y2
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos	Diámetros de los Nanotubos (nm)
15	M15	2	2	20	No	-

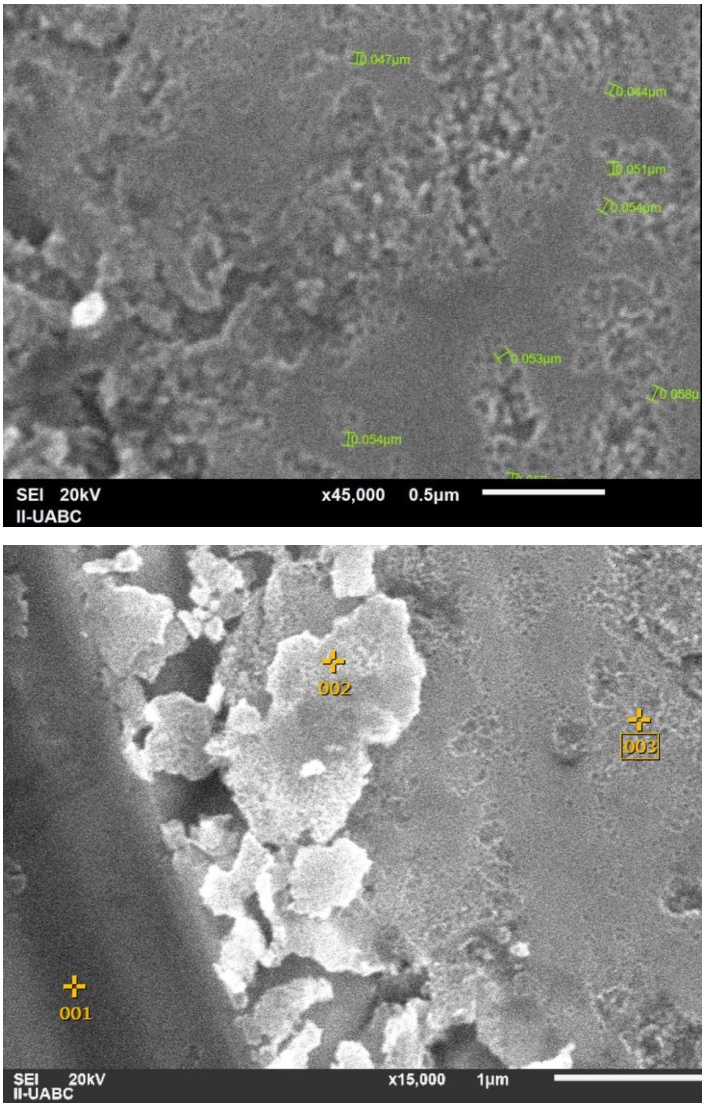


Figura 1- 48. Muestra M15, Ti, solución 2, 2min a 20V (SEM).

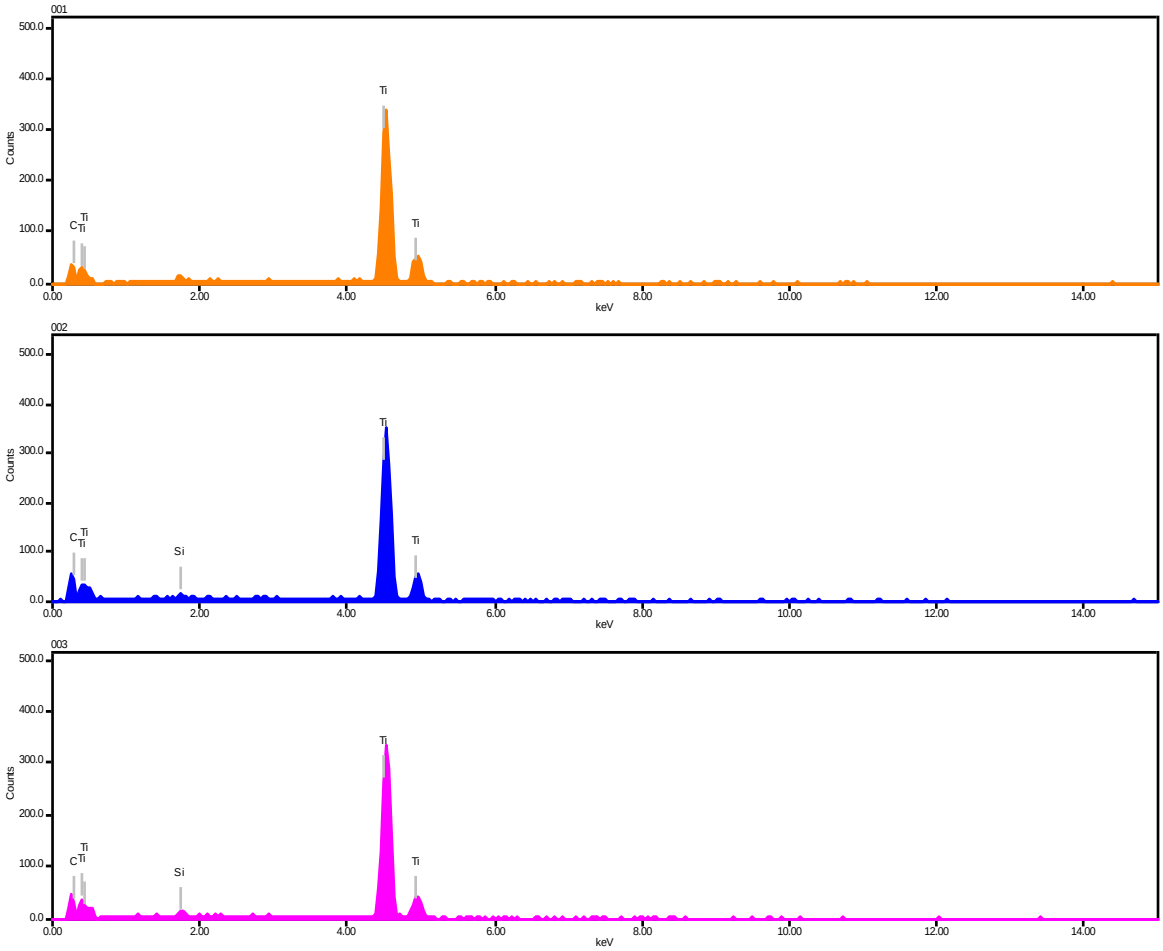


Figura 1- 49. Muestra M15, Ti, solución 2, 2min a 20V (EDX).

Las imágenes de la **Figura 1- 48** (SEM) muestran el crecimiento de la capa de óxido, y como continua con las impresiones de las primeras estructuras en forma de NT o nano-poros, mismas que se “imprimen” en estas primeras capas y dan forma más adelante a las nano estructuras en forma de NT bien definidas. El crecimiento de la capa de óxido está en un proceso de disolución y formación simultánea y al ser esta capa aún muy delgada a un potencial constante de 20V, la caída de corriente es en base al incremento de la capa de óxido, por este motivo es su apariencia irregular en algunas secciones de la superficie. El análisis por EDX muestra las características del constituyente principal del óxido, Ti.

Tabla 31. Muestra 16: variabilidad en el Tiempo (Ti).

Aleación: Ti			B	C	Y1	Y2
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos	Diámetros de los Nanotubos (nm)
16	M16	2	3	20	No	-

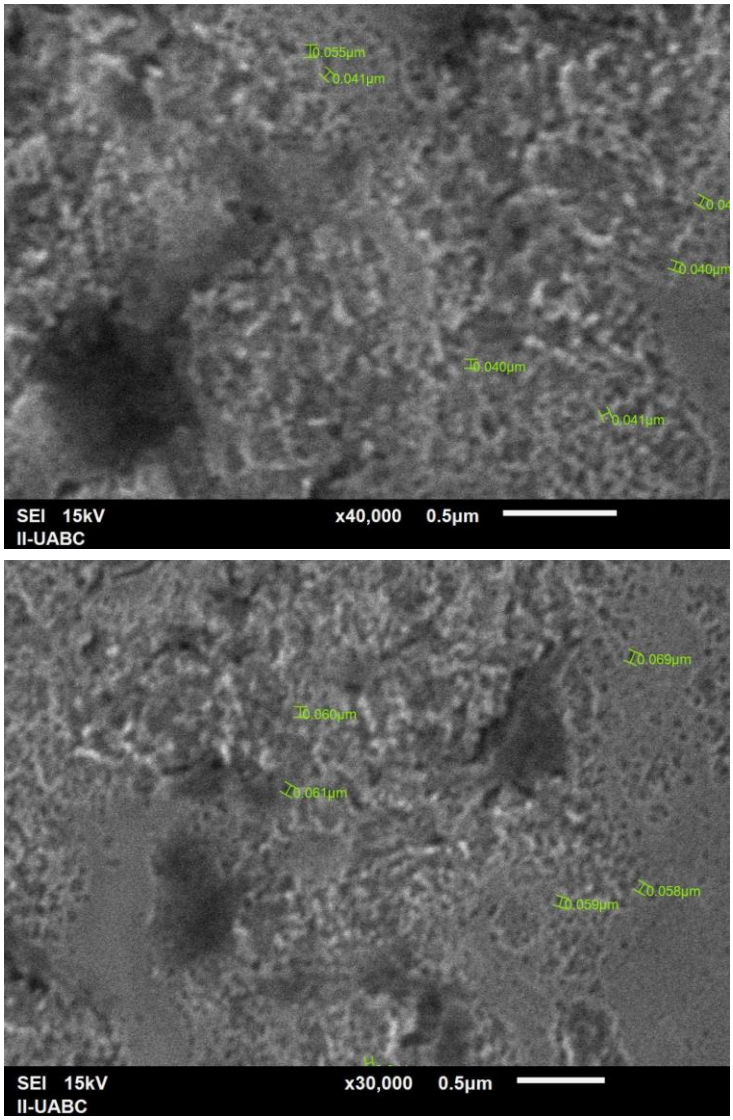
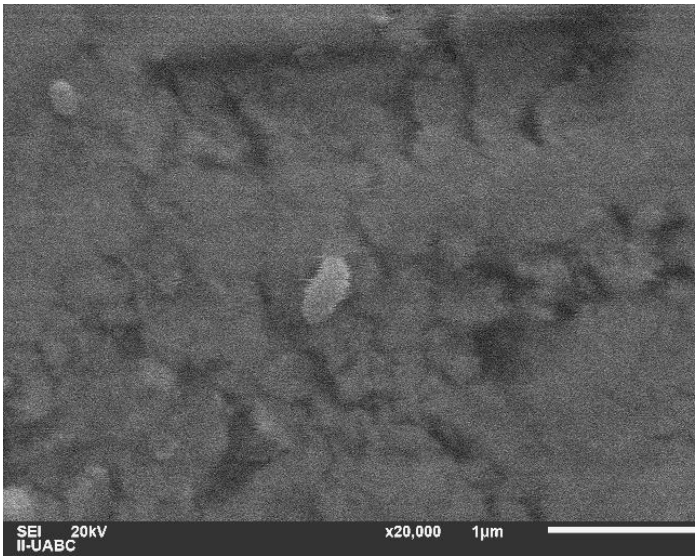


Figura 1- 50. Muestra M16, Ti, solución 2, 3min a 20V (SEM).

Tabla 32. Muestra 17: variabilidad en el Tiempo (Ti).

Aleación: Ti			B	C	Y1	Y2
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Nanotubos	Diámetros de los Nanotubos (nm)
17	M17	2	3	20	No	-



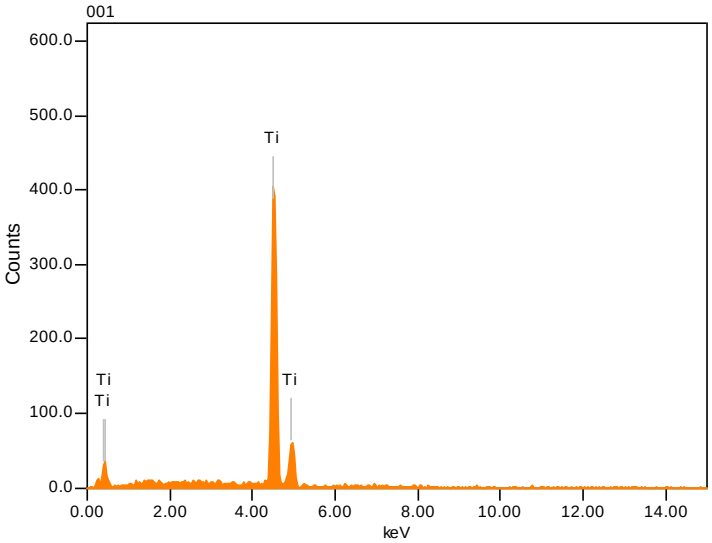


Figura 1- 51. Muestra M17, Ti, blanco (SEM y EDX).

Las fotografías por SEM mostradas en la **Figura 1- 50** muestran más claramente como la capa de óxido comienza a formar los nano-poros en los rangos de los 40 a 60 nm mismos que dan origen a los NT, estas primeras capas irregulares compactas van dando origen a las nano-estructuras y como se ha demostrado anteriormente los primeros NT pueden ser observados a los 5min de anodizado bajo los parámetros y condiciones sugeridos en la **Tabla 11** para las solucione electrolíticas.

La **Figura 1- 51** muestra el análisis por SEM y EDX sobre la superficie de Ti (blanco) sin anodizar mostrando las características propias del metal y la apariencia de la capa de óxido natural.

4.7 Electrolisis por Corriente Directa: Generación de ASO en Laboratorio.

Los experimentos realizados muestran resultados muy favorables con el uso de ASO comercial en la solución electrolítica para la generación de nano-estructuras de TiO_2. A continuación se presentan los distintos experimentos realizados para generar ASO en el laboratorio bajo condiciones relativamente simples y de bajo costo, para su posterior utilización como componente principal de las formulaciones electrolíticas [37].

Utilizando el procedimiento descrito en el apartado 3.5.2 y la celda para electrolisis por corriente directa mostrada en el apartado 3.5.5 se procedió a la realización de ASO. En un inicio se buscó alcanzar los parámetros comerciales descritos en el apartado 3.2, **Tabla 3** para el agua Microdacyn60®. Una vez logrados estos valores se realizó el DOE descrito en la **Tabla 33** para conocer la influencia en la variación del tiempo, el uso de membranas de poliéster de diferente espesor así como la variación en la distancia entre estas y de los electrodos.

Tabla 33. Definición de niveles y factores para la electrólisis por corriente directa.

Factor	Variable	Definición	Nivel 1	Nivel 2
1	A	Membrana de Poliéster (mm)	1	2
2	B	Distancia entre Electrodos (mm)	101	68
3	C	Tiempo	15	90
4	D	Potencial	12	30
5	AB	Interacciones entre factores independientes		
6	BC			
7	BD			
8	AC			
9	CD			
10	AD			

Tabla 34. Factores dependientes e independientes, arreglo L12 para 10 factores a 2 niveles.

Experimento	A	B	C	D
	Membrana de Poliéster (mm)	Distancia entre Electrodos (mm)	Tiempo (min)	Potencial (V)
1	1	101	15	12
2	1	101	15	12
3	1	101	90	30
4	1	68	15	30
5	1	68	90	12
6	1	68	90	30
7	2	101	90	30
8	2	101	90	12
9	2	101	15	30
10	2	68	90	12
11	2	68	15	30
12	2	68	15	12

Los valores comerciales mostrados en la **Tabla 3** se buscan lograr con los siguientes parámetros: Utilizando agua desionizada y agregando 0.1 % de NaCl, mezclar hasta diluir perfectamente, vertiendo hasta su capacidad máxima la solución previamente descrita se llenan los compartimientos de la celda buscando cubrir por completo los electrodos y las membranas de poliéster. La capacidad total de la celda 11.1 litros, 3.7 litros para la parte aniónica (ánodo o parte acida) y 3.7 litros para la parte catiónica (cátodo o lado alcalino), con 3.7 litros para la parte neutra o de intercambio iónico con una distancia entre membranas de 101mm, como lo muestra el prototipo de la **Figura 17**.

A un potencial de 12V se inició la electrólisis y se comenzó con el monitoreo de las propiedades en los distintos 3 compartimientos de la celda, potencial oxido reducción (ORP), pH y partículas por millón (ppm). Durante los primeros 15min se manejó un potencial constante a 12V, logrando los valores descritos en la **Tabla 35**.

Tabla 35. Valores del ASO Casero (15min).

Nomenclatura	Catiónica	Neutra	Aniónica
Potencial Oxido Reducción (ORP) (mV)	170	743	295
Partículas totales (ppm)	732	761	846
Tiempo (min)	15	15	15
pH	7.2	5.5	4.3
Potencial (V)	12	12	12

Los valores obtenidos a los 15 min a un potencial de 12 V estaban aún por debajo de los valores buscados, se continuó con el proceso de electrólisis con la intención de conocer el tiempo máximo requerido para alcanzar estos valores óptimos, con una distancia entre membranas y electrodos de 101 mm a un potencial de 12 V. Los cambios en los valores monitoreados son como se describen a continuación en la **Tabla 36**, **Tabla 37** y **Tabla 38**.

Tabla 36. Valores de ASO de Laboratorio (30min).

Nomenclatura	Catiónica	Neutra	Aniónica
Potencial Oxido Reducción (ORP) (mV)	-250	550	543
Partículas totales (ppm)	745	975	975
Tiempo (min)	30	30	30
pH	8.0	6.5	3.9
Potencial (V)	12		

Tabla 37. Valores de ASO de Laboratorio (45min).

Nomenclatura	Catiónica	Neutra	Aniónica
Potencial Oxido Reducción (ORP) en mV	-430	750	645
Partículas totales (ppm)	864	100	100
Tiempo (min)	45	45	45
pH	9.3	4.5	3.2
Potencial (V)	12		

Tabla 38. Valores de ASO de Laboratorio (60min).

Nomenclatura	Catiónica	Neutra	Aniónica
Potencial Oxido Reducción (ORP) en mV	-508	597	694
Partículas totales (ppm)	846	114	108
Tiempo (min)	60	60	60
pH	10.2	3.4	3.1
Potencial (V)	12		

Los valores alcanzados para el lado aniónico después de 60min de electrólisis por corriente directa son los descritos en la **Tabla 38**, estos valores son comparados con los valores esperados de la **Tabla 3**, y aparecen en resumen en la **Tabla 39**.

Tabla 39. Valores Medidos vs Valores Esperados (Potencial 12V - Tiempo 60min).

Nomenclatura	Aniónica Obtenidos	Aniónica Esperados
Potencial Oxido Reducción (ORP) en V	694	1100
Partículas totales (ppm)	108	20<AC<60
pH	3.1	<2.7

Los valores obtenidos en esta iteración están cercanos a los valores esperados, sin embargo la caída de potencial debido a la distancia entre las membranas y los electrodos es un factor muy importante para alcanzar los valores buscados. Las siguientes repeticiones serán reduciendo la distancia entre los electrodos y membranas de 101 a 68 mm, la **Figura 20** muestra la configuración final 68 mm de distancia entre membranas con una capacidad de 1 litro para esta sección de la celda. Para esta iteración el valor del potencial se fue incrementando en rampas de voltaje en los valores 12, 15 y 30 V, así como los valores obtenidos en un tiempo total de 90 min, como se describen en la **Tabla 40**

Tabla 40. Valores Medidos vs Valores Esperados (Potencial Rampas 12, 15 y 30V - Tiempo 90min).

Nomenclatura	Aniónica Obtenidos	Aniónica Esperados
Potencial Oxido Reducción (ORP) en V	1080	1100
Partículas totales (ppm)	2000	20<AC<60
pH	3.55	<2.7

El experimento se llevó a cabo sin rampas de voltaje a un potencial de 30 V durante 90 min, obteniendo valores muy similares mostrados en la **Tabla 41**.

Tabla 41. Valores Medidos vs Valores Esperados (Potencial 30V - Tiempo 90min).

Nomenclatura	Aniónica Obtenidos	Aniónica Esperados
Potencial Oxido Reducción (ORP) en V	1071	1100
Partículas totales (ppm)	-	20<AC<60
pH	3.57	<2.7

Siendo los valores de ppm medidos en totales, no directos en concentraciones de cloro (AC) para las soluciones obtenidas y reportadas en las tablas anteriores, los únicos parámetros comparables de las tablas para valores medidos contra valores esperados son el ORP y el pH, de estos resultados se realizan los siguientes experimentos como lo sugerido en la **Tabla 34**.

A una proporción de 1% de NaCl en solución y membrana de 1 mm de espesor, a potencial constante de 30 V a tiempos de 60 y 90 min.

Tabla 42. Valores Medidos vs Valores Esperados (Potencial 30V – Tiempo 60 y 90min).

Nomenclatura	Aniónica Obtenidos	Aniónica Esperados	Aniónica Esperados
Potencial Oxido Reducción (ORP) en V	508	1080	1100
Partículas totales (ppm)	846	2000	20<AC<60
pH	3.40	3.55	<2.7
Tiempo (min)	60	90	10

Los valores de la **Tabla 43** fueron tomados 24 hr después de la electrólisis por corriente directa, para la solución aniónica a 90 min, para evaluar la degradación de los valores y la influencia que puede tener en las soluciones finales.

Tabla 43. Valores Medidos al Día Siguiente (24hr - Potencial 30V - Tiempo 90min).

Nomenclatura	Aniónica Obtenidos
Potencial Oxido Reducción (ORP) en V	524
Partículas totales (ppm)	2000
pH	3.58
Tiempo (min)	90

De los experimentos mostrados en la **Tabla 43** se realizaron las mezclas sugeridas por la literatura [37], de estas mezclas surgen los valores mostrados en la **Tabla 44** para las soluciones aniónica y catiónica respectivamente.

Tabla 44. Mezclas (Proporción A1000/C800 y A650/C900).

Nomenclatura	Mezcla (A1000/C800)	Mezcla (A650/C900)
Potencial Oxido Reducción (ORP) en V	733.3	239.1
Partículas totales (ppm)	682	864
pH	7.08	12.44

Utilizando membranas con 2 mm de espesor a un potencial de 30 V durante 90 min, se obtuvieron los resultados mostrados en la **Tabla 45**, experimentos realizados por triplicado.

Tabla 45. Valores Medidos (Potencial 30V - Tiempo 90min).

Nomenclatura	Aniónica Obtenidos (1)	Aniónica Obtenidos (2)	Aniónica Obtenidos (3)
Potencial Oxido Reducción (ORP) en V	925	932	1081
Partículas totales (ppm)	1390	1380	1490
pH	2.58	2.62	1.40
Tiempo (min)	90		

Utilizando membranas con 2 mm de espesor a un potencial de 30 V durante 30 min, se obtuvieron los resultados mostrados en la **Tabla 46** , experimentos realizados por triplicado.

Tabla 46. Valores Medidos (Potencial 30V - Tiempo 30min).

Nomenclatura	Aniónica Obtenidos (1)	Aniónica Obtenidos (2)	Aniónica Obtenidos (3)
Potencial Oxido Reducción (ORP) en V	1032	1050	1042
Partículas totales (ppm)	959	975	960
pH	2.60	2.64	2.57
Tiempo (min)	30		

Utilizando membranas con 2 mm de espesor a un potencial de 30 V durante 20 min, se obtuvieron los resultados mostrados en la **Tabla 47**, experimentos realizados por triplicado.

Tabla 47. Valores Medidos (Potencial 30V - Tiempo 20min).

Nomenclatura	Aniónica Obtenidos (1)	Aniónica Obtenidos (2)	Aniónica Obtenidos (3)
Potencial Oxido Reducción (ORP) en V	1134	1102	1120
Partículas totales (ppm)	1225	1257	1219
pH	2.00	2.08	2.12
Tiempo (min)	20		

Utilizando membranas con 2 mm de espesor a un potencial de 30 V durante 10 min, se obtuvieron los resultados mostrados en la **Tabla 48**, experimentos realizados por triplicado.

Tabla 48. Valores Medidos (Potencial 30V - Tiempo 10min).

Nomenclatura	Aniónica Obtenidos (1)	Aniónica Obtenidos (2)	Aniónica Obtenidos (3)
Potencial Oxido Reducción (ORP) en V	1000	991	1007
Partículas totales (ppm)	904	902	1490
pH	2.70	2.72	2.65
Tiempo (min)	10		

Los experimentos de electrólisis por corriente directa para la generación de ASO en laboratorio mostrados en la **Tabla 48** nos arrojan resultados muy favorables con valores como los sugeridos por la literatura [37], para distancias cortas entre membranas para valores de 68 mm o menores, a potenciales en los rangos de los 30 V, en tiempos de 10 min, para membranas de 2 mm de espesor. Estas soluciones serán utilizadas justo después del momento de ser creadas para la formulación de los electrolitos acuosos base ASO para los siguiente ensayos electroquímicos, con la intensión de generar capas de NT de TiO_2 sobre la superficie de Ti y la aleación Ti_6Al_4V.

4.8 Modificación Superficial con Electrolitos ASO de Laboratorio.

Los siguientes ensayos fueron realizados con soluciones electrolíticas base ASO realizadas en el laboratorio a las condiciones previamente identificadas como óptimas e identificadas en la **Tabla 11** para la generación de capas de NT de TiO_2, sobre la aleación Ti_6Al_4V. Las condiciones y parámetros específicos de cada ensayo serán especificadas en su respectiva sección.

4.9 Soluciones Electrolíticas Utilizando ASO de Laboratorio.

La **Tabla 49** muestra las soluciones electrolíticas utilizadas para los siguientes ensayos electroquímicos derivados de la **Tabla 5**, dos de las soluciones identificadas como soluciones óptimas previamente utilizadas son nuevamente formuladas con ASO de laboratorio, así como la solución 10 como nueva propuesta electrolítica. El resumen general de las condiciones y resultados obtenidos de estos ensayos, se muestran en la **Tabla 50**. En la sección 4.10 se muestran los ensayos y resultados obtenidos para cada caso, habiendo sido todos estos realizados por triplicado.

Tabla 49. Tabla de Soluciones Propuestas para ASO Laboratorio.

Solución	Soluto NH_4F (gr)	Etilenglicol (ml)	ASO Laboratorio (ml)
2	0.50	50	50
6	0.50	25	75
10	0.50	75	25

La solución electrolítica 10 evaluara la utilización de una mayor cantidad de surfactante (Etilenglicol), aumentando así la viscosidad del electrolito y su humectabilidad para el estudio de los efectos sobre la superficie.

Tabla 50. Resumen General de Resultados: Soluciones con ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
18	M18	2	10	20	49	367	8	1.25
19	M19	2	10	20	100	370	10	1.52
20	M20	2	5	20	80	260	8	1.67
21	M21	6	5	20	70	250	9	1.61
22	M22	6	10	20	65	330	8	1.61
23	M23	6	20	15	70	450	9	1.59
24	M24	6	20	20	80	480	10	1.57
25	M25	6	20	10	60	380	6	1.60
26	M26	6	10	10	62	250	5	1.62
27	M27	6	15	5	11	270	2	1.58
28	M28	6	15	10	20	310	5	1.57
29	M29	6	10	15	37	275	6	1.59
30	M30	6	20	5	10	250	2	1.61
31	M31	6	20	15	80	400	8	1.64
32	M32	Blanco						
33	M33	10	20	20	100	480	12	1.59
34	M34	10	20/5	15-20	60	380	8	1.63
35	M35	10	20/5	10-15	60	350	8	1.62
36	M36	10	20/10	15-20	85	395	13	1.65
37	M37	10	20/10	10-15	65	385	11	1.58
38	M38	10	40	20	115	490	15	1.62
39	M39	10	40	15	100	470	12	1.61
40	M40	10	60	20	105	540	15	1.62
41	M41	10	60	15	95	510	11	1.67
42	M42	10	60/10	15-20	80	520	13	1.64
43	M43	10	60/10	10-15	70	470	11	1.63
44	M44	10	40/10	10-15	65	400	13	1.58
45	M45	10	40/10	15-20	100	420	20	1.62

4.10 Anodizados con Soluciones Electrolíticas Utilizando ASO de Laboratorio.

Tabla 51. Muestra M18: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
18	M18	2	10	20	49	367	8	1.25

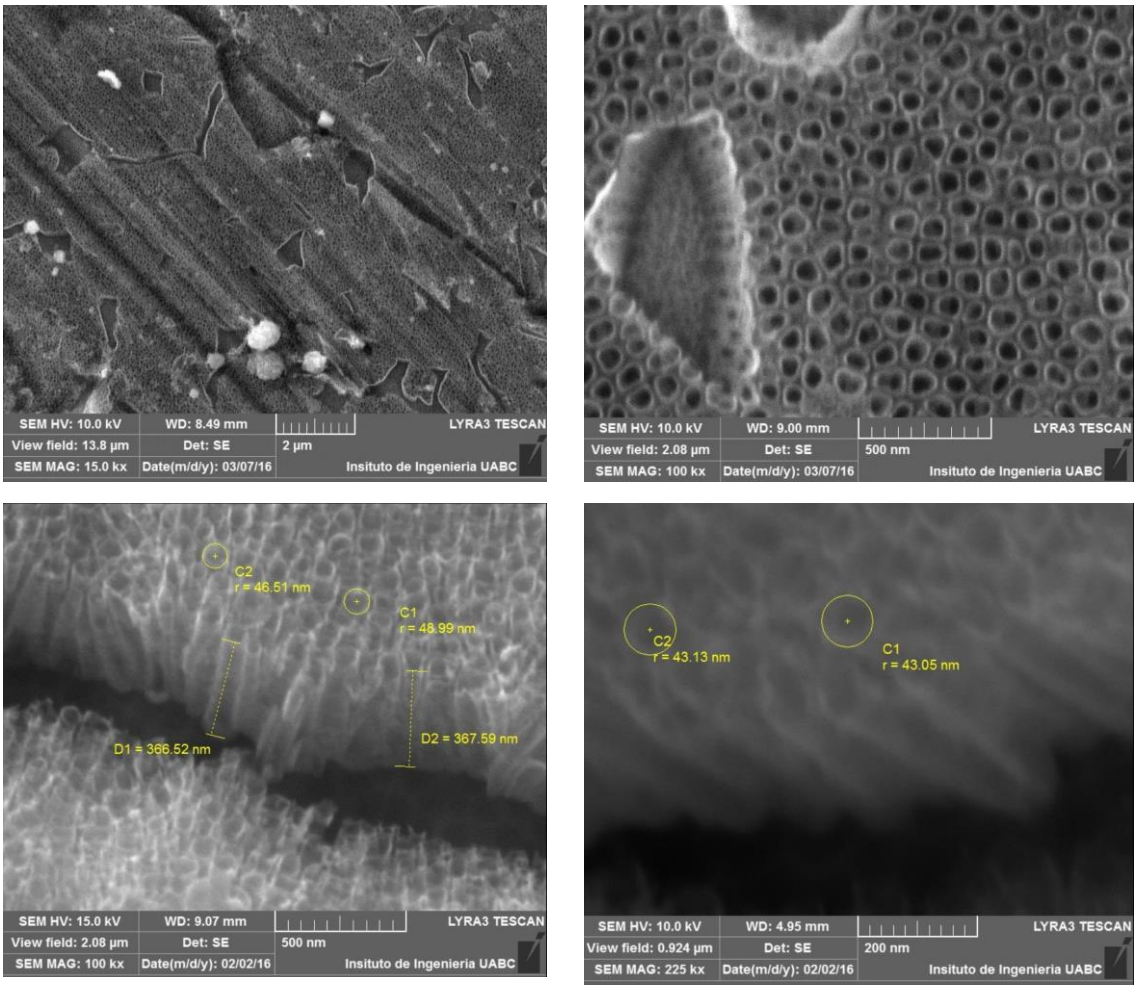


Figura 52. Muestra M18, Ti_6Al_4V, solución 2, 10min a 20V (SEM).

El acabado superficial de la muestra M18 fue realizado hasta la hoja de carburo de silicio número 1200, otorgándole un acabado superficial con una rugosidad mucho mayor, algunas de las líneas del acabado son visibles, en la muestra.

Al final del anodizado la muestra fue bañada a chorro de agua desionizada como parte del proceso estándar que se estuvo realizando para cada una de las muestras, aunado a esto la pieza fue sometida a un proceso de sonicado a 30Mhz por 10min con acetona, con la intensión de obtener una capa superficial libre de impurezas o depósitos generaros por el proceso de anodizado. Debido a la utilización de este proceso es posible observar de forma muy clara rompimientos de la capa límite sobre la superficie de NT en algunas zonas. Por este motivo se estudiará en futuros ensayos la utilización del proceso de sonicado a tiempos más cortos con la intención de reducir el riesgo de corrosión por cavitación.

Para la muestra M19 el acabado superficial fue tipo espejo con alúmina de 0.005micras, utilizando las mismas condiciones para el anodizado de la muestra M18 como se muestra la **Tabla 52** se procedió a modificar la superficie. Una vez finalizado el anodizado se sometió la muestra al baño de agua desionizada y al proceso de sonicado con acetona a 30Mhz por 5min para remover las impurezas de la superficie, reduciendo el tiempo para evitar el riesgo de corrosión por cavitación.

La **Figura 53**, muestra resultados como los obtenidos previamente para la muestra M18, solo que las características generales para la muestra M19 respecto al diámetro del NT es más homogénea encontrando diámetros de 100nm, en contraste con la muestra M18 donde se pudieron observar zonas con diámetros de NT de hasta 45nm. Esta reducción en el diámetro del nanotubo se le puede atribuir al acabado superficial, siendo este de una mayor rugosidad la densidad del potencial no se distribuye de manera tan uniforme como en el caso de las superficies pulidas acabado espejo [21]. La reducción en el tiempo de sonicado reduce considerablemente los problemas de cavitación, sin embargo estos continúan a un presente. La **Tabla 52** muestra las condiciones generales del proceso para esta muestra.

Tabla 52. Muestra M19: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
19	M19	2	10	20	100	370	10	1.52

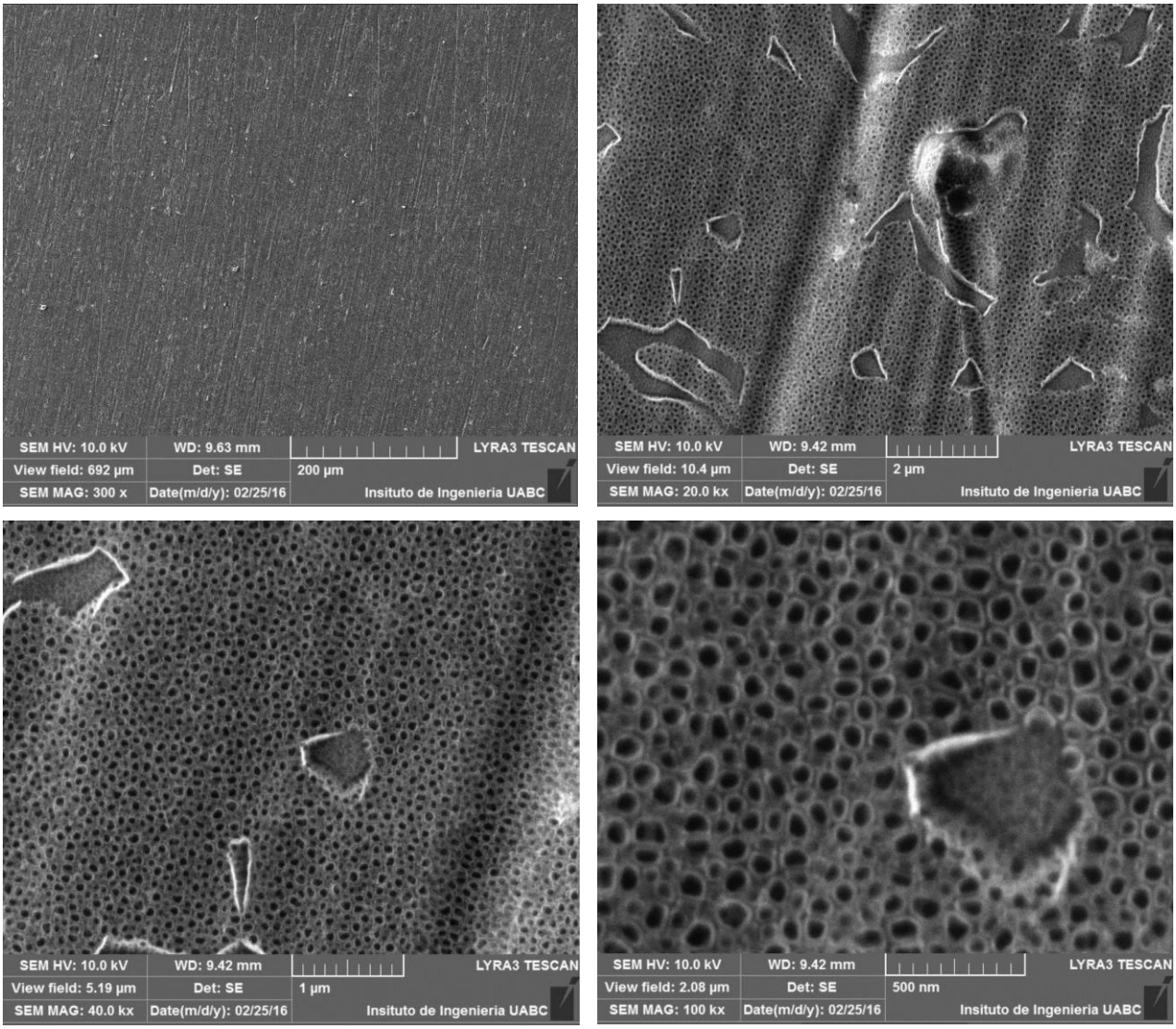


Figura 53. Muestra M19, Ti_6Al_4V, solución 2, 10min a 20V (SEM).

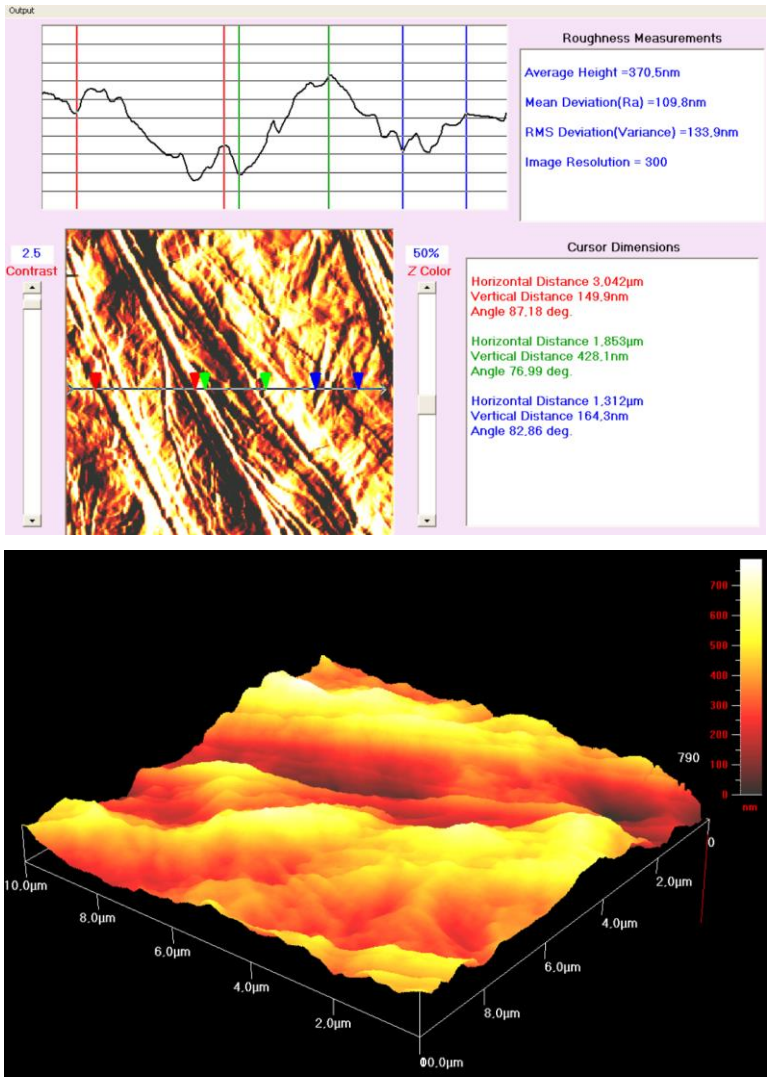


Figura 54. Muestra M19, Ti_6Al_4V, solución 2, 10min a 20V (AFM).

El análisis superficial de la muestra M19 por AFM nos confirma los resultados obtenidos por SEM para la longitud promedio de los NT y la rugosidad promedio de la superficie modificada.

Tabla 53. Muestra M20: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
20	M20	2	5	20	80	260	8	1.67

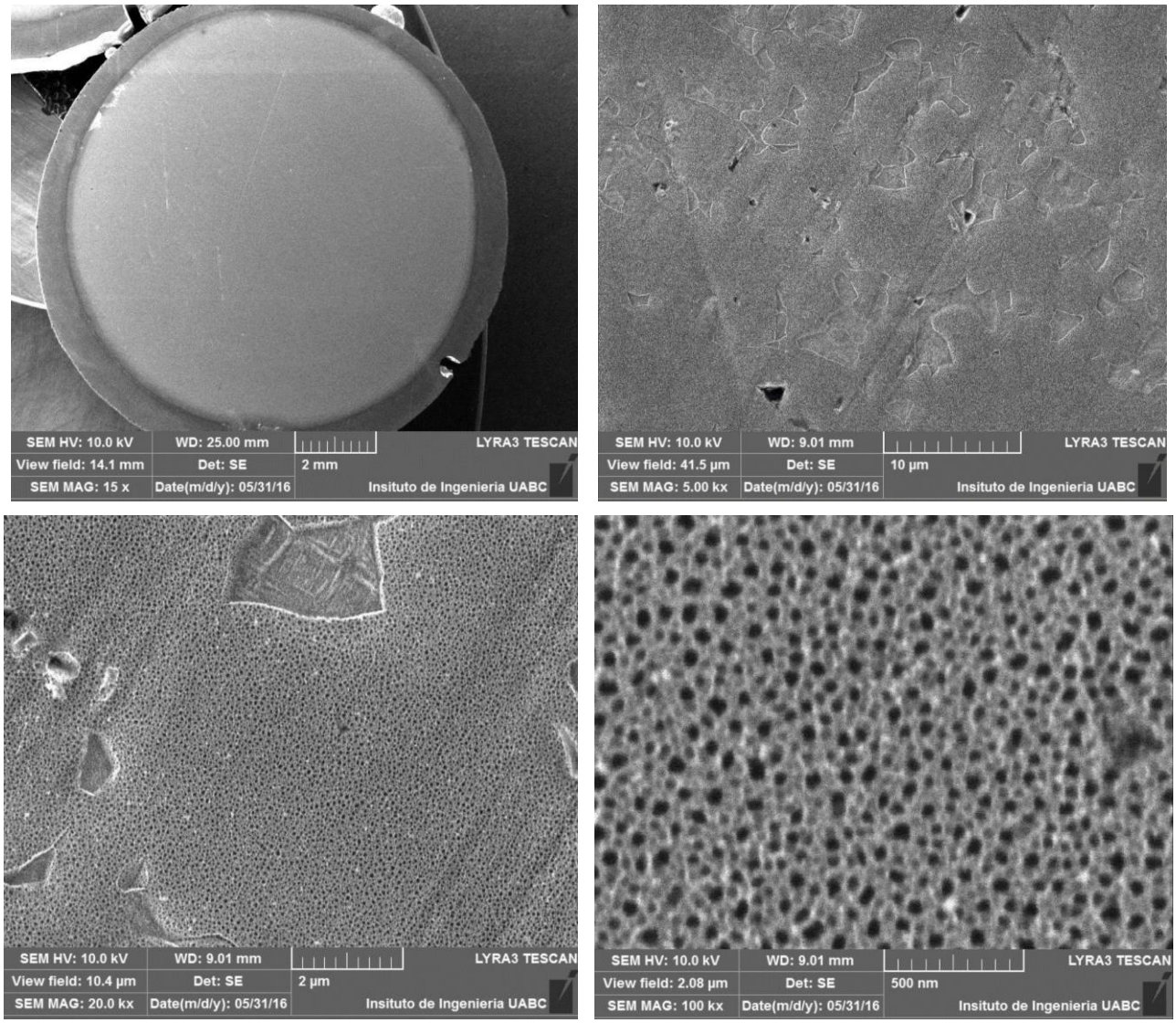


Figura 55. Muestra M20, Ti_6Al_4V, solución 2, 5min a 20V (SEM).

Tabla 54. Muestra M21: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
21	M21	6	5	20	70	250	9	1.61

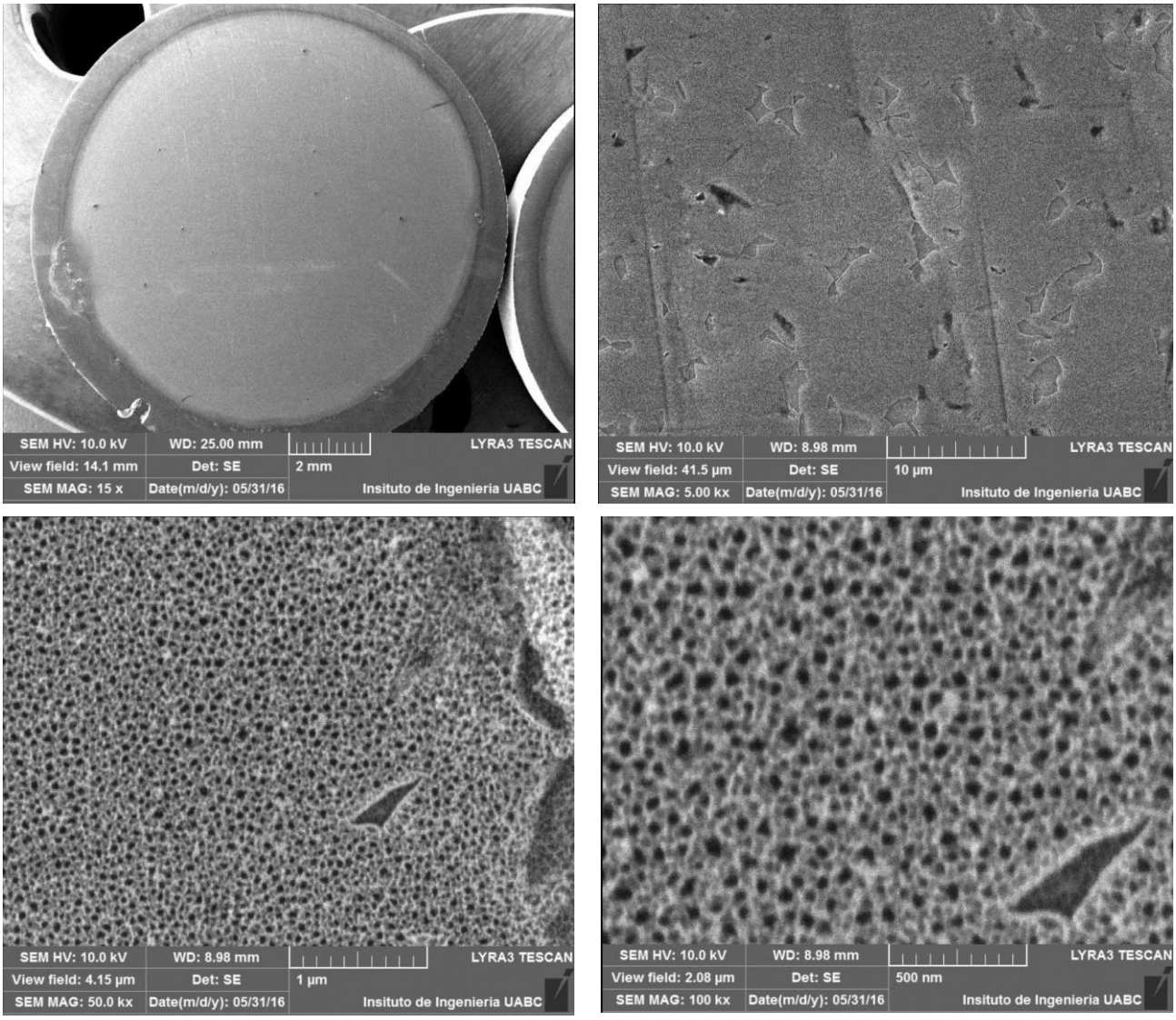


Figura 56. Muestra M21, Ti_6Al_4V, solución 6, 5min a 20V (SEM).

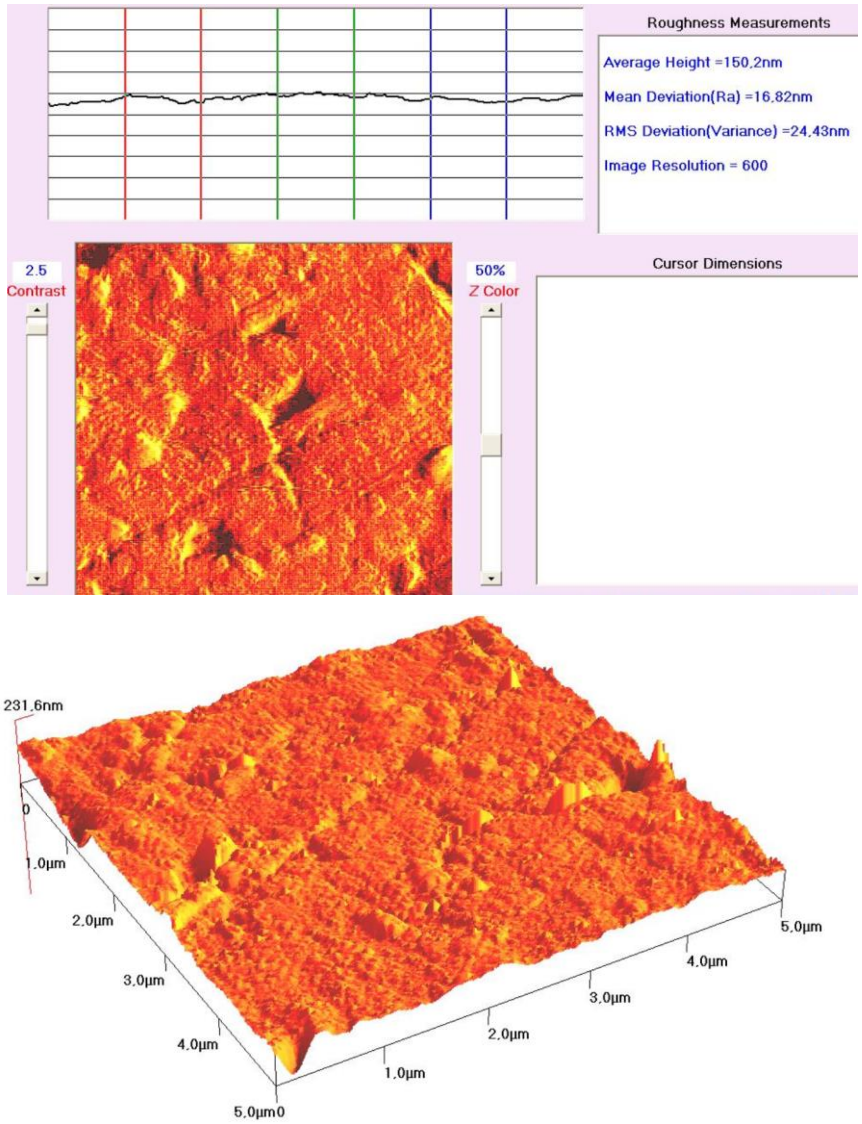


Figura 57. Muestra M21, Ti_6Al_4V, solución 6, 5min a 20V (AFM).

Tabla 55. Muestra M22: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
22	M22	6	10	20	65	330	8	1.61

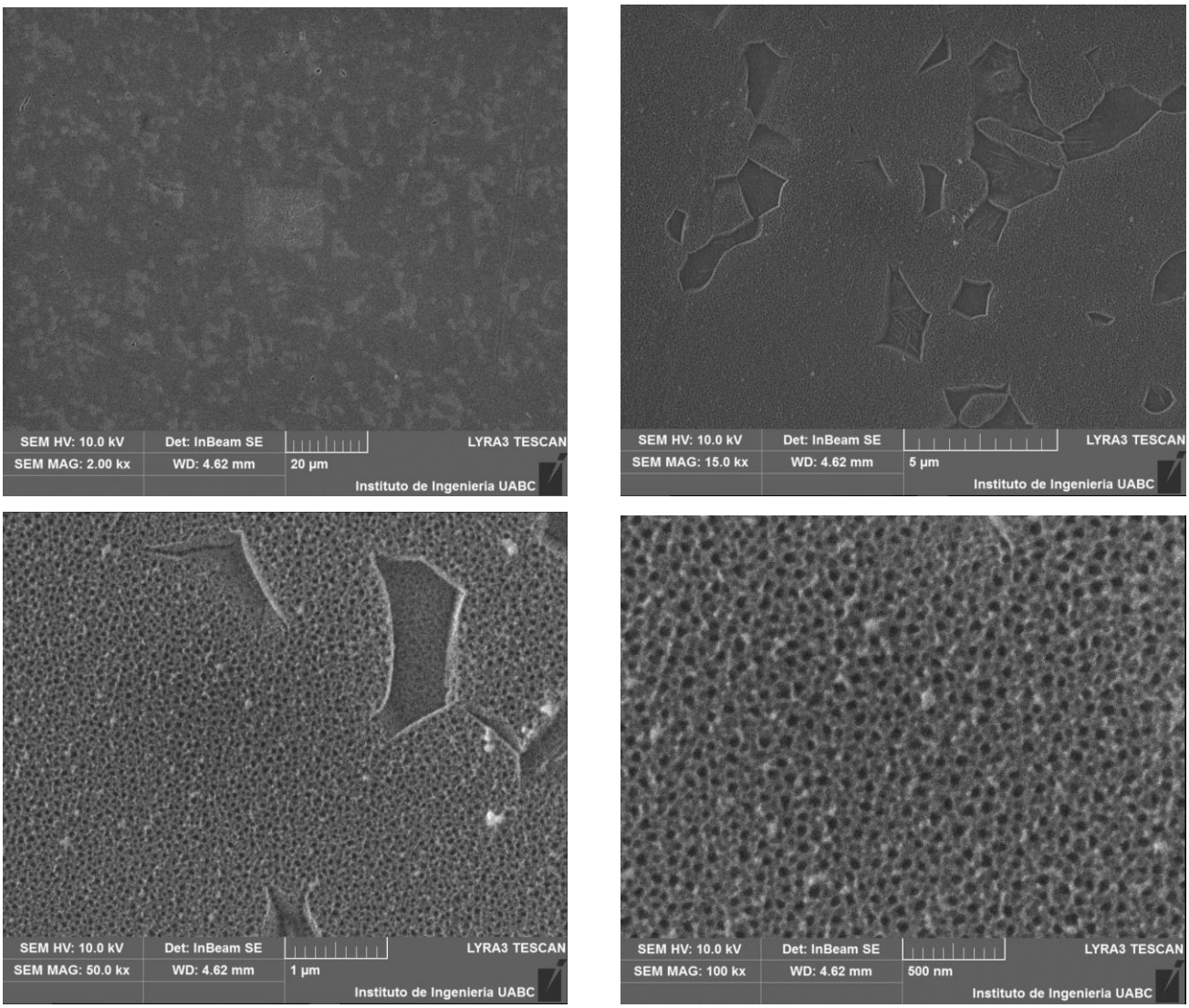


Figura 58. Muestra M22, Ti_6Al_4V, solución 6, 10min a 20V (SEM).

Tabla 56. Muestra M23: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
23	M23	6	20	15	70	450	9	1.59

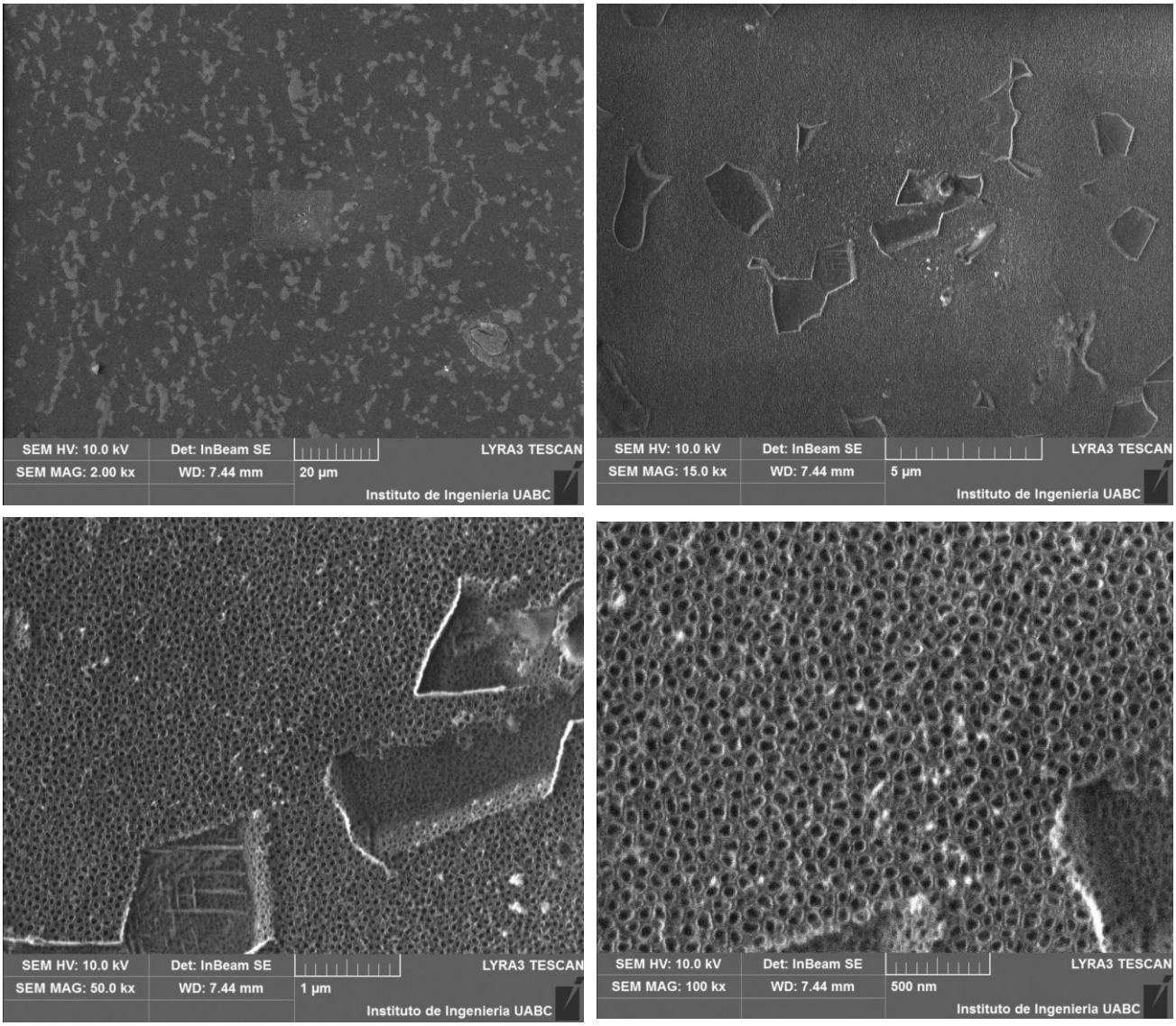


Figura 59. Muestra M23, Ti_6Al_4V, solución 6, 20min a 15V (SEM).

Tabla 57. Muestra M24: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
24	M24	6	20	20	80	480	10	1.57

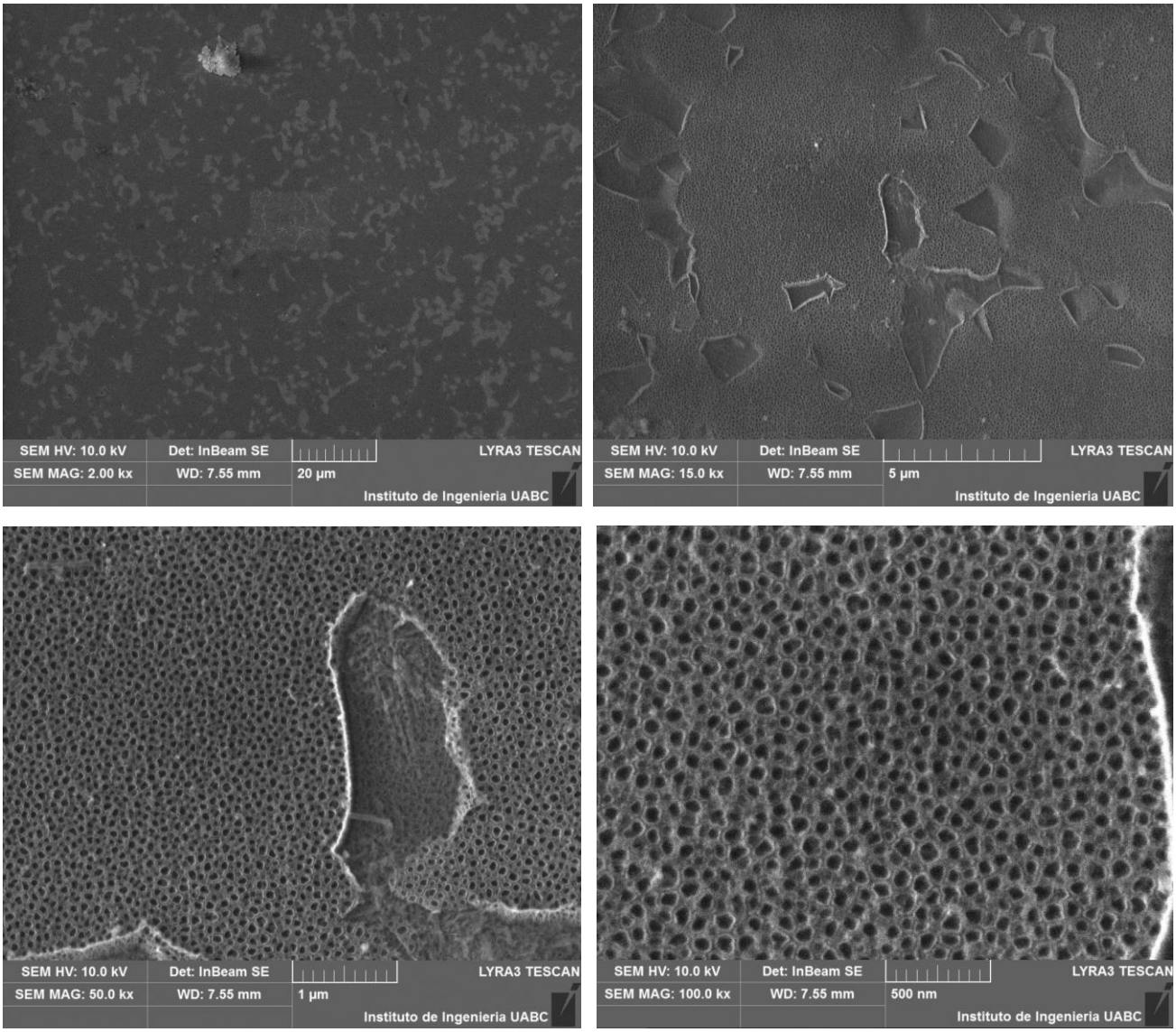


Figura 60. Muestra M24, Ti_6Al_4V, solución 6, 20min a 20V (SEM).

Tabla 58. Muestra M25: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
25	M25	6	20	10	60	380	6	1.60

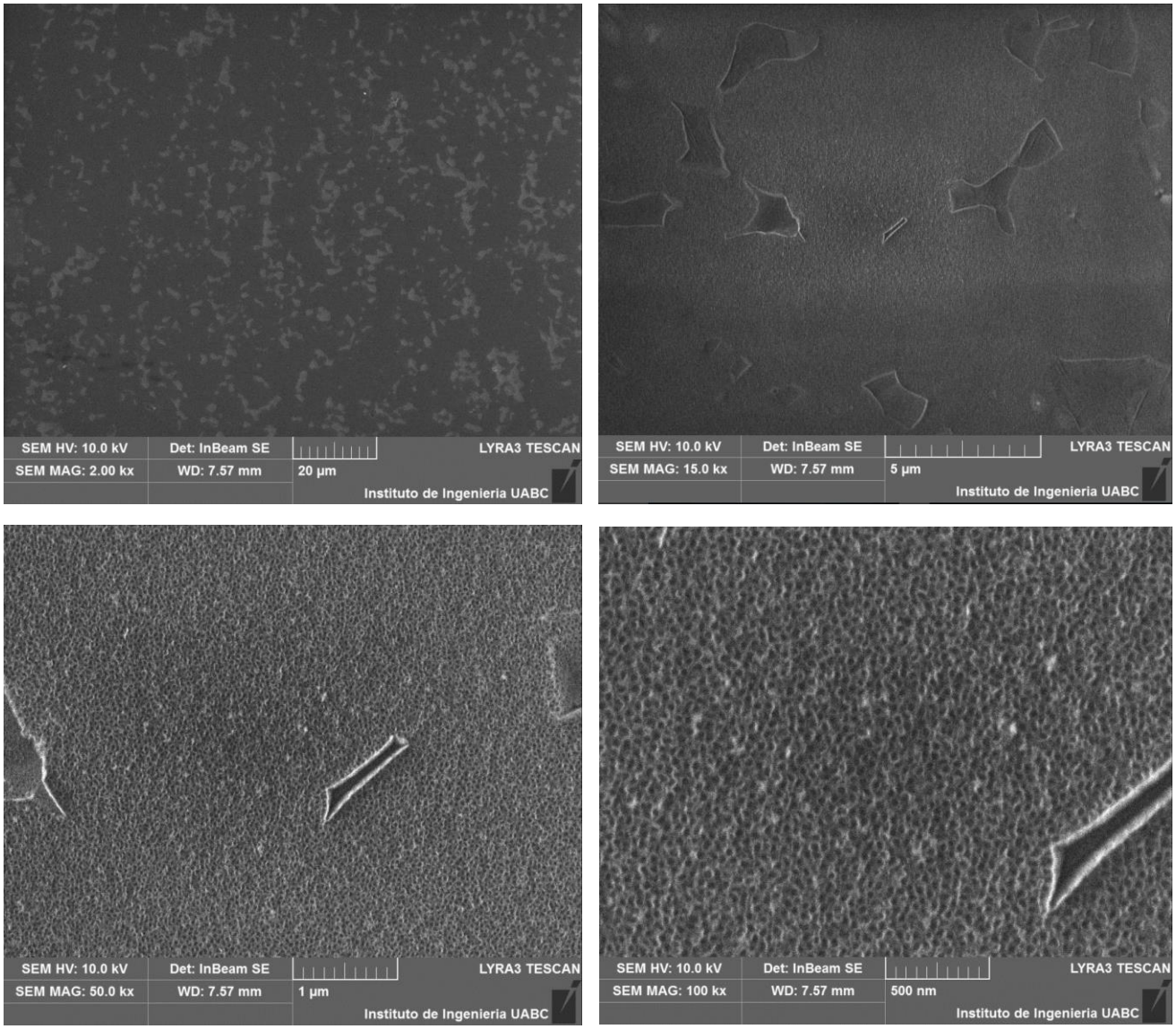


Figura 61. Muestra M25, Ti_6Al_4V, solución 6, 20min a 10V (SEM).

Tabla 59. Muestra M26: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
26	M26	6	10	10	62	250	5	1.62

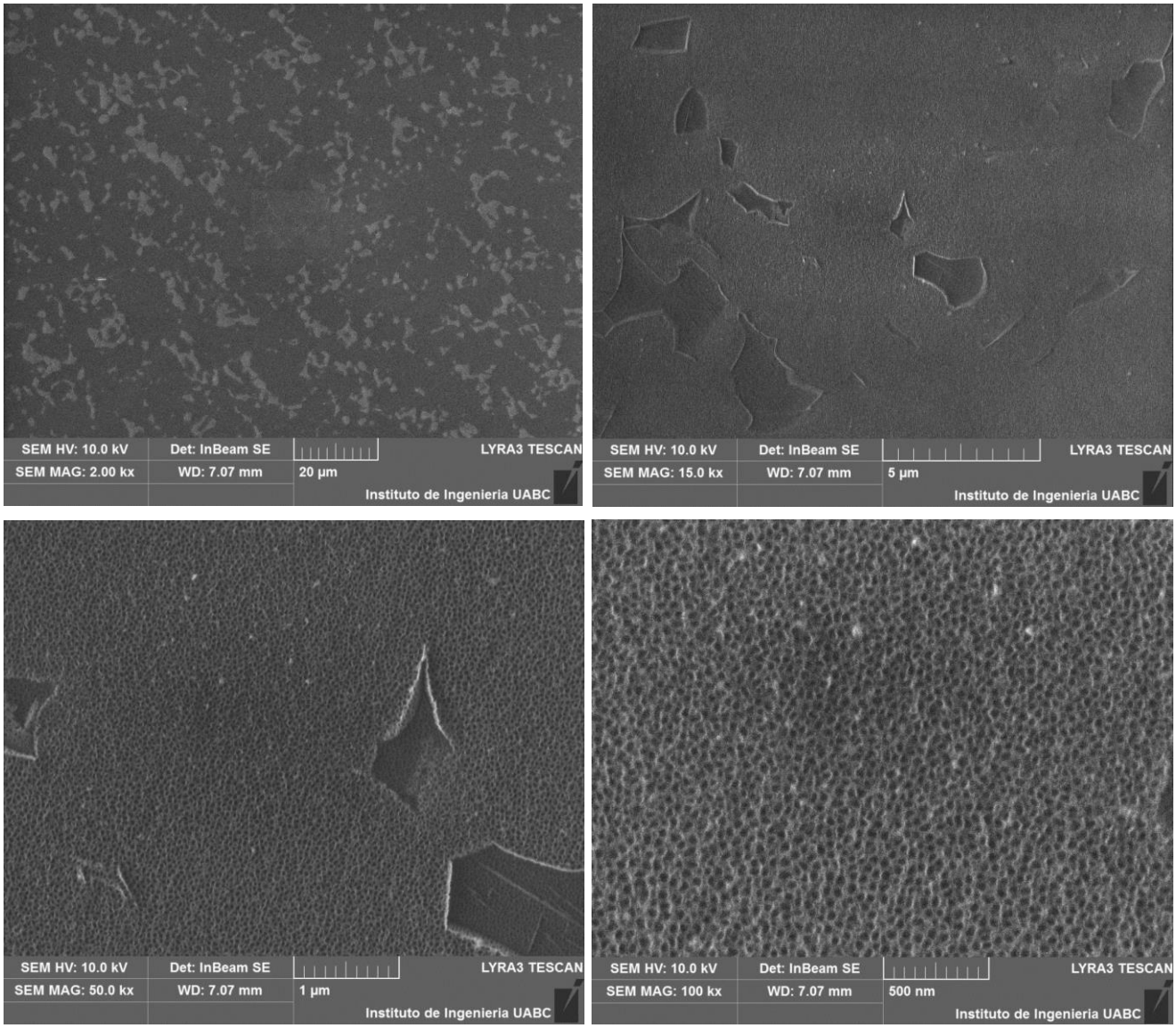


Figura 62. Muestra M26, Ti_6Al_4V, solución 6, 10min a 10V (SEM).

Tabla 60. Muestra M27: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
27	M27	6	15	5	11	270	2	1.58

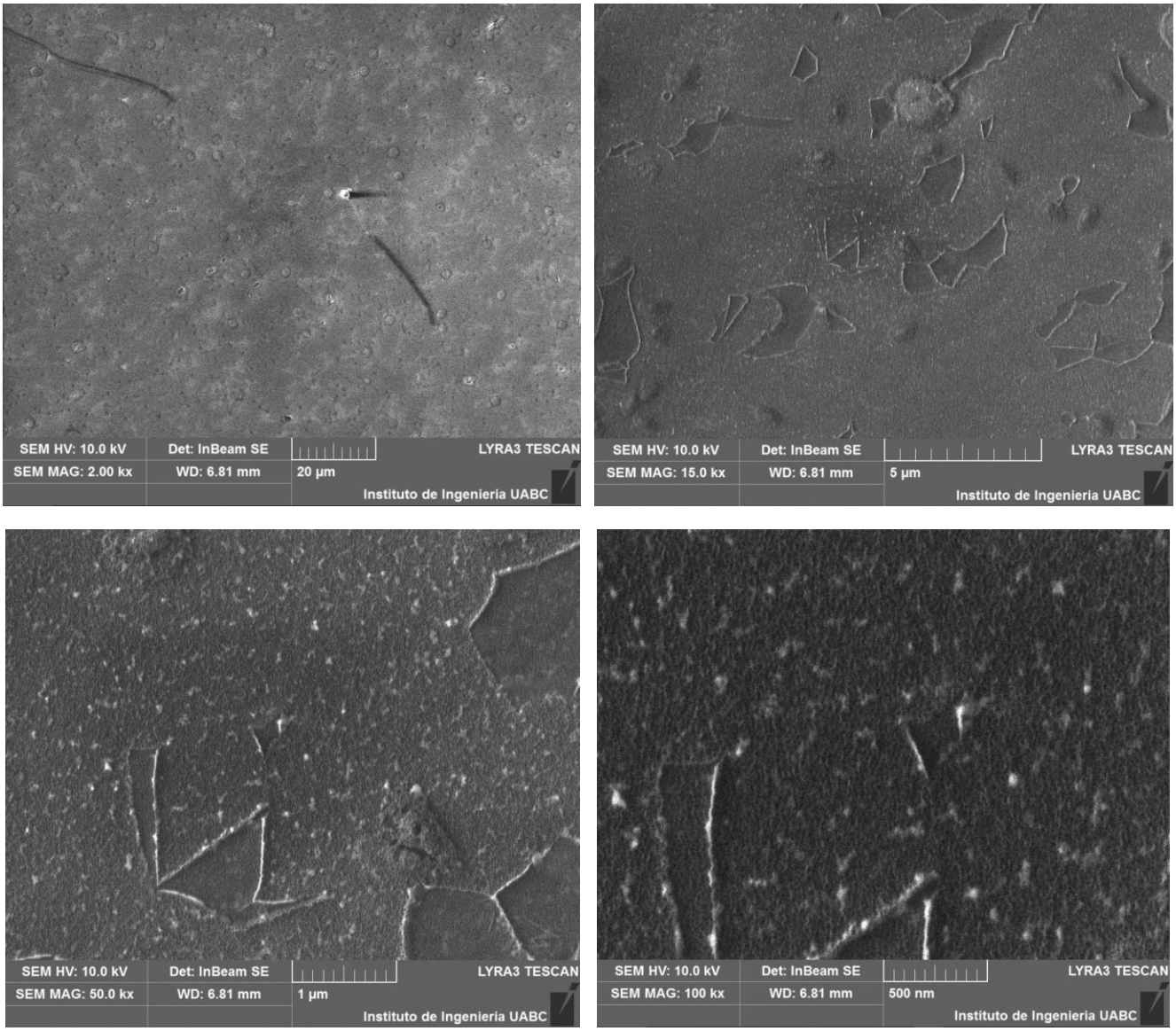


Figura 63. Muestra M27, Ti_6Al_4V, solución 6, 15min a 5V (SEM).

Tabla 61. Muestra M28: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
28	M28	6	15	10	20	310	5	1.57

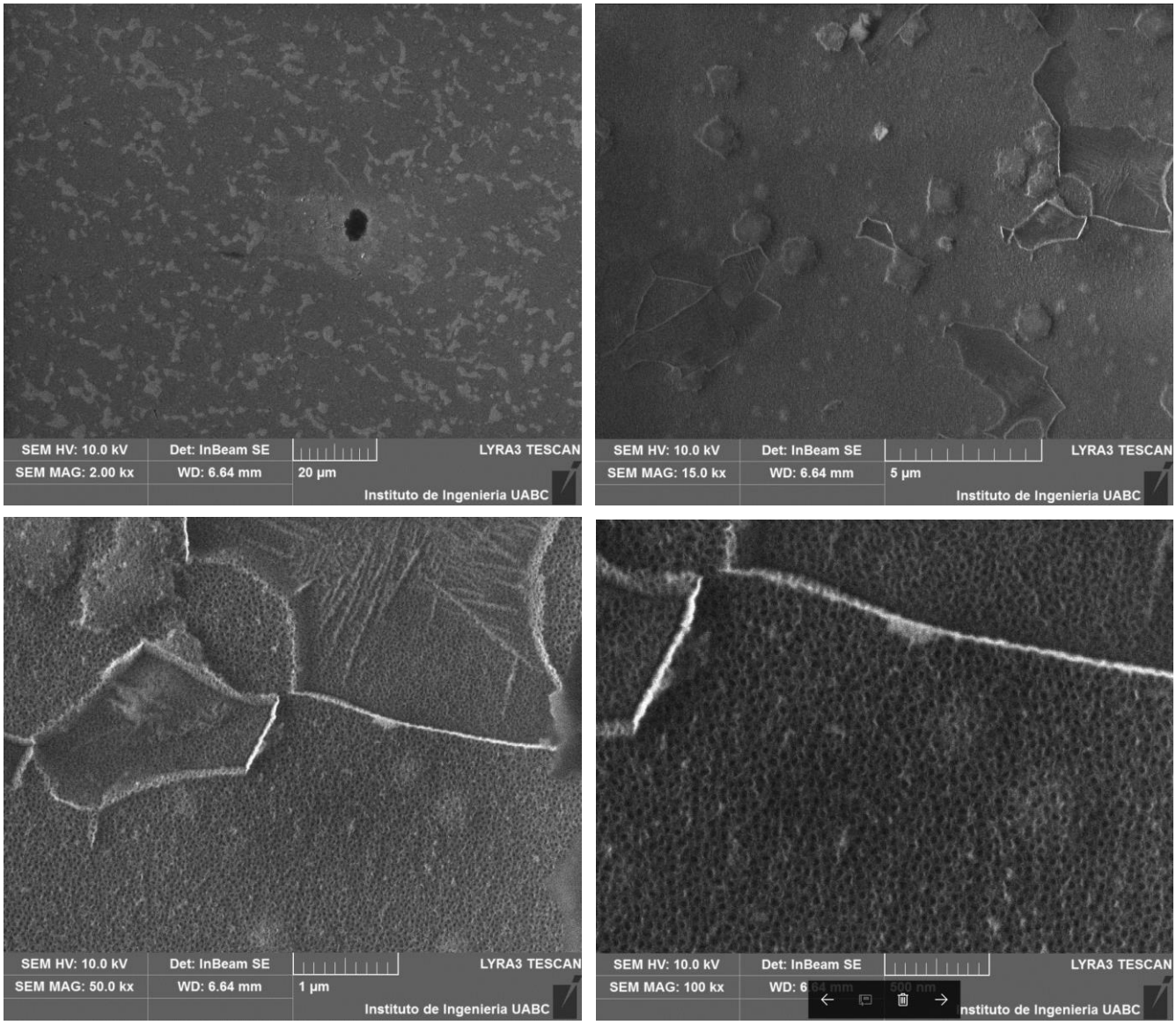


Figura 64. Muestra M28, Ti_6Al_4V, solución 6, 15min a 10V (SEM).

Tabla 62. Muestra M29: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
29	M29	6	10	15	37	275	6	1.59

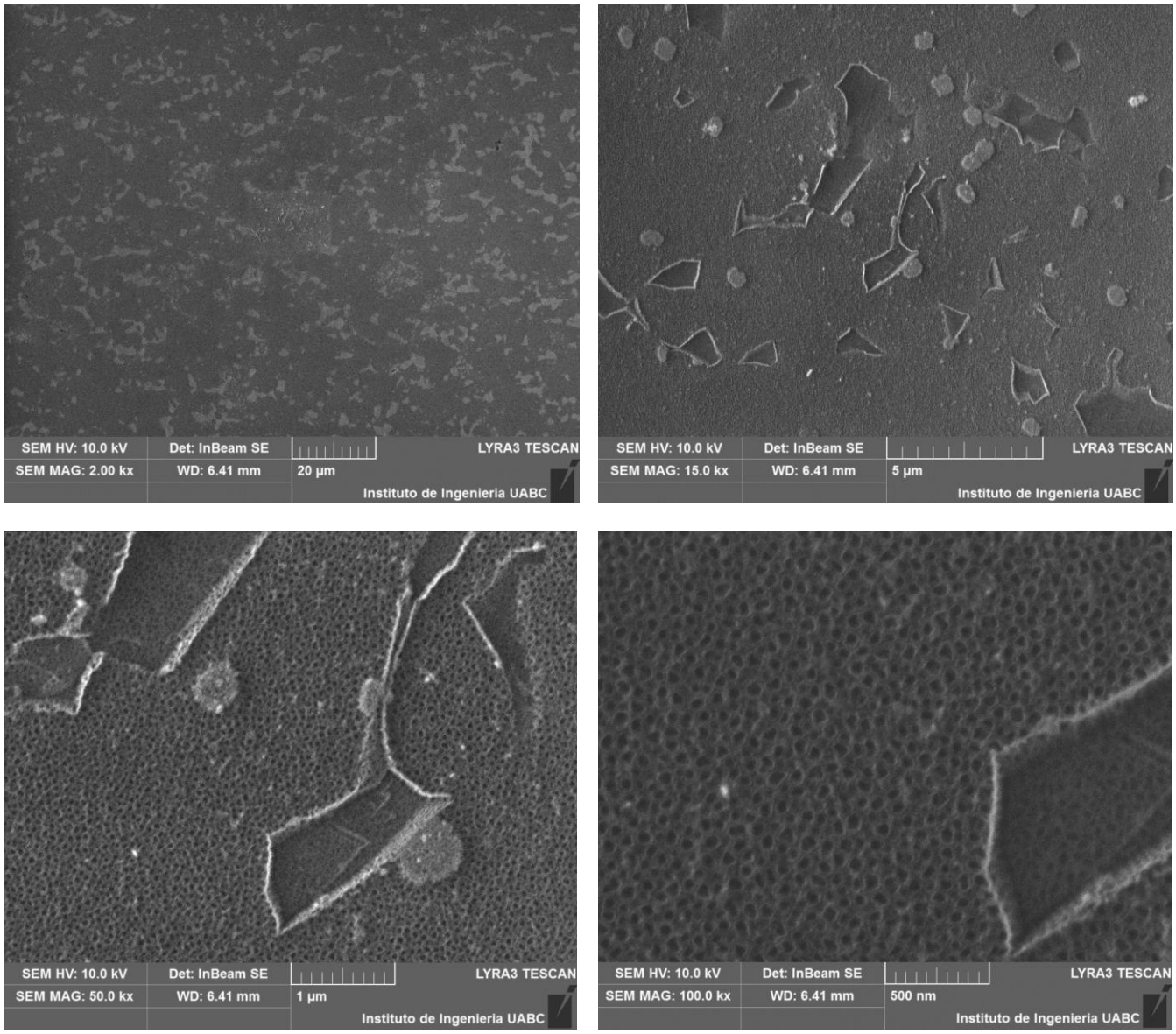


Figura 65. Muestra M29, Ti_6Al_4V, solución 6, 15min a 10V (SEM).

Tabla 63. Muestra M30: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
30	M30	6	20	5	10	250	2	1.61

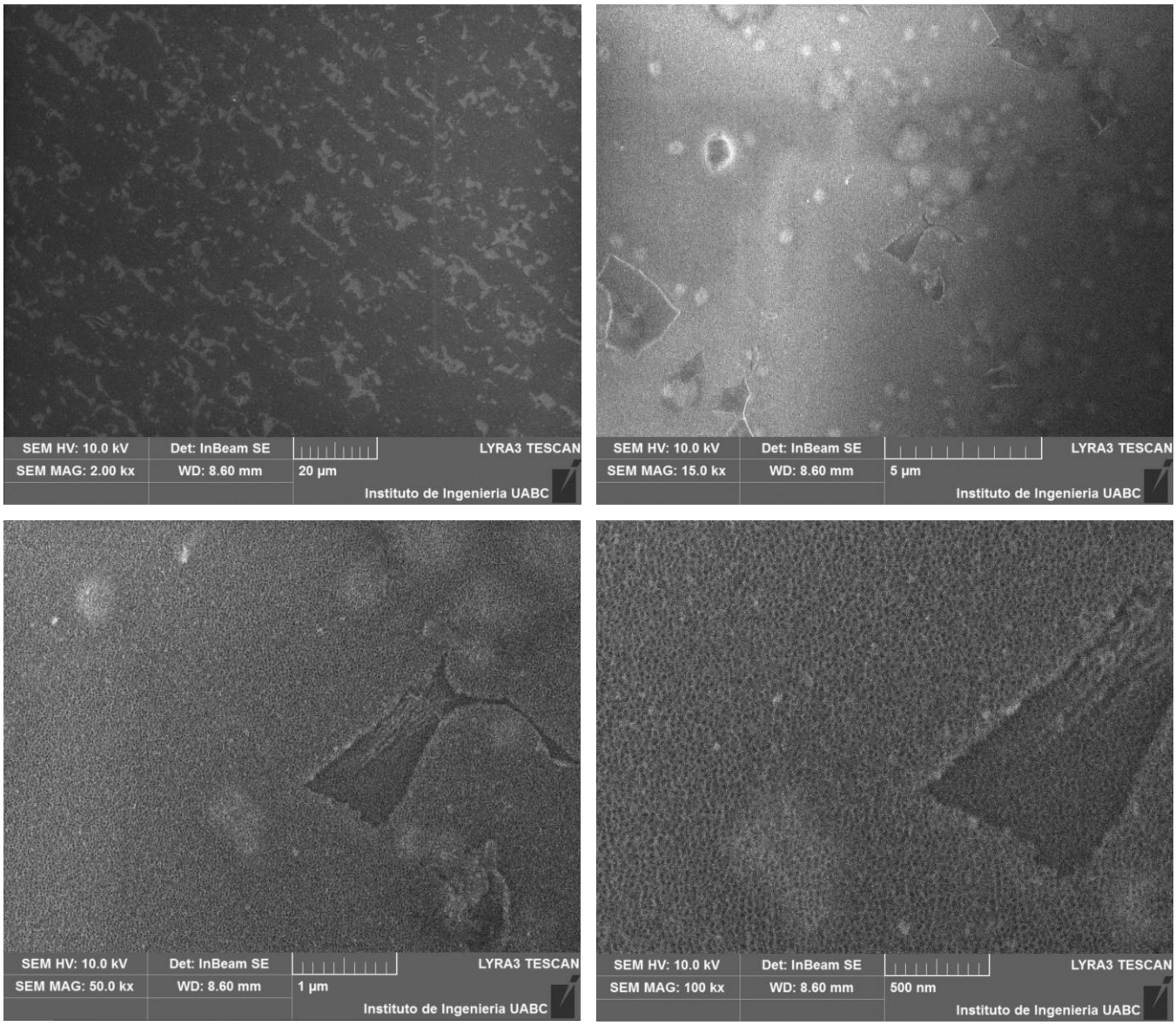


Figura 66. Muestra M30, Ti_6Al_4V, solución 6, 20min a 5V (SEM).

Tabla 64. Muestra M31: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
31	M31	6	20	15	80	400	8	1.64

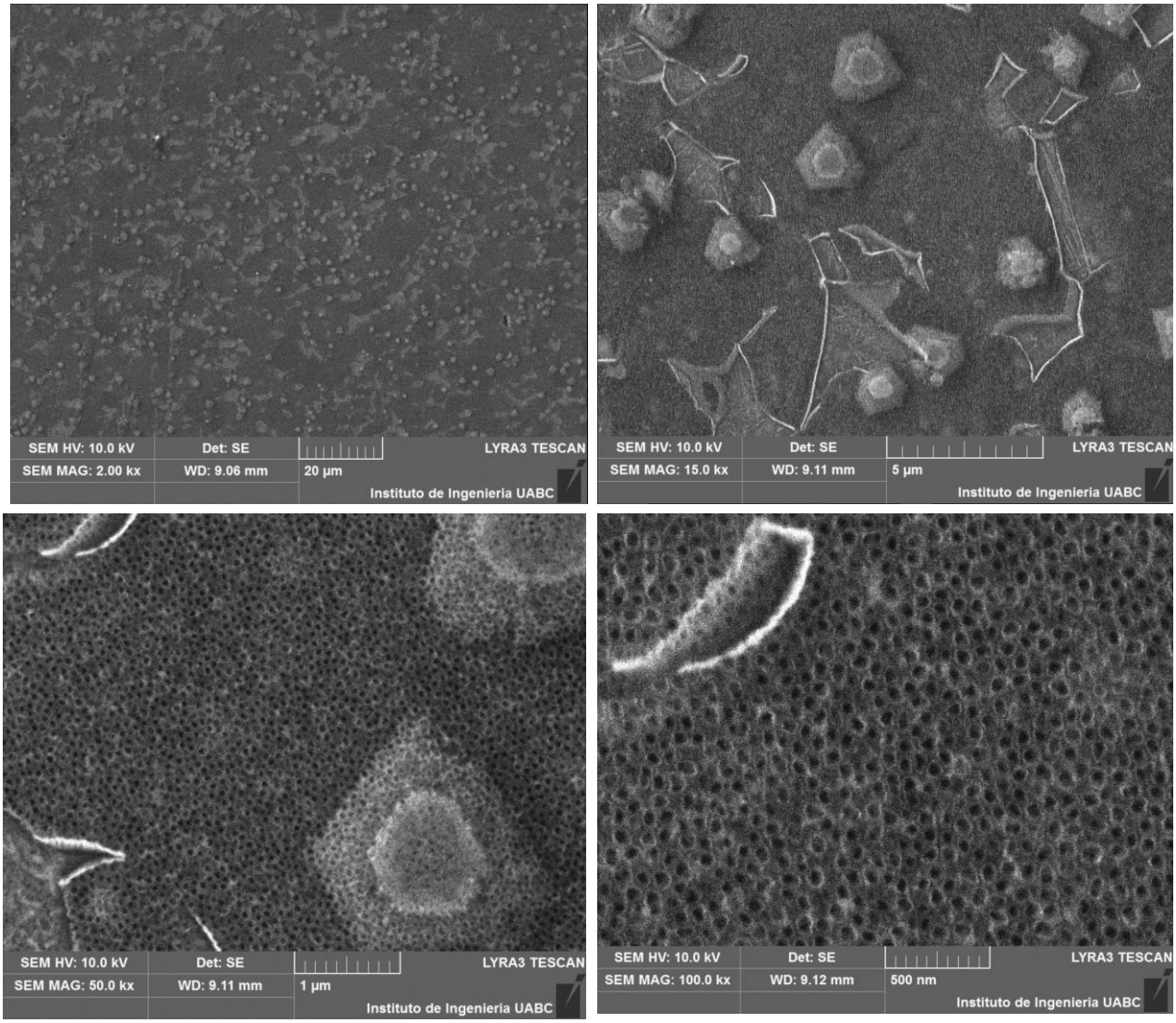


Figura 67. Muestra M31, Ti_6Al_4V, solución 6, 20min a 15V (SEM).

Tabla 65. Muestra M32: Blanco Ti_6Al_4V.

Aleación: Ti_6Al_4V		
Experimento	Muestra	Blanco
32	M32	

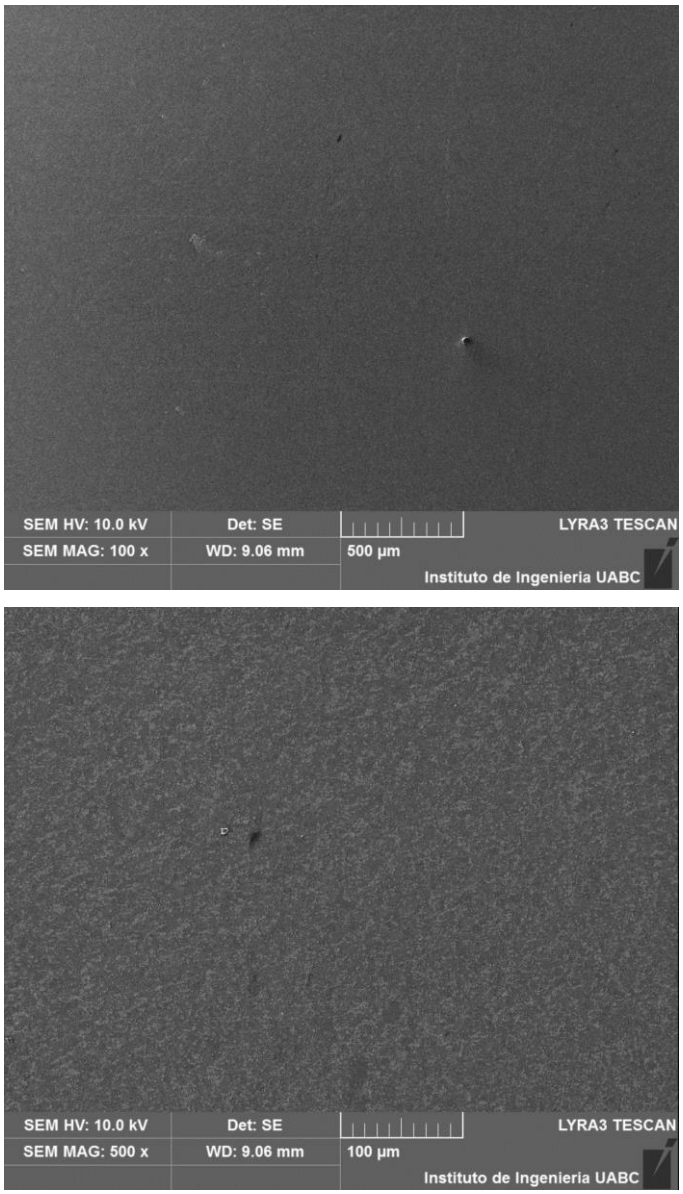


Figura 68. Muestra M32, Ti_6Al_4V, Blanco (SEM).

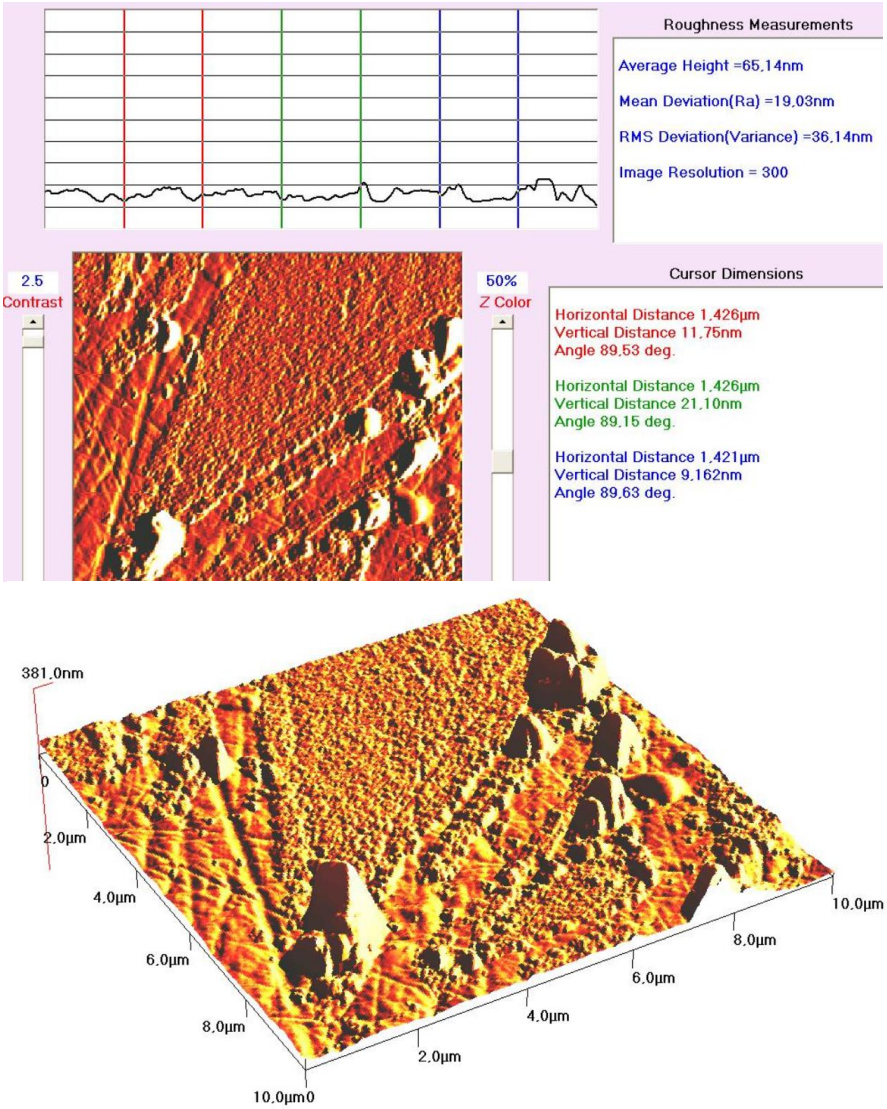


Figura 69. Muestra M32, Ti_6Al_4V, Blanco (AFM).

Tabla 66. Muestra M30: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
33	M33	10	20	20	100	480	12	1.59

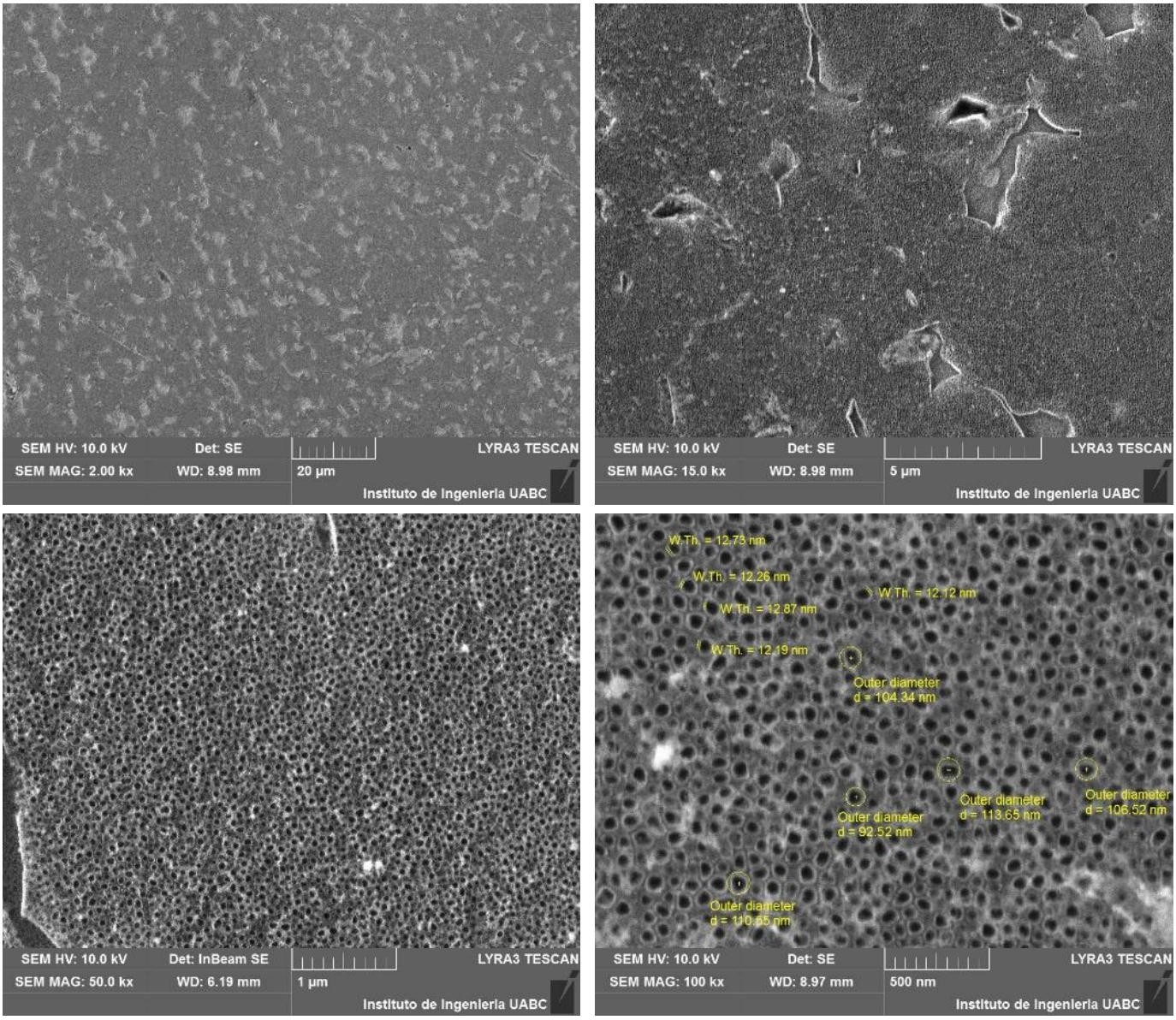


Figura 70. Muestra M33, Ti_6Al_4V, solución 10, 20min a 20V (SEM).

Tabla 67. Muestra M34: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
34	M34	10	20/5	15-20	60	380	8	1.63

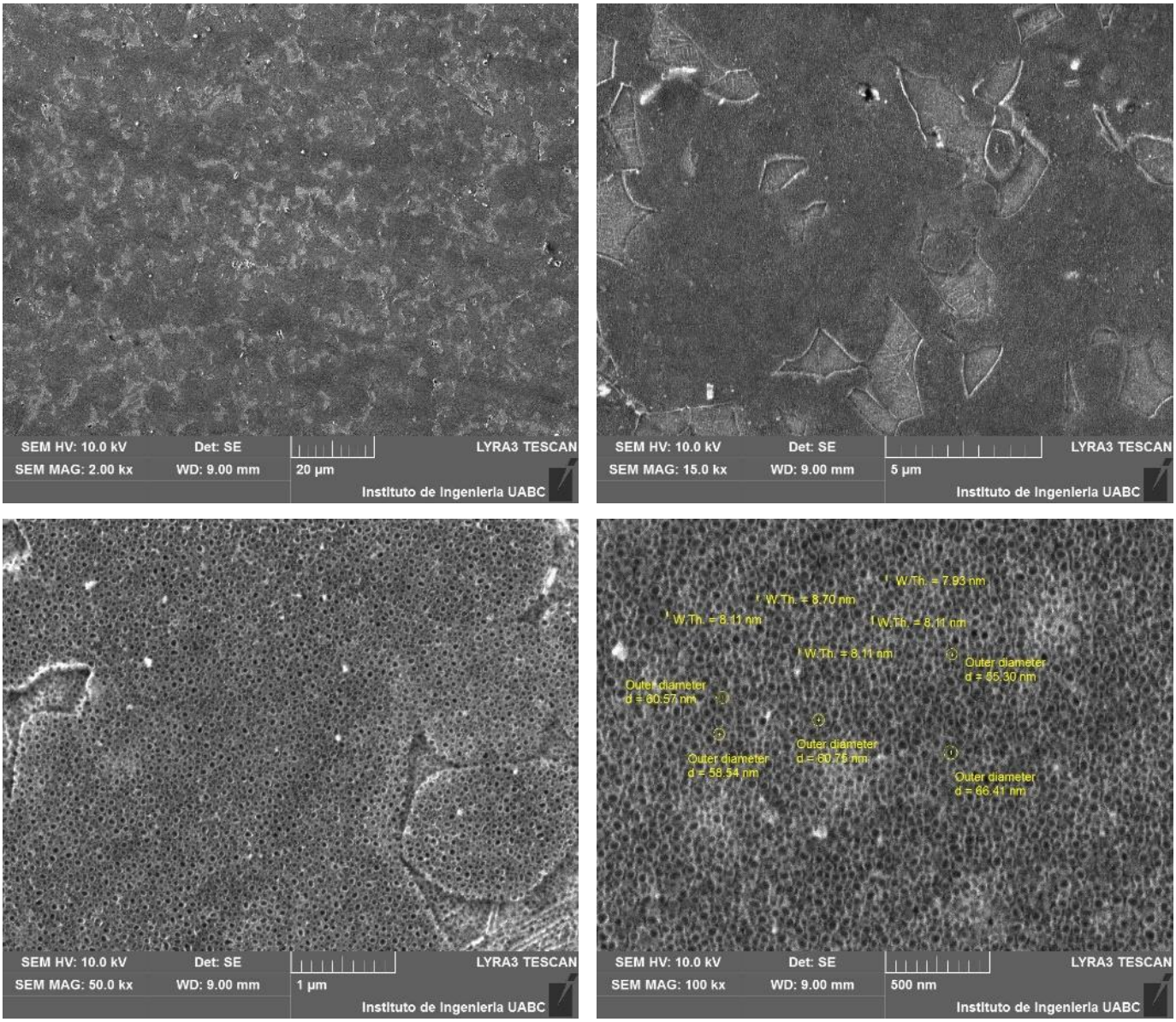


Figura 71. Muestra M34, Ti_6Al_4V, solución 10, 20/5min a 15-20V (SEM).

Tabla 68. Muestra M35: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
35	M35	10	20/5	10-15	60	350	8	1.62

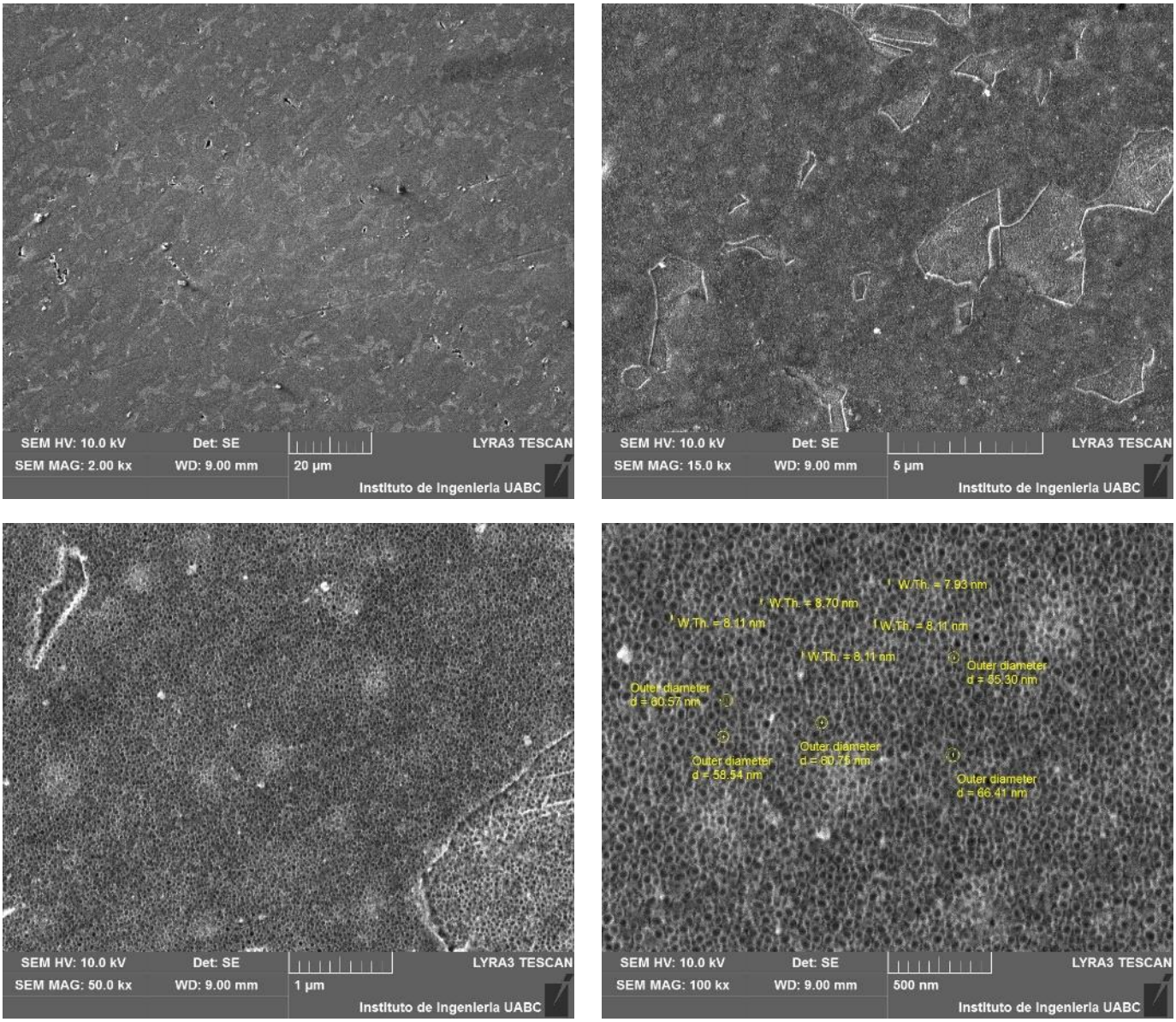


Figura 72. Muestra M35, Ti_6Al_4V, solución 10, 20/5min a 10-15V (SEM).

Tabla 69. Muestra M36: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
36	M36	10	20/10	15-20	85	395	13	1.65

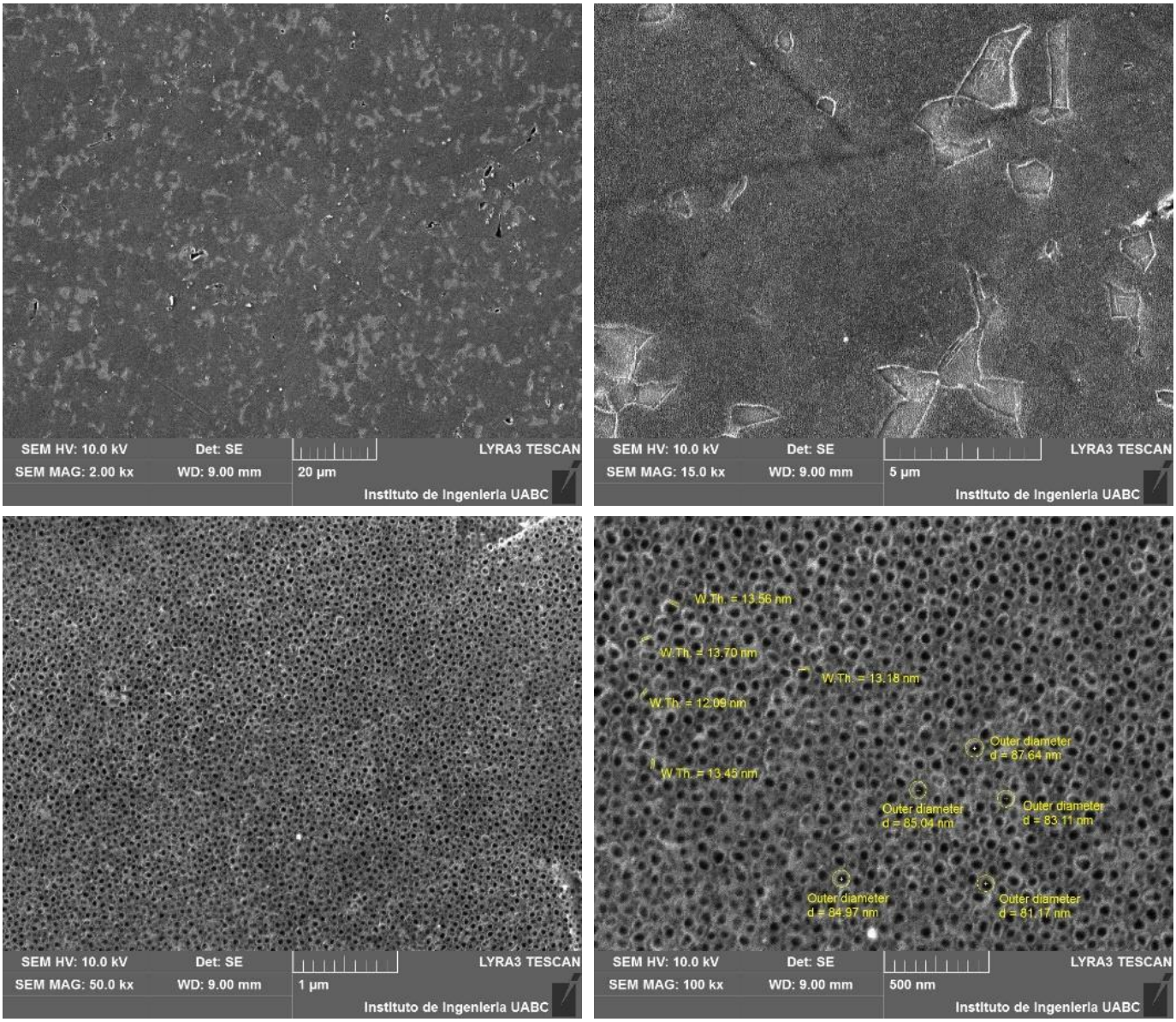


Figura 73. Muestra M36, Ti_6Al_4V, solución 10, 20/10min a 15-20V (SEM).

Tabla 70. Muestra M37: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
37	M37	10	20/10	10-15	65	385	11	1.58

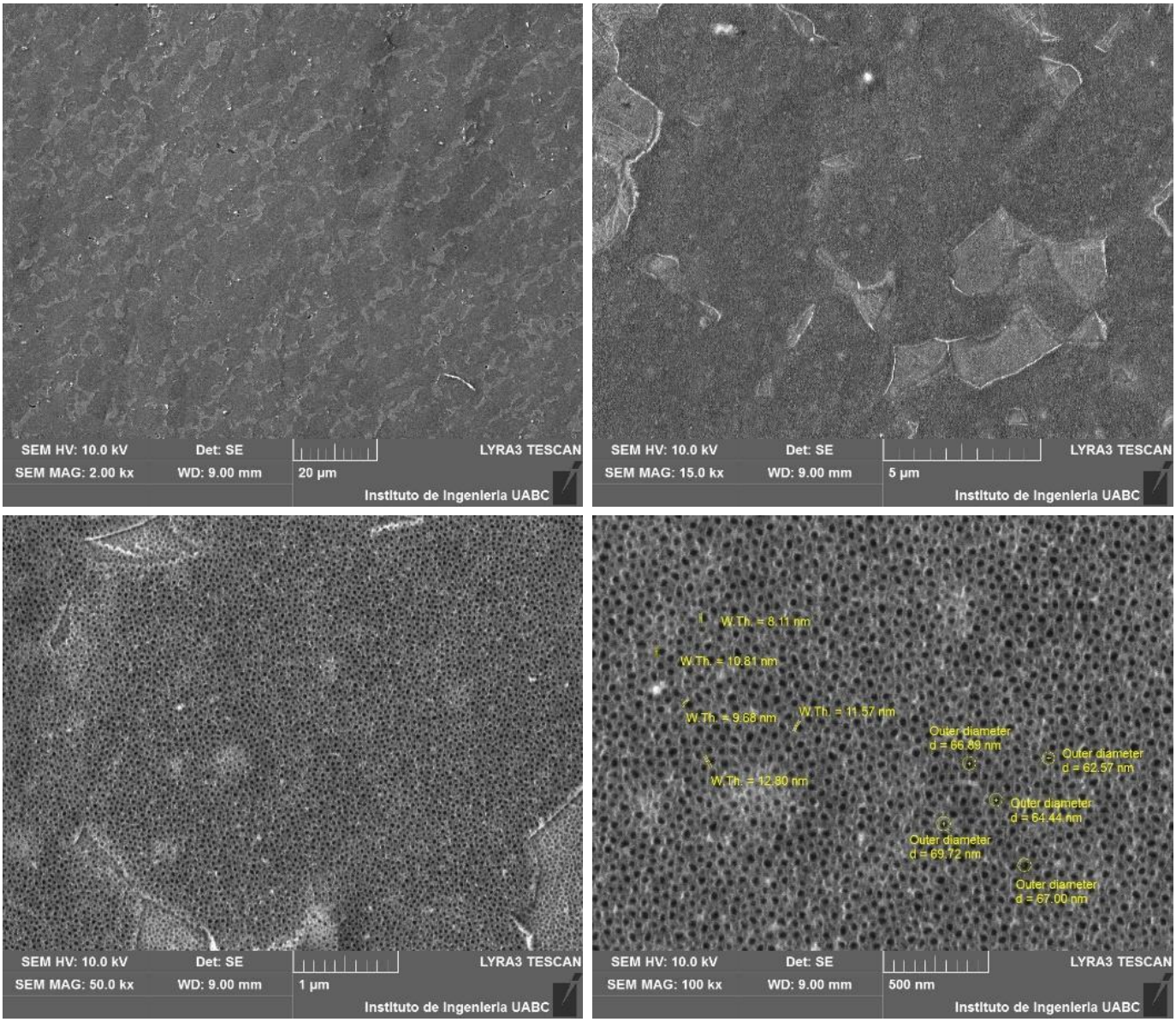


Figura 74. Muestra M37, Ti_6Al_4V, solución 10, 20/10min a 10-15V (SEM).

Tabla 71. Muestra M38: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
38	M38	10	40	20	115	490	15	1.62

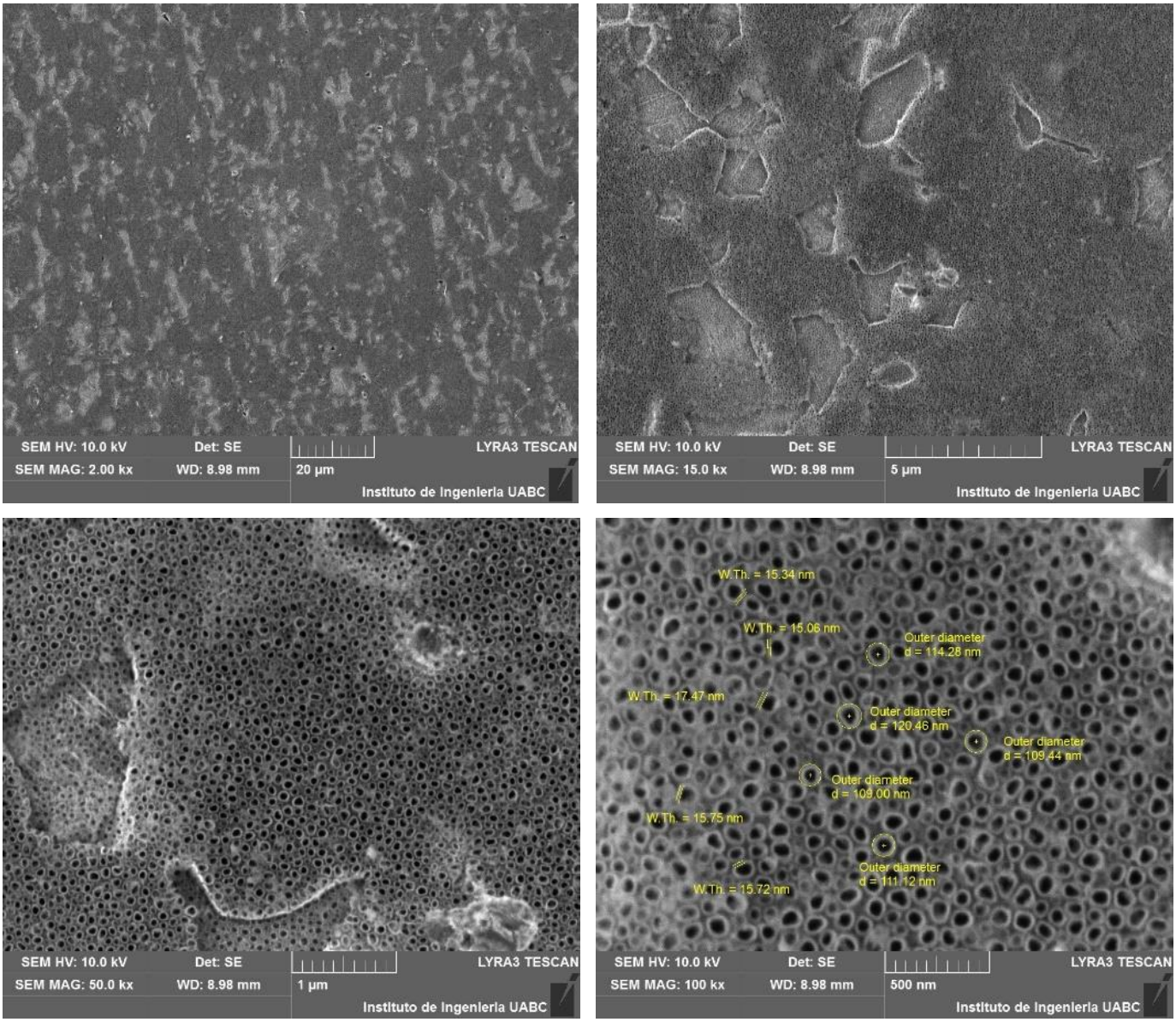


Figura 75. Muestra M38, Ti_6Al_4V, solución 10, 40min a 20V (SEM).

Tabla 72. Muestra M39: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
39	M39	10	40	15	100	470	12	1.61

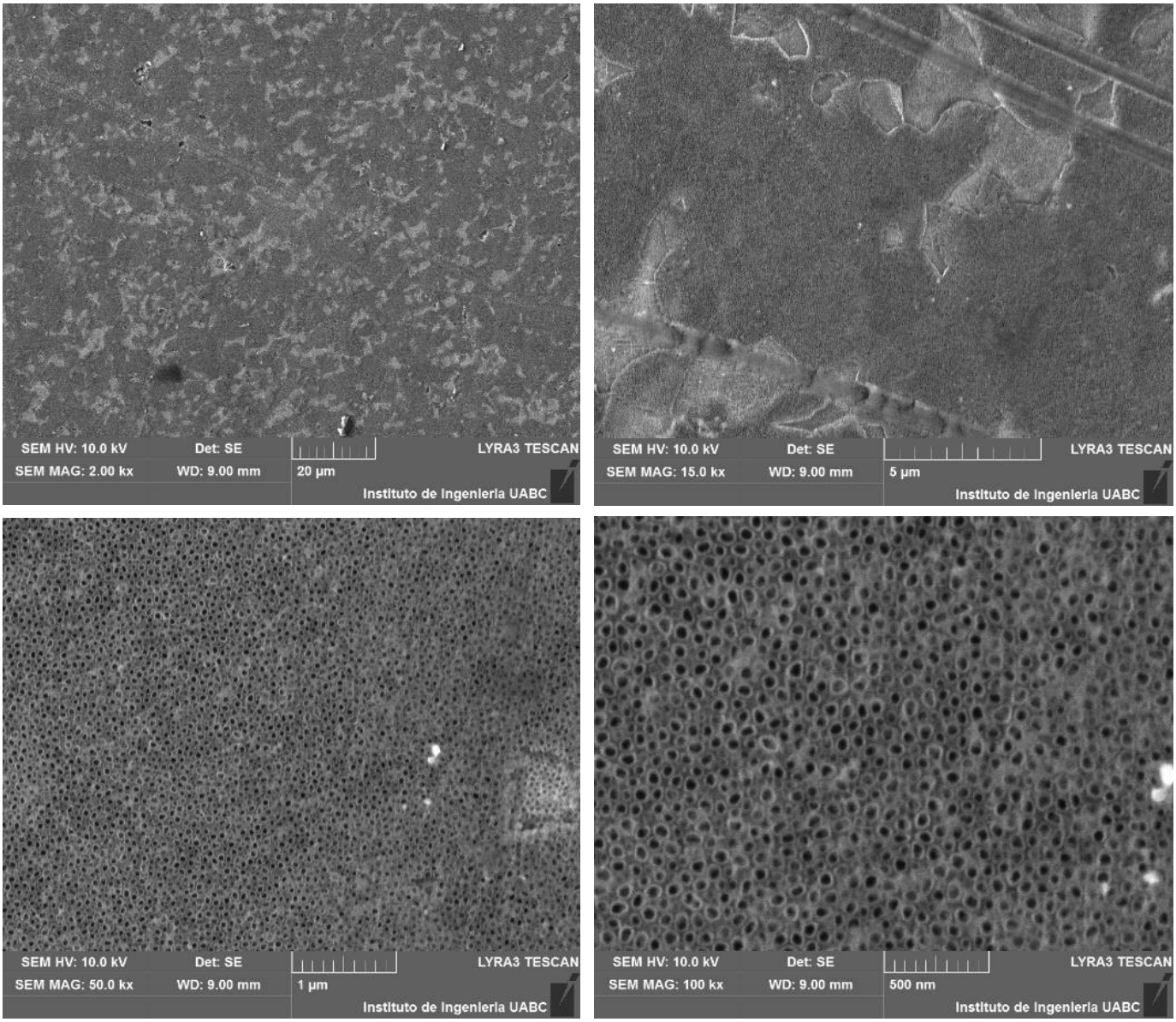


Figura 76. Muestra M39, Ti_6Al_4V, solución 10, 40min a 15V (SEM).

Tabla 73. Muestra M40: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
40	M40	10	60	20	105	540	15	1.62

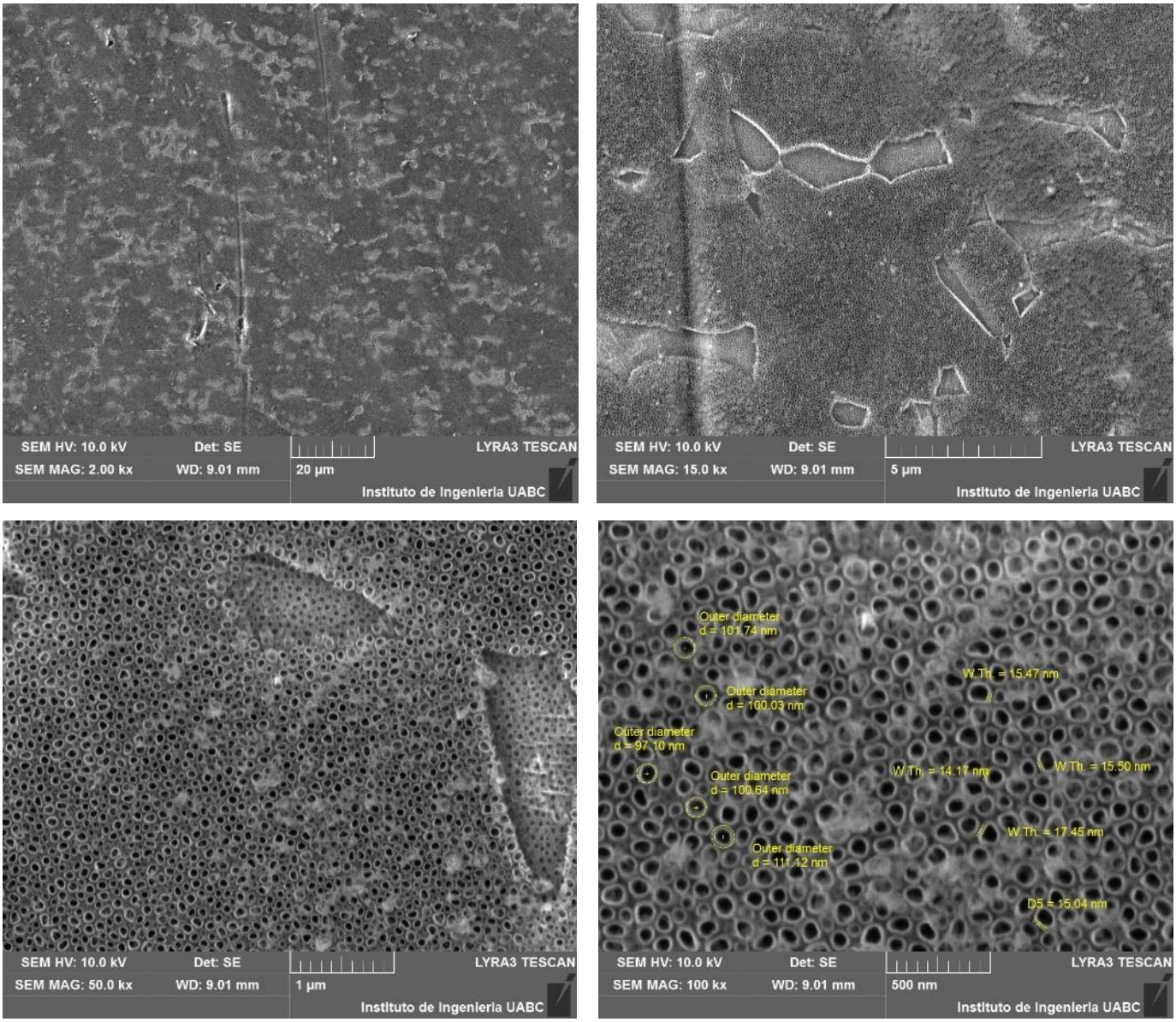


Figura 77. Muestra M40, Ti_6Al_4V, solución 10, 60min a 20V (SEM).

Tabla 74. Muestra M41: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
41	M41	10	60	15	95	510	11	1.67

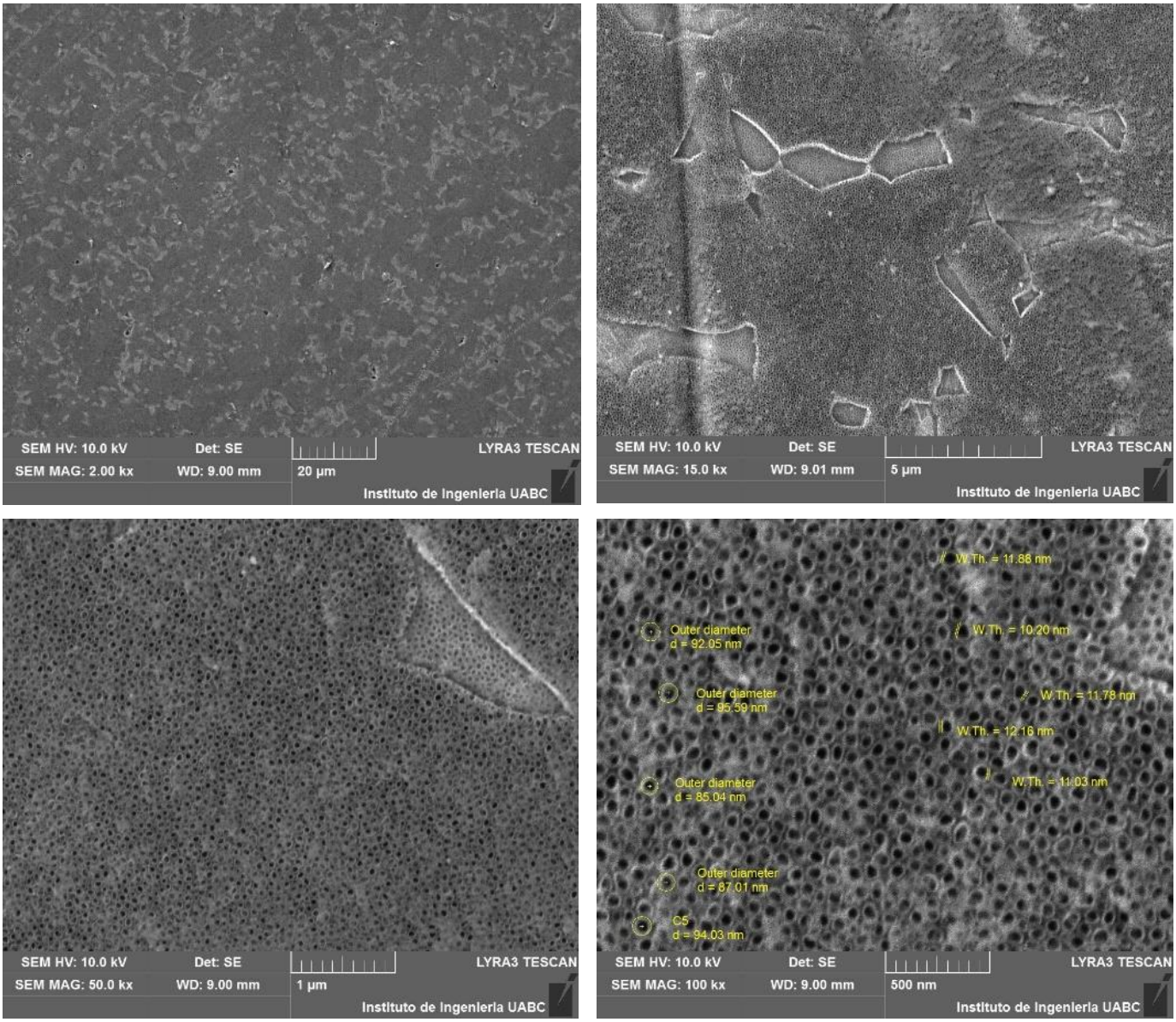


Figura 78. Muestra M41, Ti_6Al_4V, solución 10, 60min a 15V (SEM).

Tabla 75. Muestra M42: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
42	M42	10	60/10	15-20	80	520	13	1.64

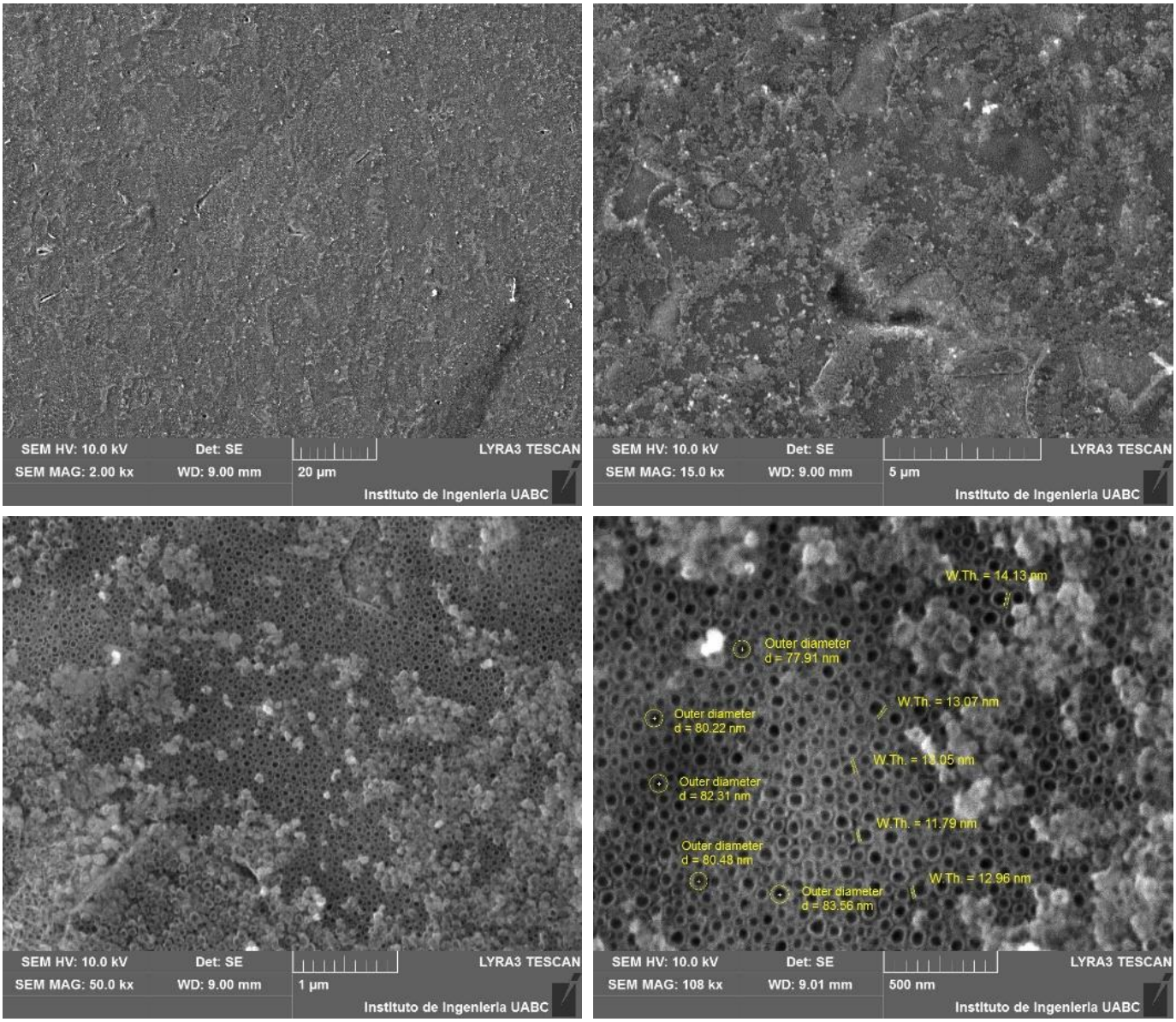


Figura 79. Muestra M42, Ti_6Al_4V, solución 10, 60/10min a 15-20V (SEM).

Tabla 76. Muestra M43: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
43	M43	10	60/10	10-15	70	470	11	1.63

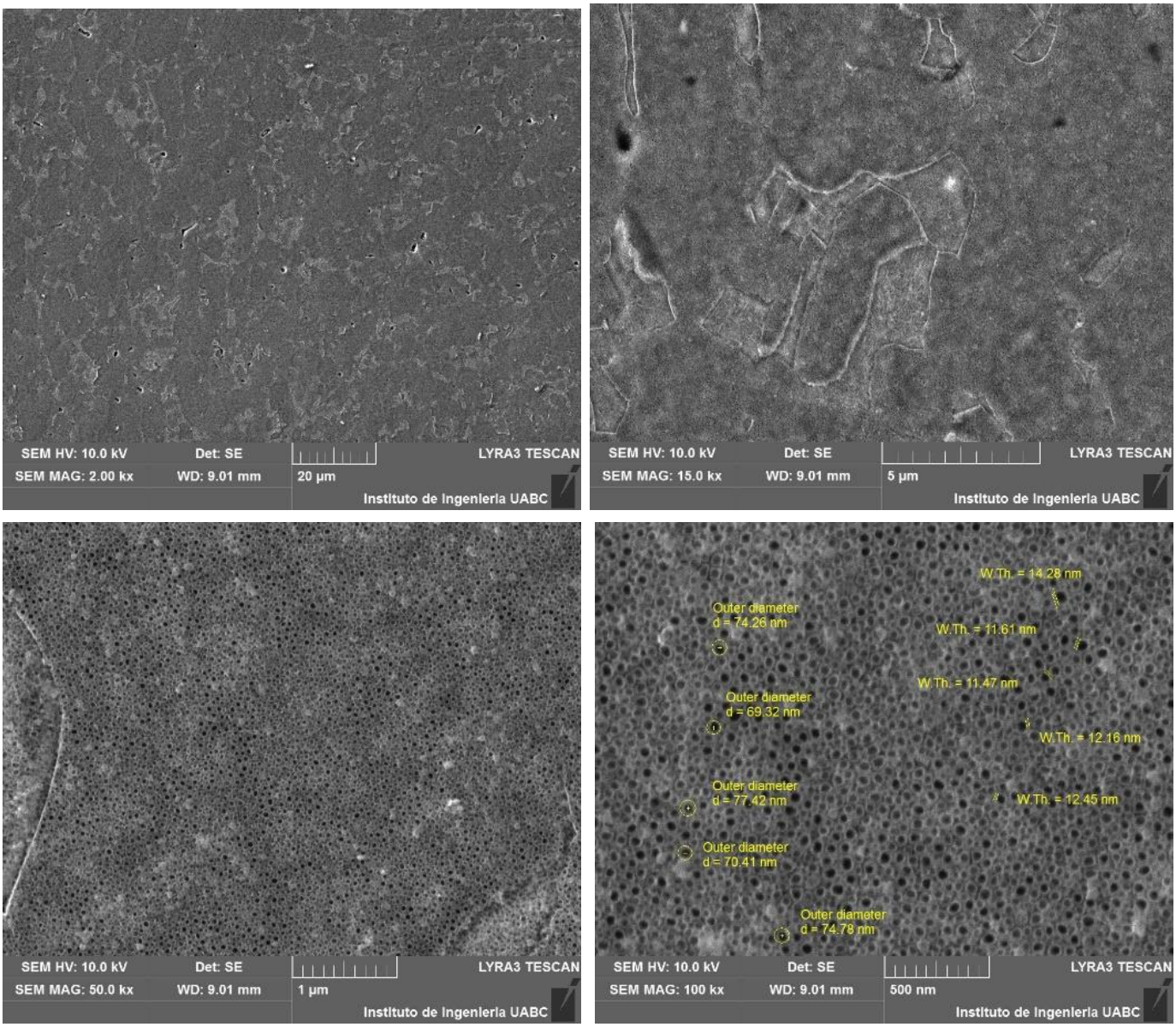


Figura 80. Muestra M43, Ti_6Al_4V, solución 10, 60/10min a 10-15V (SEM).

Tabla 77. Muestra M44: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
44	M44	10	40/10	10-15	65	400	13	1.58

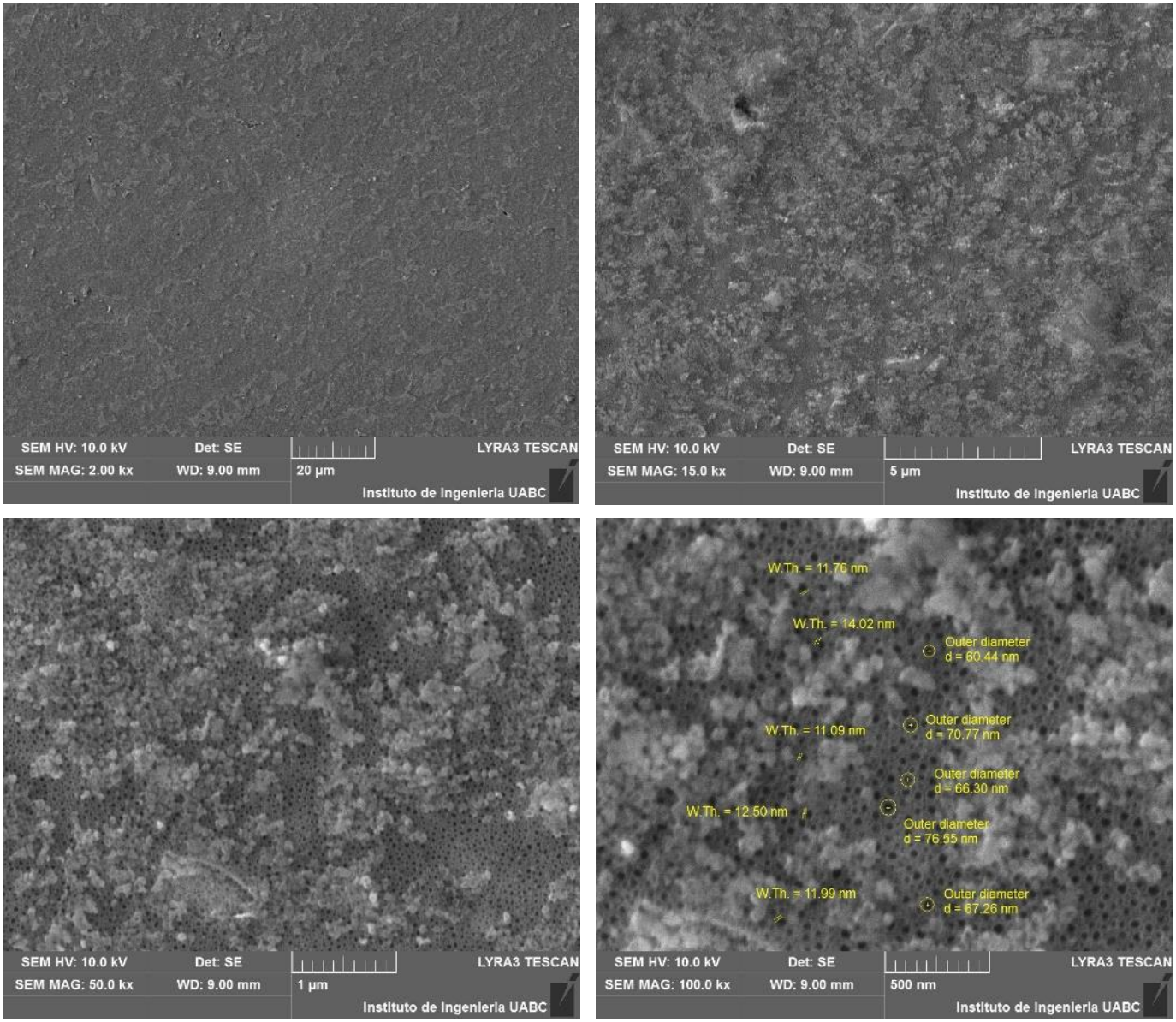


Figura 81. Muestra M44, Ti_6Al_4V, solución 10, 40/10min a 10-15V (SEM).

Tabla 78. Muestra M45: Resultados Electroquímicos con Solución ASO de Laboratorio.

Aleación: Ti_6Al_4V			B	C	Y1	Y2	Y3	Y4
Experimento	Muestra	Solución	Tiempo de Anodizado (min)	Voltaje (V)	Diámetro de los Nanotubos (nm)	Longitud del Nanotubo (nm)	Espesor de Pared (nm)	Densidad de Nanotubos ($gr.cm^3$)
45	M45	10	40/10	15-20	100	420	20	1.62

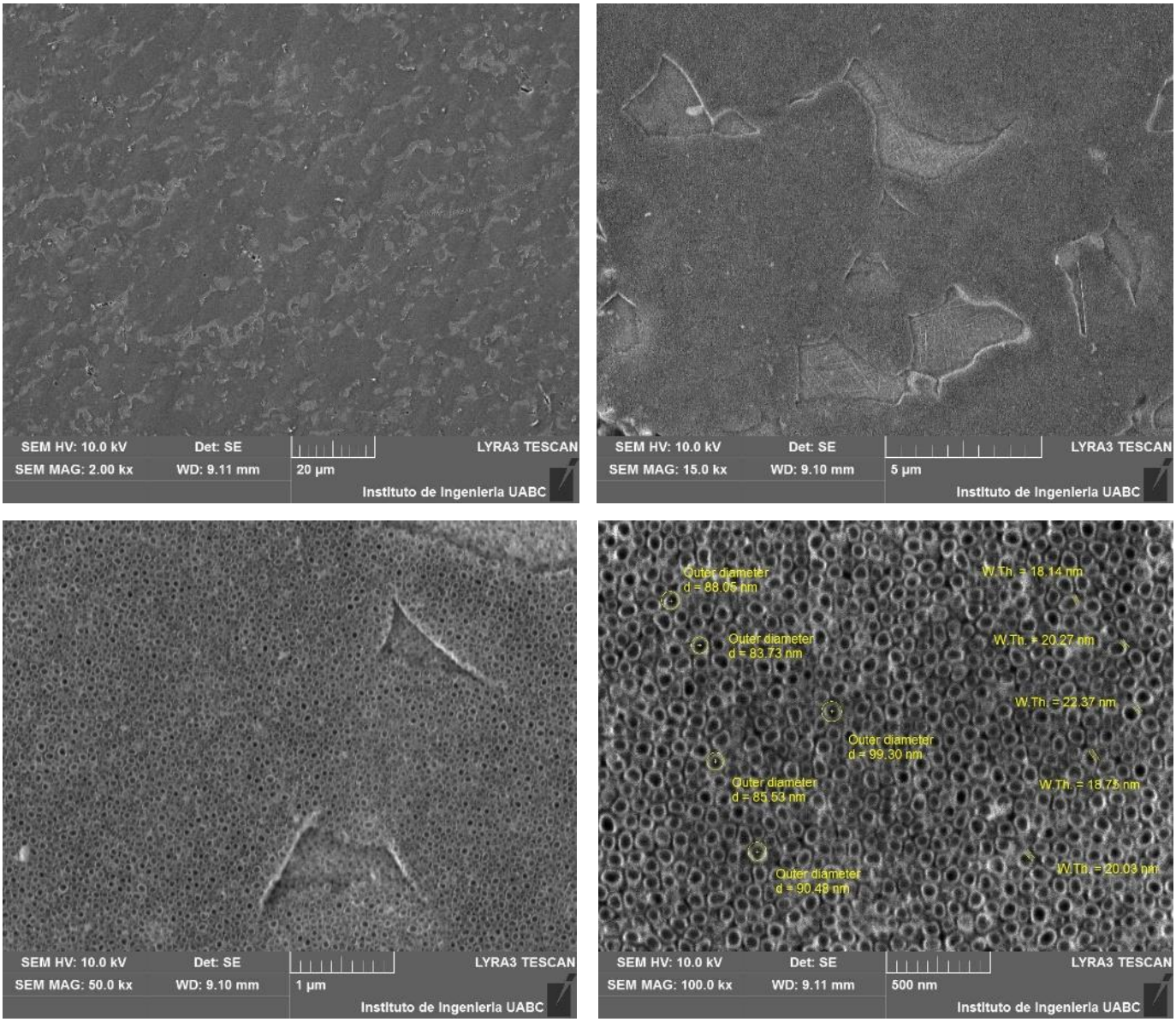
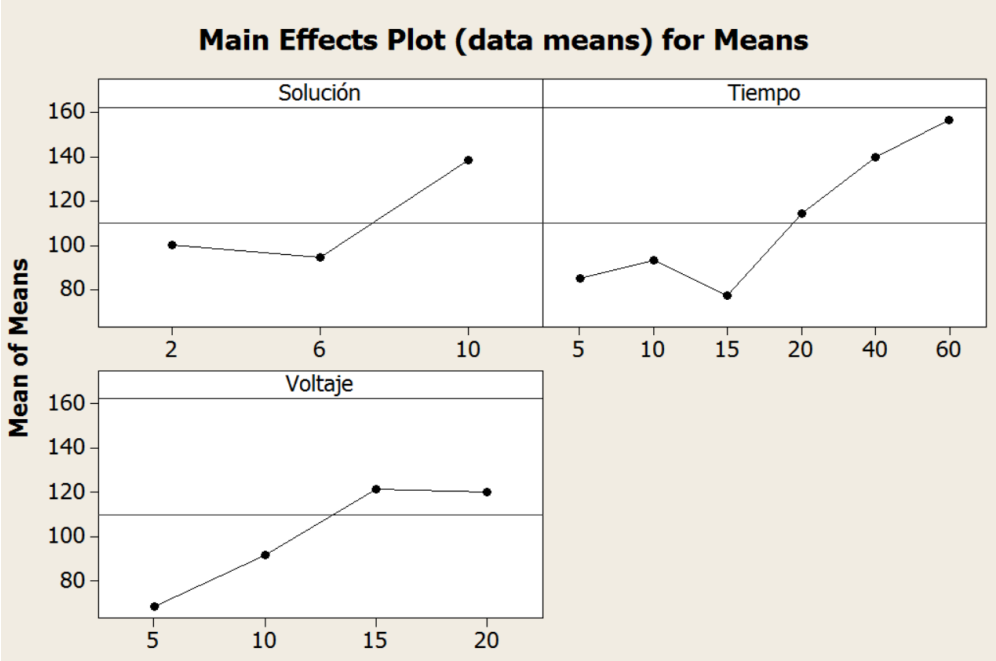


Figura 82. Muestra M45, Ti_6Al_4V, solución 10, 40/10min a 15-20V (SEM).

4.11 Análisis de Resultados Electroquímicos con ASO de Laboratorio.

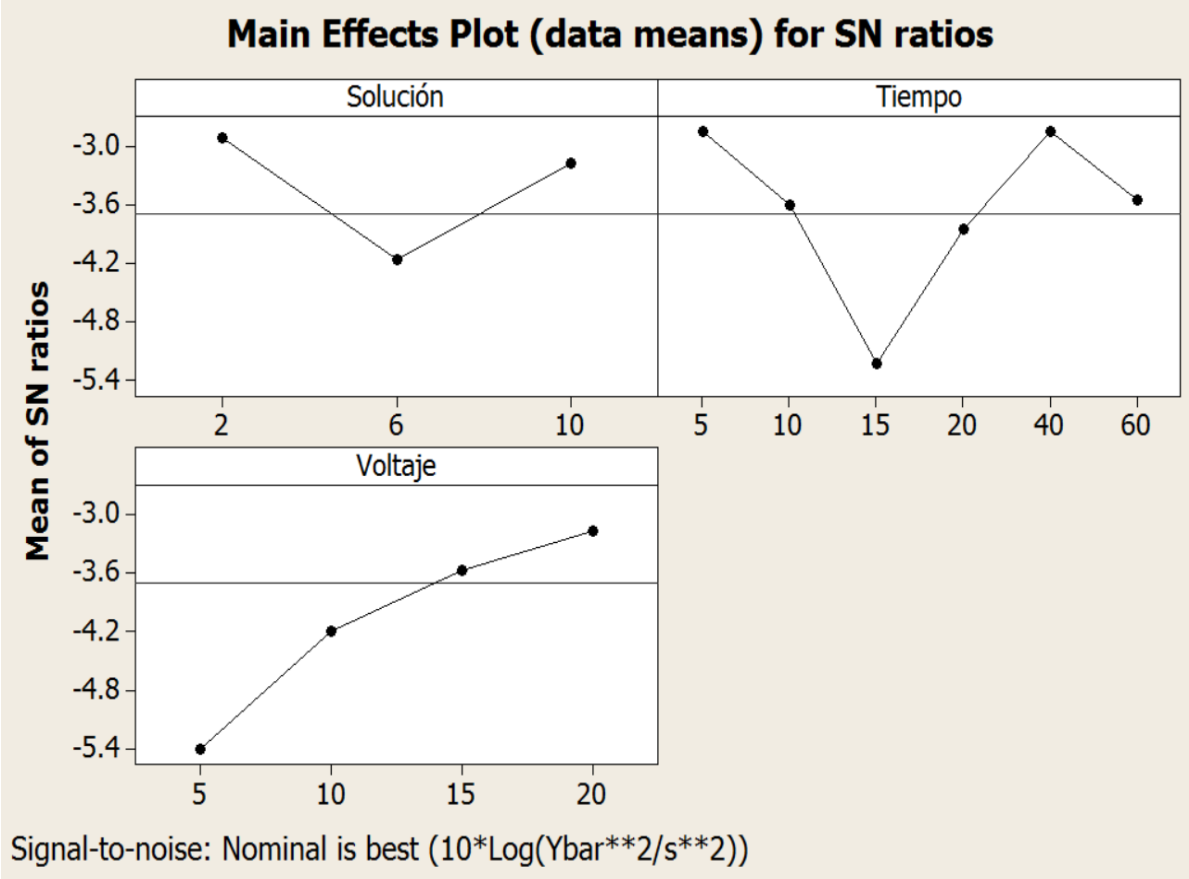
El resumen de la **Tabla 50** muestra los resultados obtenidos de los ensayos electroquímicos realizados con electrolitos base ASO de laboratorio. A continuación se muestran los análisis utilizando la herramienta MitiTAB14® para conocer las interacciones entre los efectos principales, los factores de ruido y respuesta, las interacciones de medias, así como la varianza, la media y la desviación estándar de los resultados obtenidos.

Tabla 79. Media de efectos principales experimentos con ASO de Laboratorio.



La grafica mostrada en la **Tabla 79** de efectos principales, examina las diferencias entre las medias de nivel para los factores utilizados durante los experimentos, la gráfica muestra la media de la respuesta para cada nivel de factor conectados por las líneas, que identifican los efectos principales que afectan las respuestas de nuestros experimentos. Las interacciones de las medias, solución, tiempo y voltaje nos muestran resultados favorables para todos los experimentos. Mientras más inclinada es la pendiente de la línea, mayor es la magnitud del efecto principal.

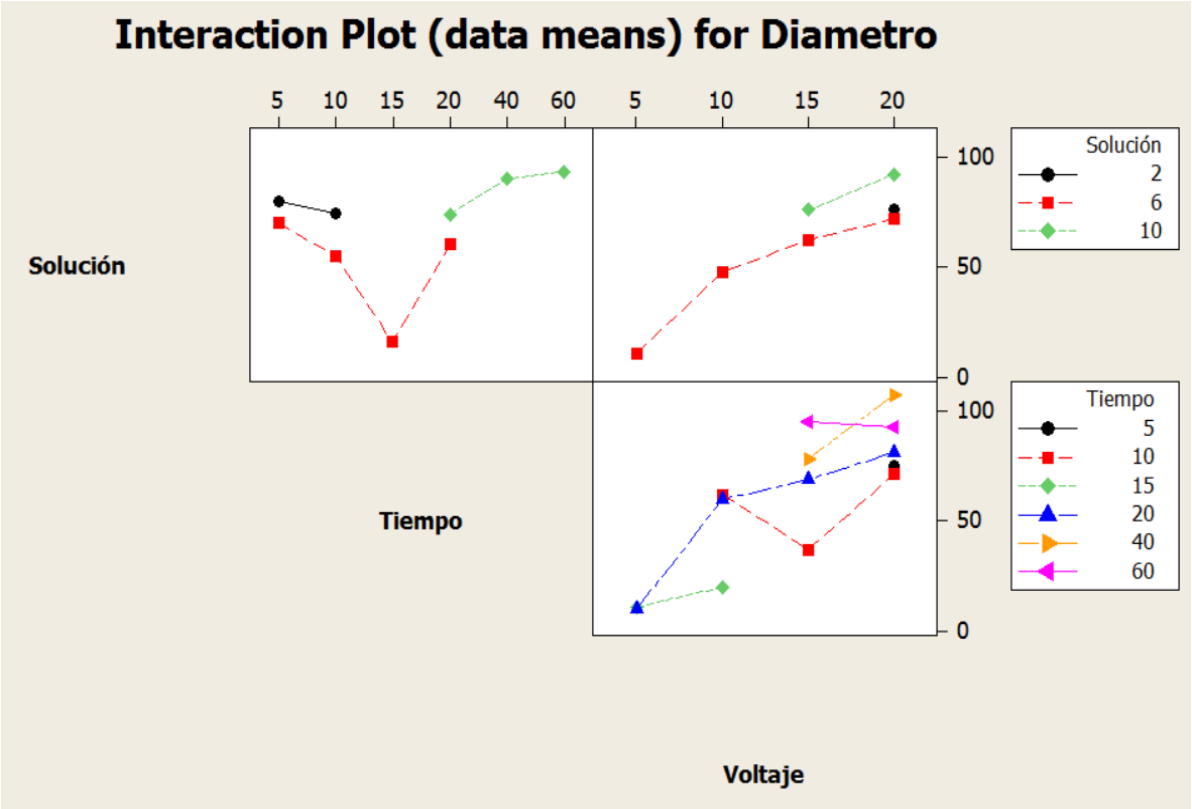
Tabla 80. Media de efectos principales señal/ruido experimentos con ASO de Laboratorio.



La grafica mostrada en la **Tabla 80** de las relaciones señal/ruido (S/N) proveen una medida de la robustez contra los factores de control, con la intensión de identificar los que minimicen el efecto de los factores de ruido y reducir la variabilidad de la respuesta, mostrando los valores que más afectan la calidad de nuestra respuesta según la media de los efectos principales. Para las distintas soluciones, los rangos de tiempo y de voltaje, los valores más altos de estas relaciones nos indican la configuración de los factores de control que minimizan los efectos de los factores de ruido.

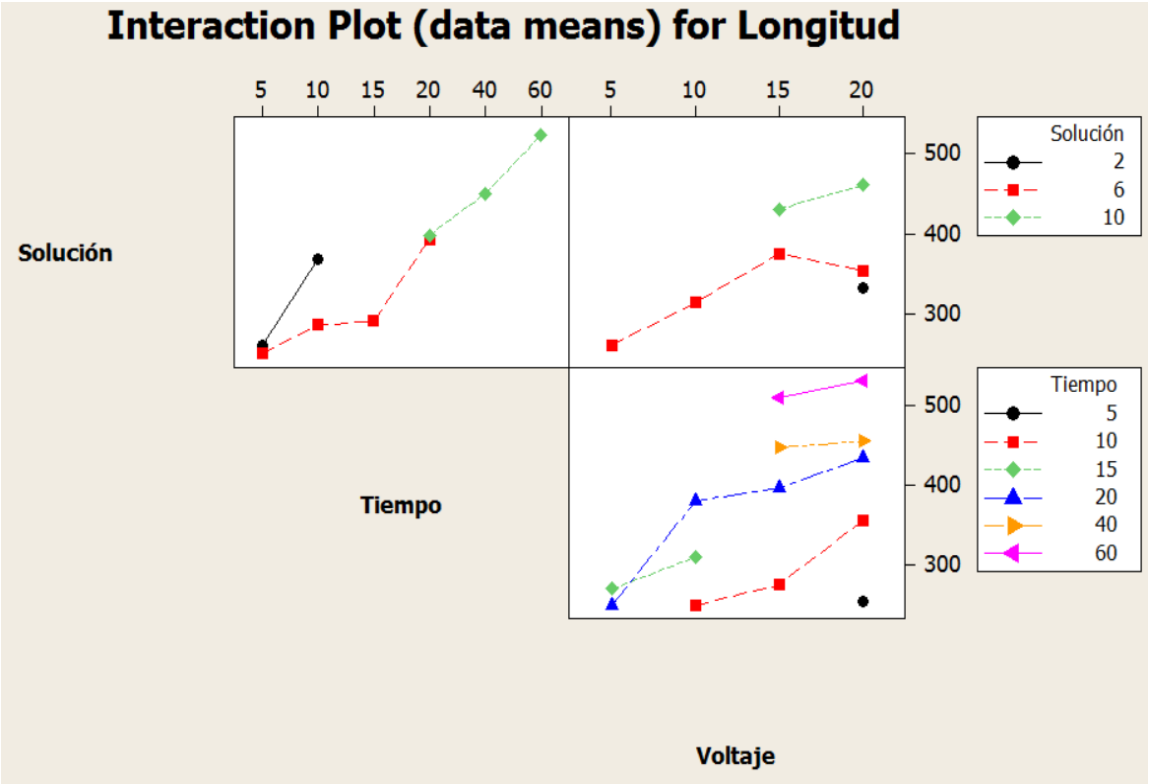
Como nuestros factores dependen del nivel de otros factores, las gráficas de interacción nos permiten visualizar las interacciones, las líneas paralelas nos indican la no interacción entre los factores. Mientras mayor sea la diferencia en la pendiente entre las líneas, mayor es el grado de interacción Hay que recordar que estas graficas no nos indican si la interacción es estadísticamente significativa.

Tabla 81. Interacciones de medias: diámetro, experimentos con ASO de laboratorio.



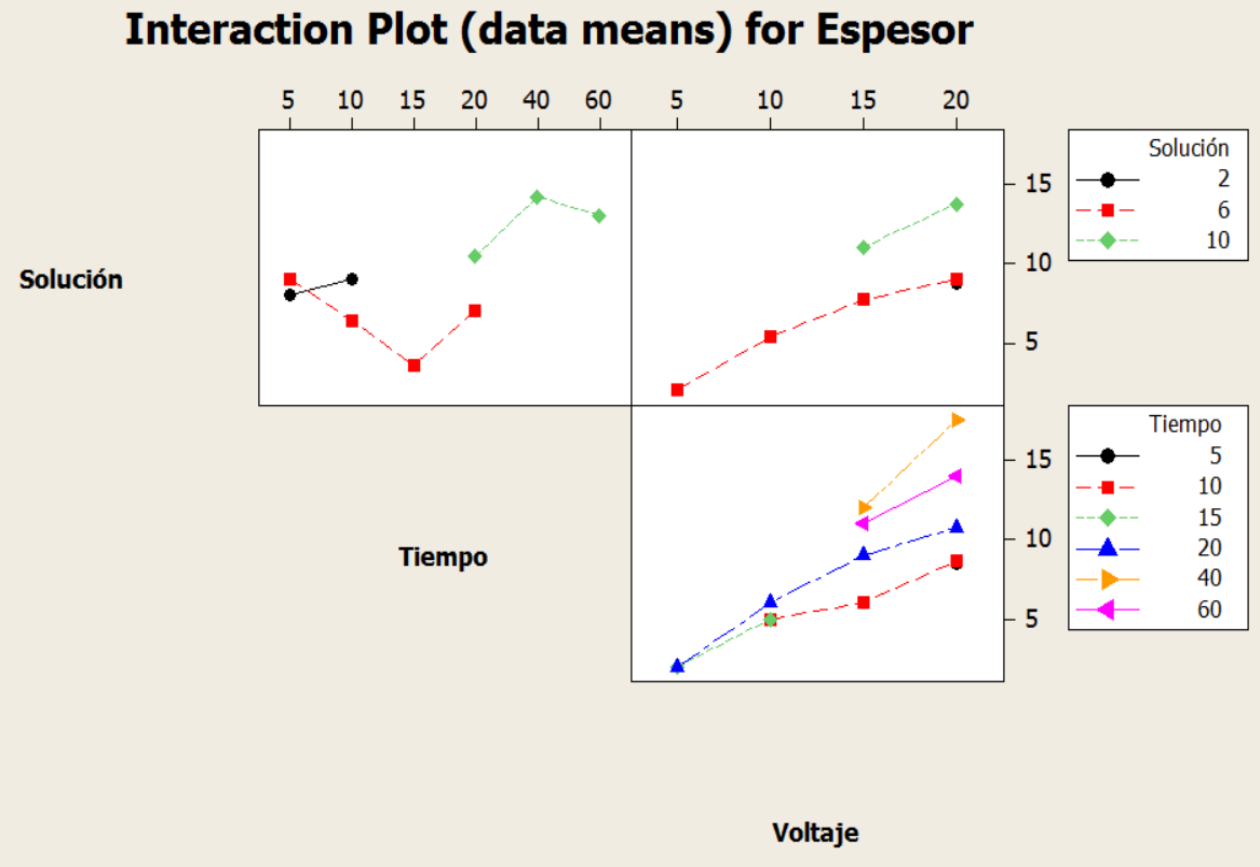
La grafica de la **Tabla 81** nos muestra las interacciones del diámetro con la solución, el tiempo y el voltaje, indicándonos que para el diámetro la solución y el tiempo son las interacciones de mayor influencia en el diámetro del NT.

Tabla 82. Interacciones medias: longitud, experimentos de ASO de laboratorio.



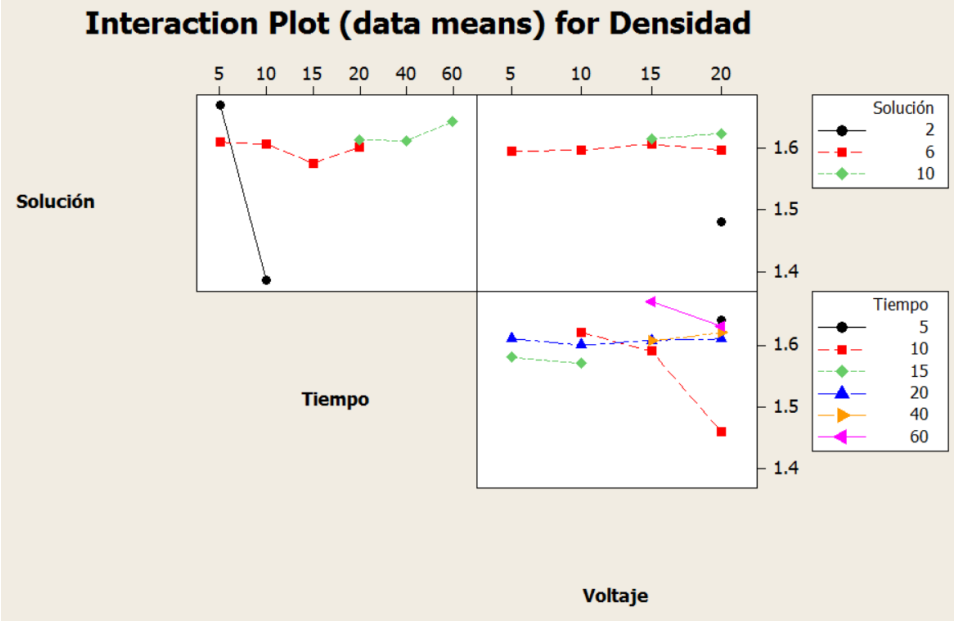
La grafica de la **Tabla 82** nos muestra las interacciones de la longitud con la solución, el tiempo y el voltaje, indicándonos que para el diámetro los tres factores, la solución, el tiempo y el voltaje influencian la longitud del nanotubo sin embargo el tiempo y el voltaje son las interacciones que tienen una mayor influencia para la longitud del NT.

Tabla 83. Interacciones de medias: espesor de pared, experimentos con ASO de laboratorio.



La grafica de la **Tabla 83** nos muestra las interacciones del espesor con la solución, el tiempo y el voltaje, indicándonos que la solución con el tiempo son las interacciones que más influencian tiene sobre el espesor del NT.

Tabla 84. Interacciones de medias: densidad, experimentos con ASO de laboratorio.



La grafica de la **Tabla 84** nos muestra las interacciones que más afectan a la densidad de los NTs con la solución, el tiempo y el voltaje, indicándonos que la solución con el voltaje son las interacciones de mayor influencia.

El análisis de medias fue realizado para probar la igualdad de las medias de los resultados. Las siguientes graficas muestran cada una de las medias de los niveles de factor, la media general y los límites de decisión. Los puntos que se encuentran fuera de los límites de decisión, muestran la evidencia de que la medie de los niveles para cada factor que está representada por ese punto es significativamente diferente de la media general.

Tabla 85. Análisis de Medias: Diámetro, experimentos con ASO de laboratorio.

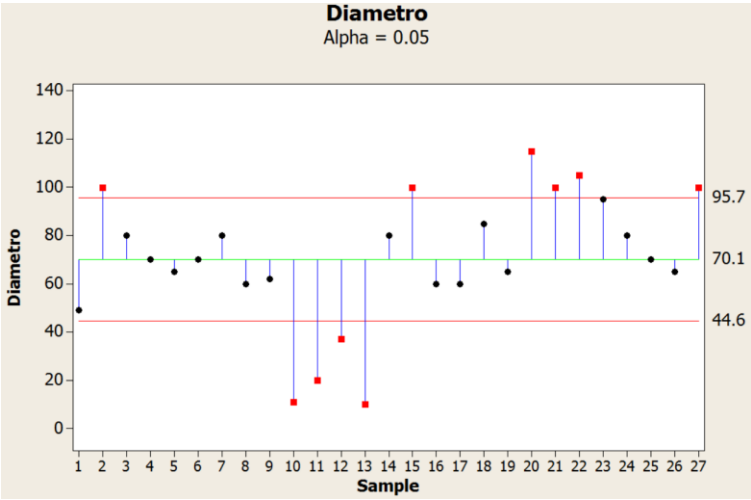


Tabla 86. Análisis de Medias: Longitud, experimentos con ASO de laboratorio.

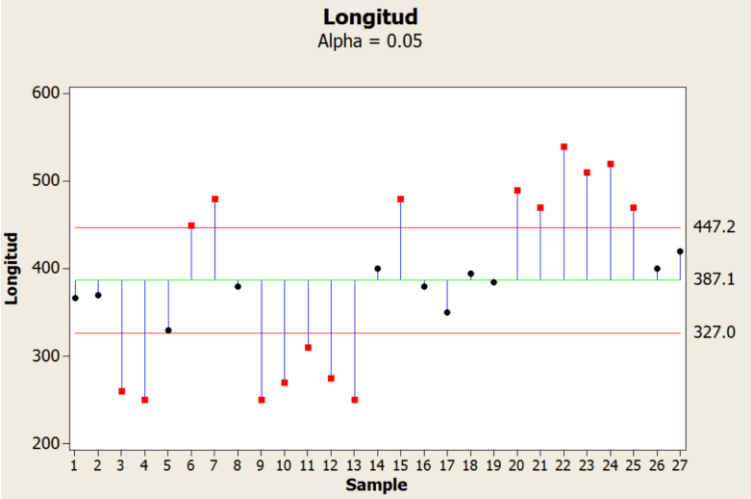
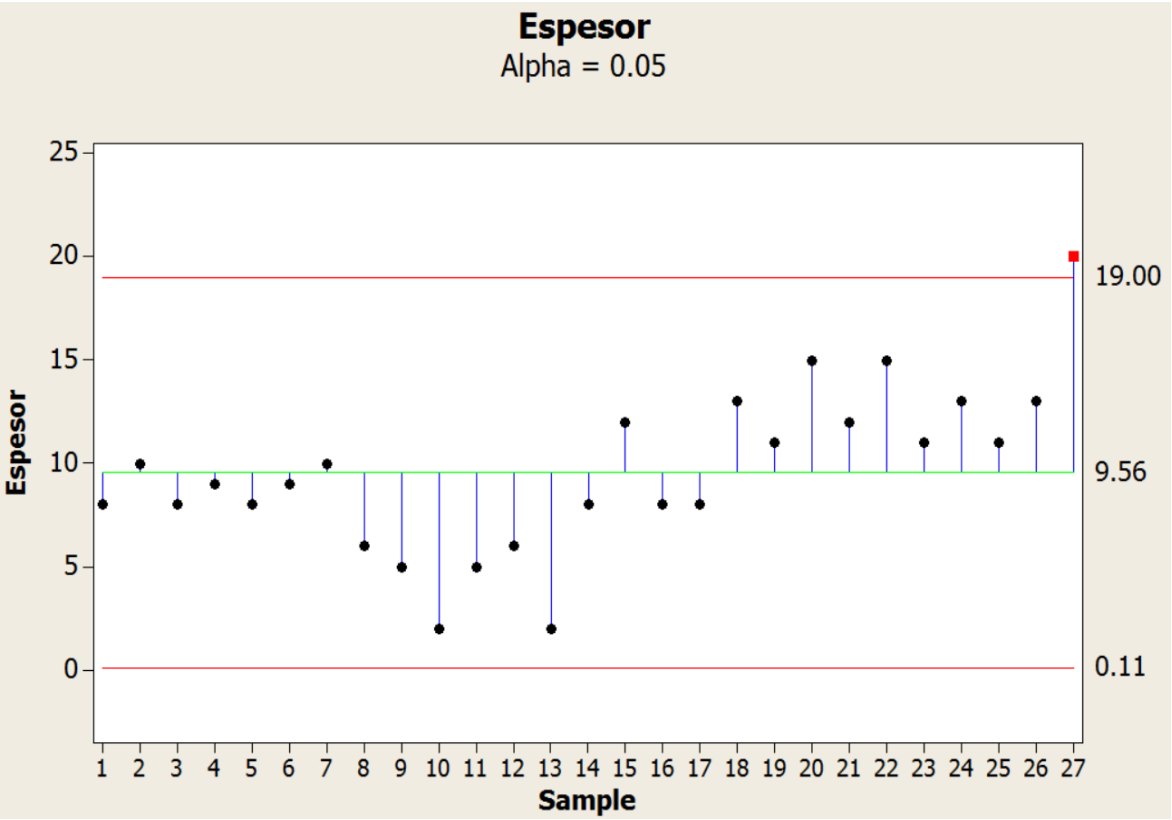


Tabla 87. Análisis de Medias: Espesor, experimentos con ASO de laboratorio.



La grafica mostrada en la **Tabla 85**, **Tabla 86** y **Tabla 87**, nos muestran los efectos de interacción para el diámetro, la longitud y el espesor, respectivamente, encontrando los efectos claramente fuera de los límites de decisión para el diámetro y la longitud, lo que significa una evidencia clara de la interacción entre el diámetro y la longitud de las muestras, en cambio para el espesor los resultados indican muy poca relevancia entre las interacciones.

El análisis de varianza se utiliza para determinar si las medias son diferentes, comparando la varianza entre las medias de los grupos y la varianza dentro de los grupos para determinar con que grupos se obtienen mejores resultados.

Tabla 88.Varianza: Diámetro, experimentos con ASO de laboratorio.

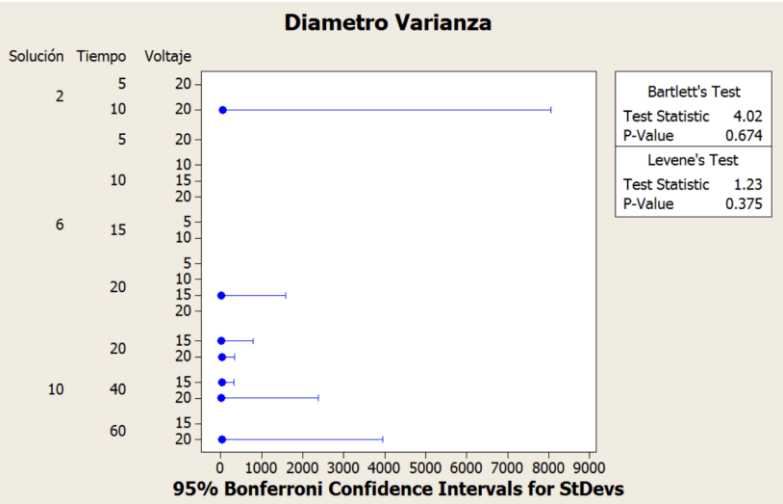


Tabla 89. Varianza: Longitud, experimentos con ASO de laboratorio.

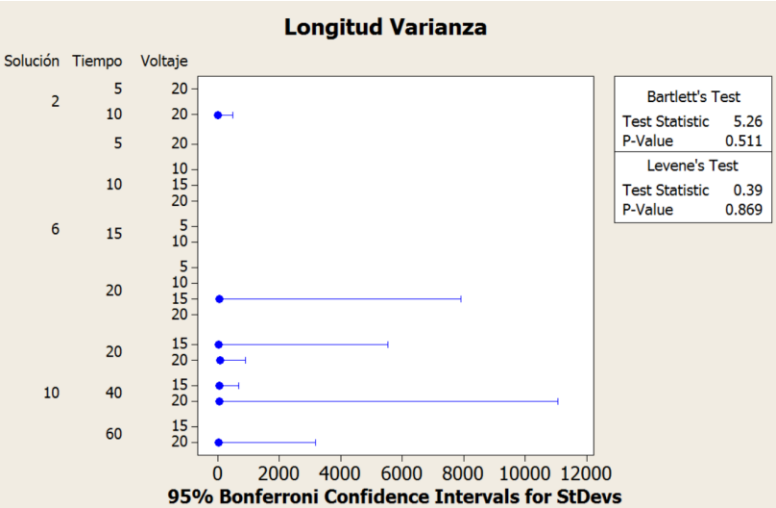


Tabla 90. Varianza: Espesor, experimentos con ASO de laboratorio.

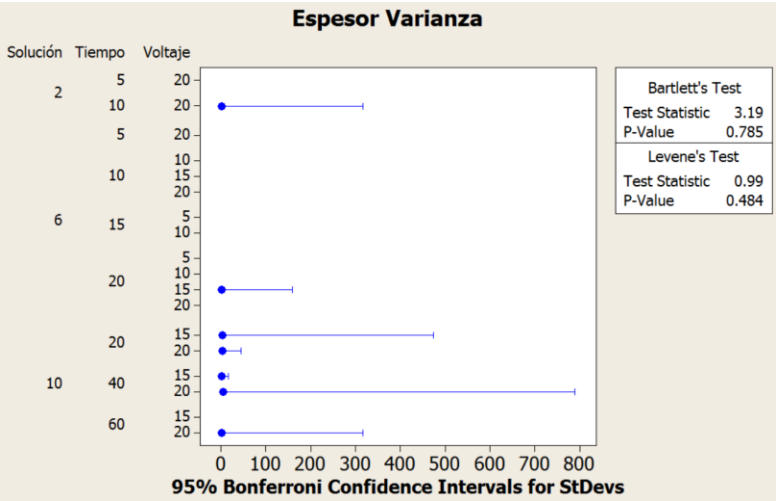
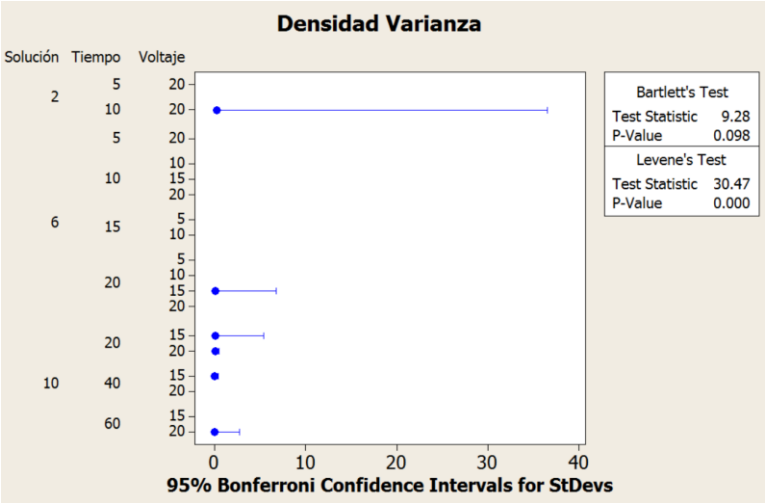


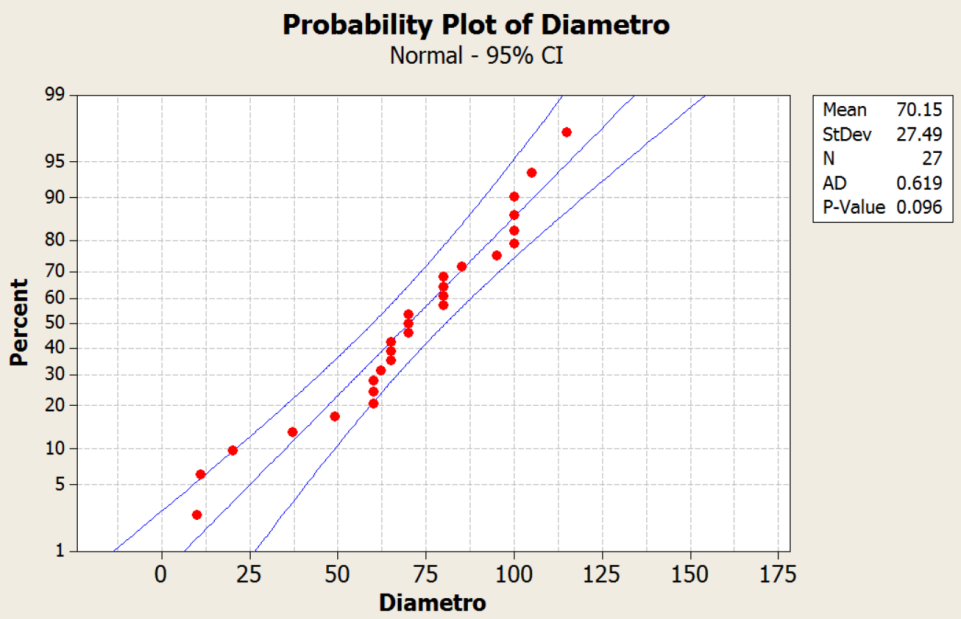
Tabla 91. Varianza: Densidad, experimentos con ASO de laboratorio.



Utilizando el método de comparaciones múltiples, la gráfica mostrada en la **Error! Reference source not found.**, **Tabla 89**, **Tabla 90** y **Tabla 91** nos indican respectivamente los grupos con mayores influencias sobre los resultados que afectan al diámetro, la longitud, el espesor de pared y la densidad del NT para cada uno de los experimentos realizados.

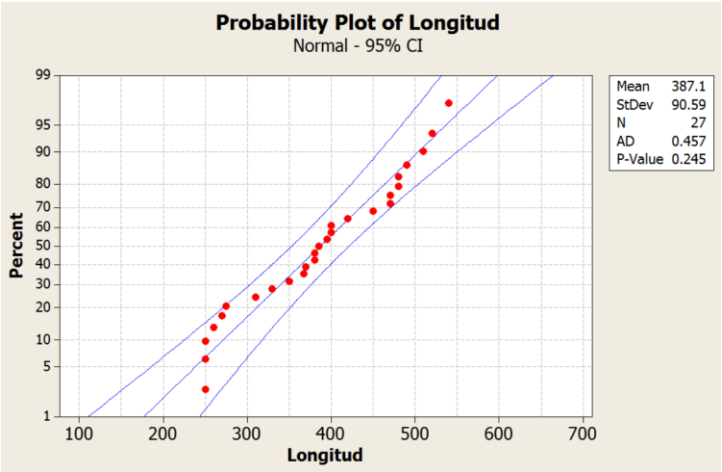
Las gráficas de probabilidad nos muestran la evaluación del ajuste de la distribución de los datos, estimando los porcentajes y comparando las diferentes distribuciones de las muestras, graficando los valores de cada una de las observaciones en comparación con su probabilidad acumulada estimada, trasformado las escalas de manera que la distribución ajustada forma una línea recta ajustada, mostrando los intervalos de confianza de aproximadamente 95% para los porcentajes, en forma de puntos de la distribución ajustada. Las siguientes graficas mostradas en la **Tabla 92**, **Tabla 93**, **Tabla 94**, y **Tabla 95**, presentan las estimaciones de los parámetros de distribución junto con el estadístico de Anderson-Darling, y el valor de *p*, para la evaluación del ajuste de distribución de los datos.

Tabla 92. Probabilidad: Diámetro, experimentos con ASO de laboratorio.



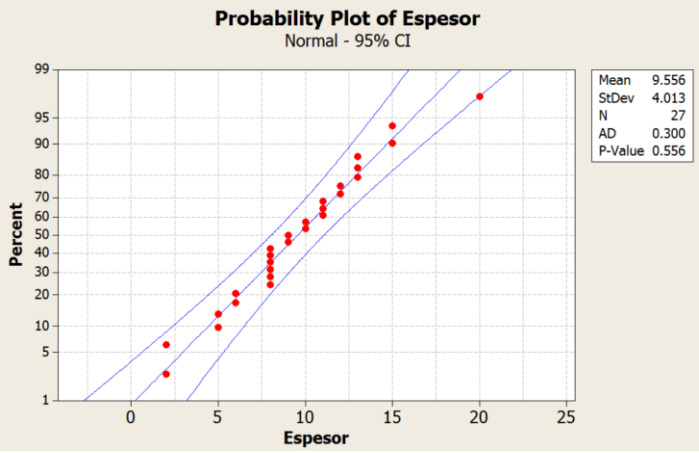
Media de los valores obtenidos para el diámetro 70.15, desviación estándar 27.49 para un valor de *p* mayor a 0.05, a un valor de AD bajo, ajustándose bien los datos a la muestra.

Tabla 93. Probabilidad: Longitud, experimentos con ASO de laboratorio.



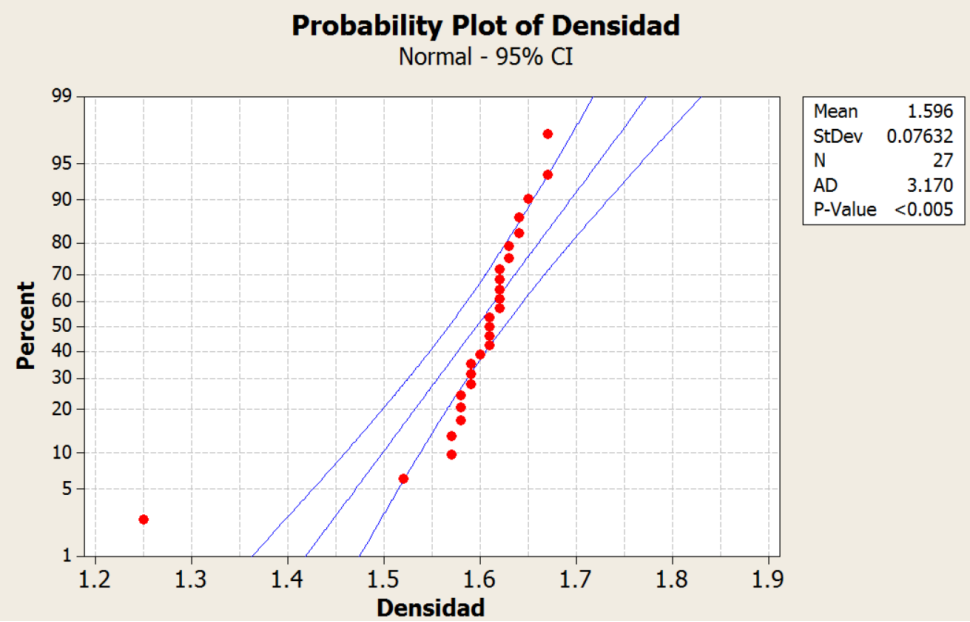
La media de los valores obtenidos para la longitud es de 387.1, la desviación estándar 90.59 para un valor de *p* mayor a 0.05, a un valor de AD bajo, ajustándose bien los datos a la muestra.

Tabla 94. Probabilidad: Diámetro, experimentos con ASO de laboratorio.



La media de los valores obtenidos para el espesor de pared es de 9.56, la desviación estándar 4.01 para un valor de *p* mayor a 0.05, a un valor de AD bajo, ajustándose bien los datos a la muestra.

Tabla 95. Probabilidad: Densidad, experimentos con ASO de laboratorio.



La media de los valores obtenidos para la densidad es de 1.596, la desviación estándar 0.076 para un valor de *p* menor al 0.05, a un valor de AD bajo, ajustándose muy bien los datos a la muestra.

Los puntos de los datos para las gráficas mostradas en la **Tabla 92**, **Tabla 93**, **Tabla 94**, y **Tabla 95**, nos indican que los datos siguen aproximadamente una línea recta, ajustándose lo mejor posible a los datos de la muestra, pudiendo interpretar los porcentajes basados en la línea recta mostrada para cada uno de los factores de respuesta diámetro, longitud, espesor y densidad. Entre más pequeño es el valor de *p* mejor es la confiabilidad para la estimación de porcentajes en base a la recta. La desviación estándar nos muestra la medida del valor de la dispersión de los datos con respecto a la media, mientras mayor sea la desviación estándar mayor será la dispersión de los datos ayudándonos a estimar el valor para la estimación de la variación general del proceso.

Capítulo 5. Conclusiones y Trabajos Futuros.

"No nos preguntamos qué propósito útil hay en el canto de los pájaros, cantar es su deseo desde que fueron creados para cantar. Del mismo modo no debemos preguntarnos por qué la mente humana se preocupa por penetrar los secretos de los cielos… La diversidad de los fenómenos de la Naturaleza es tan grande y los tesoros que en cierran los cielos tan ricos, precisamente para que la mente del hombre nunca se encuentre carente de su alimento básico."

Johannes Kepler, *Mysterium Cosmographicum.*

El análisis estadístico y la **Tabla 50** resumen los resultados de los ensayos electroquímicos utilizando ASO, otorgando una guía general de reproducibilidad de estos experimentos para la posterior evaluación de sus características por otras líneas de investigación respecto a los efectos que pueden tener según su aplicación. De esta manera se demuestra la viabilidad de utilizar electrolitos acuosos base ASO de laboratorio mediante métodos de anodización para la obtención de capas de NT de TiO_2.

Comparando las dimensiones de los NT a diferentes tiempos, se concluye que la variación en el tiempo provoca cambios en el tamaño de diámetro y espesor de pared.

En el caso de la longitud, se concluye que el tiempo de anodización incrementa significativamente la longitud del tubo. Como demuestran los análisis por AFM, la rugosidad promedio aumenta mientras el tiempo de anodizado se incrementa, logrando con el tiempo una superficie uniforme.

Los resultados sugieren que para un crecimiento organizado de NT, los mejores resultados se logran obtener a potenciales de entre 15 y 20V, sin embargo estos dependen del tamaño de morfología que se busca. Estos resultados nos confirman los resultados obtenidos por otros investigadores del tema.

Los resultados indican que la formación de capas de NTs organizados y uniformes de diferentes diámetros se logra gracias al balance de la variación del potencial, el paso del voltaje y el paso de corriente, ligado todo esto a la formulación electrolítica.

Los resultados de estos experimentos y análisis nos sugieren que el electrolito base ASO en sus diferentes formulaciones aquí propuestas permite el crecimiento de una variedad muy alta de diámetros y longitudes de nanotubos. Los resultados, concluyen que la formación de nanotubos es muy sensible al voltaje y la corriente para las formulaciones electrolíticas aquí propuestas, pudiendo sintetizar NTs de TiO_2 en rangos pequeños de potencial.

Los resultados por AFM, confirma que la topografía del TiO_2 varía con los cambios de voltaje debido al efecto de la razón de cambio en el incremento del espesor de la capa de óxido afectando directamente la razón del ataque químico.

Los incrementos en las magnitudes del voltaje aplicado causa incrementos en el diámetro de los poros y el espesor de las paredes

Durante el proceso de anodizado es muy común observar que ciertas capas de óxido se siguen formando y se mantienen como remanentes sobre la superficie de la capa superior del sustrato cubriendo los NT después del anodizado, y los esfuerzos por removerla utilizando baños de agua desionizada y procesos de sonicado ayudan a retirar algunos de estos remanentes, sin embargo es de especial cuidado el tiempo que dura en este proceso debido al riesgo potencial que existe en promover corrosión por cavitación.

También se concluye que el utilizar rampas de voltaje alternadas no influye de manera significativa sobre las morfologías, obteniendo resultados muy similares a los realizados a voltaje constante, sin embargo se ha documentado por otros investigadores que pueden lograrse incrementos de la rugosidad de las paredes del NT.

Las condiciones óptimas electrolíticas consisten en obtener una formulación que nos permita lograr la máxima corriente al menor voltaje, evitando el rompimiento dieléctrico de la capa de óxido, esto está ligado directamente al tipo de morfología y tamaño

Para trabajos futuros se sugiere continuar con la variación en incrementos de contenidos de etilenglicol disuelto en la solución ya que estos aumentan la humectabilidad y los experimentos demostraron que este aumento ayuda a la formación de las capas de óxido. El aumento de la corriente demostró causar efectos en el espesor de pared de los NTs, se sugiere realizar experimentos entre los valores de 1 a 2 amperes con la intensión de conocer los efectos que puede llegar a tener estas magnitudes de amperaje en los espesores de pared, manejando tiempos cortos en intervalos de 1 a 10min, a valores de voltajes entre los rangos de 1 y 10 V, en soluciones con contenidos mayores de etilenglicol.

REFERENICIAS

[1] F. Keller, M. S. Hunter y D. L. Robinson, «Electrochem. Soc.,» nº 100, p. 411, 1953.

[2] H. Masuda y K. Fukuda, «Science,» nº 266, p. 1961, 1994.

[3] S. Iijima, «Nature,» pp. 354, 56, 1991.

[4] G. D., C. A. Grimes, O. K. Varghese, W. Hu, R. S. Singh, Z. Chen y E. C. Dickey, «Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation,» *J. Mater Res,* pp. 16:333-3334, 2001.

[5] P. H. E., K. Shankar, M. Paulose y C. A. Grimes, «A new bechmark for TiO2 nanotube array growth by anodization.,» *J Phys Chem C,* nº 111, pp. 7235-7241, 2007.

[6] P. M., K. Shankar, S. Yoriya, H. E. Prakasam, O. K. Varghese, G. K. Mor, T. A. Latempa, A. Fitzgerald y C. A. Grimmes, «Anodic growth of highly ordered TiO2 nanotube arrays to 134 micro meter in length.,» *J Phys Chem B,* pp. 110:16179-16184.

[7] A. N. K y C. A. Grimes, «Formation of vertically oriented TiO2 nanotube arrays using a luoride free HCl aqueous electrolyte.,» *J Phys Chem C,* nº 111, pp. 13028-13032, 2007.

[8] A. N. K, K. Shankar y C. A. Grimes, «Photoelectrochemical and water photoelectrolysis properties of ordered TiO2 nanotubes fabricated y Ti anodization in fluoride-free HCl electrolytes.,» *J Mat Chem,* nº 18, pp. 2341-2348, 2008.

[9] K. Anselme, «Osteoblast adhesion on biomaterials,» *Biomaterial,* pp. 21, 667-681, 2000.

[10] Y. Q. Hao, S. J. Li, Y. L. Hao, Y. K. Zhao y H. J. Ai, «Effect of nanotube diameters on bioactivity of a multifunctional titanium alloy,» *Appl. Surf. Sci.,* pp. 267, 44-51, 2013.

[11] Z. X. Chen, Y. Takao, W. X. Wang, T. Matsubara y L. M. Ren, «Surface characteristics and in vitro biocompatibility of titanium anodized in a phosphoric acid solution at different voltages,» *Biomed. Mater,* pp. a, doi:10.1088/1784-6041/4/6/065003, 2009.

[12] C. Giordano, E. Saino, L. Rimondini, M. P. Pedeferri, L. Visai, A. Cigada y R. Chesa, «Electrochemical induced anatase inhibits baterial colonization of Titanium Grade 2 and Ti6Al4V alloy for dental and orthopedic devices,» *Colloids. Surf. B. Biointerfaces,* pp. 88, 648-655, 2011.

[13] P. Roy, B. Steffen y P. Schmuki, «TiO2 Nanotubes: Syntesis and Applications,» *Nanoscience,* pp. 2904-2939, 2011.

[14] H. H. Hamdan, I. J. Harith y M. A. Abdulkareem, «Fabrication of TiO2 Nanotubes Using Electrochemical Anodization,» *Metal oxide nanotube,* p. 14, 2012.

[15] A. H. Escamilla, B. Valdez y M. Carrillo, «Modificacion de Superficies de Titanio al Aleaciones de Titanio por el Metodo de Anodizado Electroquimco para la Generacion de Arreglos de Nanotubos de Oxidos de Titanio (TiO2),» *Instituto de Ingenieria UABC,* vol. 1, p. 4, 2012.

[16] G. M. O. K, Varghese y M. Paulose, «A review on highly odered, vertically oriented TiO2 nanotube arrays: Fabrication, material properties, and solar energy applications,» *J. Sol. Energy Mater. Sol. Cell,* vol. 90, nº 14, pp. 2011-2075, 2006.

[17] D. V. Bavykin y F. C. Walsh, «Titanate and Titania Nanotubes, Synthesis, Properties and Applications.,» *RSC Publishing,* vol. I, p. 6, 2010.

[18] G. Crawford y N. Chawla, «Porous hierarchical TiO2 nanostructures: Processing and microstucture relationships,» *J. Acta Materialia-Elsevier,* vol. 57, nº 3, pp. 854-867, 2009.

[19] A. Fijishima, T. Rao y D. Tryk, «Titanium dioxide photocatalysis of Photochemistry and Photobiology,» *C: J. Phototchemistry Reviews,,* vol. 1, nº 1, pp. 1-21, 2000.

[20] P. H. y K. Ho-Gi, «Characterizations of Highly Ordered TiO2 Nanotube Arrays Obtained by Anodic Oxidation,» *J. Transactions on electrical and electronic materials (TEEM),* vol. 11, nº 3, pp. 112-115, 2010.

[21] C. A. Grimes y K. M. Gopal, «TiO2 Nanotube Arrays Synthesis, Properties and Applications,» p. XIII, 2009.

[22] M. Kulkarni, A. Mazare, E. Gongadze, S. Perutkova, V. Kralj-Iglic, I. Milosev, P. Schumuki, A. Iglic y M. Mozetic, «Titanium nanostructures for biomedical applications,» *IOP Publishing,* p. 2, 2015.

[23] V. Zwilling, M. Aucouturier y E. Darque-Cerreti, «Anodic Oxidation of Titanium and TAl6V Alloy Chromic Media. An Electrochemical Approach,» *J. Electrochimica Acta,* vol. 46, nº 6, pp. 921-929, 1999.

[24] Z. V., E. Darque-Ceretti, A. Boutry-Froveille, D. David, M. Perrin y M. Aucouturier, «Structure and physicochemistry of anodic oxide films on titanium and TAl6V alloy,» *J. Surface and Analysis,* vol. 27, nº 7, pp. 629-637, 1999.

[25] D. Gong, C. Grimes, K. Varghese y M. Paulose, «Hydrogen sensing using Titania nanotubes,» *J. Sens Actuators B,* nº 93, pp. 338-344, 2003.

[26] D. Gong, C. Grimes y K. Varghese, «Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation,» *J. Materials Research Society.,* vol. 16, p. 12, 2001.

[27] O. K., G. Varghese, G. Mor, M. Paulose, N. Mukherjee y C. Grimes, «Fabrication of tapered, conical-shaped Titania nanotubes,» *J. Materials Research,* vol. 18, nº 11, 2003.

[28] S.-H. O., R. Finones, C. Daraio, C. Li-Han y J. Sungho, «Grow of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes,» *J. Elsevier Ltd. Biomaterials,* nº 26, pp. 4938-4943, 2005.

[29] V. Vega, M. Prida, M. Hernandez-Velez, E. Manova, P. Aranda, E. Ruiz-Hitzky y V. Manuel, «Influence of Anodic Conditions on Self-ordered Growth of Highly Aligned Titanium Oxide Nanopores,» *Nanoscale Res Lett,* vol. 2, nº 7, pp. 355-363, 2007.

[30] H.-Y. S., Zhen-Hong, X. Kang, Z. Wei-Wei y Z. Hao-Li, «Microporous and Mesoporous Materials.,» *J. Elsevier,* nº 199, pp. 75-81, 2008.

[31] M. Z., L. Peng, M. S. Bhuiyan, C. Tsouris, G. Baohua, M. Parans, G. Jorge y L. Harrison, «Synthesis and characterization of anodized titanium-oxide nanotube arrays.,» *J. Mater Sci.,* nº 44, pp. 2820-2827, 2009.

[32] S. Sreekantan, H. Roshasnorlyza, K. Saharunin, L. Chin y I. Mat, «Formation of high aspect ratio TiO2 nanotube arrays by anodization of Ti foil in organic solution.,» *J. Sains Malaysiana,* vol. 3, nº 40, pp. 227-230, 2011.

[33] T. Kubo, A. Nakahira y Y. Yamasaki, «J. Mater. Res.,» vol. 5, nº 1286, p. 22, 2007.

[34] D. Qu, C. Z. Mosher, M. K. Boushell y H. H. Lu, «Engineering complex orthopeadic tissues via strategic biomimicry.,» *Ann Biomen Eng,* pp. doi: 10,1007/s10439-014-1190-6, 2014.

[35] R. Junker, A. Dimaki, M. Thoneick y J. A. Jansen, «Effects of implant surface coatings and composition of bone integration: A systematic review.,» *Clin. Oral Implants,* nº 20, pp. 185-206, 2009.

[36] M. Sundfeldt, L. V. Carlsson, C. B. Joansson, P. Thomsen y C. Gretzer, «Asetic loosening not only a question of wear: A review of different theories.,» *Acta Orthop,* vol. 2015, nº 8, pp. 177-197, 2006.

[37] H. K. K. K. a. J. Y. K. Umimoto, "Development of a Device to Provide Electrolyzed Water for Home Care," *Springer-Verlag Berlin Heidelberg,* vol. Biomed 2008, no. 21, pp. 738-741, 2008.

[38] P. Roy, B. Steffen y S. Patrick, «TiO2 Nanotubes: Synthesis and Applications,» *Angew. chem. Int.,* vol. 50, p. 2909, 2011.

[39] S. P. Albu, A. Ghicov, S. Aldabergenova, P. Drechsel, D. LeClere, G. E. Thompson, J. M. Macak y P. Schmuki, *Adv. Mater,* nº 4135, p. 20, 2008.

[40] R. Beranek, H. Hildebrand y P. Schmuki, «Electrchem. Solid Satate Lett,» vol. B12, p. 6, 2003.

[41] D. Kim, A. Ghicov y P. Schmuki, «Electrochem. Commun,» vol. 10, p. 1835, 2008.

[42] Y. Song, R. Lynch, D. Kim, P. Roy y P. Schmuki, «Electrochem Solid State Lett,» vol. C17, p. 12, 2009.

[43] J. Park, S. Bauer, K. Von Der Mark y P. Schmuki, «Nano Lett,» vol. 7, p. 1686, 2007.

[44] S. P. Albu, A. Ghicov, J. M. Macak, R. Hahn y P. Schmuki, «Nano Lett,» vol. 7, p. 1286, 2007.

[45] A. Armstrong, G. Armstrong, J. Canales, R. Garcia y P. G. Bruce, «Adv. Mater,» vol. 17, p. 862, 2005.

[46] K. Yasuda y P. Schmuki, «Electrochim Acta,» vol. 52, p. 4053, 2007.

[47] D. Kim, F. Schmidt-Stein, R. Hahn y P. Shmuki, «Electrochem Commun,» vol. 10, p. 1082, 2008.

[48] J. Macak, H. Hildebrand, U. Marten-Jahns y P. Schmuki, «J. electroanal. Chem.,» vol. 621, p. 254, 2008.

[49] K. Yasuda y P. Schmuki, «Electrochim Acta,» vol. 52, p. 4053, 2007.

[50] Y. K., J. M. Macak, S. Berger, A. Ghicov y P. Schmuki, «J. Electrochem. Soc.,» vol. C472, p. 154, 2007.

[51] S. Bauer, S. Kleber y P. Schmuki, «Electrochem. Commun,» vol. 1321, p. 8, 2006.

[52] K. Lee, J. Lee, H. Kim, Y. Lee, D. Kim, P. Schmuki y Y. Tak, «J. Korean Phys. Soc.,» vol. 54, p. 1027, 2009.

[53] S. P. Albu y P. Shmuki, «Phys. satus Solidi,» *RRL,* vol. 4, p. 151, 2010.

[54] J. Macak, T. Tsuchiya, L. Taveira, S. Aldabergerova y P. Schmuki, «Angew. Chem.,» vol. 7463., p. 44, 2005.

[55] J. M. Macak, H. Tsuchiya, L. Taveira, S. Aldabergerova y P. Schmuki, «Angew. Chem.,» *Int. Ed.,* Vols. %1 de %27463-7629, pp. 44-117, 2005.

[56] K. V. D. Mark, J. Park, S. Bauer y P. Schmuki, «Cell Tissue Res,» vol. 131, p. 339, 2010.

[57] Y. Song y P. Schmuki, «Electrochem Commun,» vol. 579, p. 12, 2010.

[58] B. S, J. Kunze, P. Schmuki, A. T. Valota, D. J. Leclere, P. Skeldon y G. E. Thompson, «J. Electrochem. Soc.,» vol. C18, p. 157, 2010.

[59] L. Taveira, J. M. Macak, K. Sirotna, L. F. P. Dick y P. Schmuki, «J. Electrochem. Soc.,» vol. B137, p. 153, 2006.

[60] W. Chanmanee, A. Watcharenwong, C. R. Chenthamarakshan, P. Kajitvichyanukul, N. R. Tacconi de y K. Rajeshwar, «J. Am. Chem. Soc.,» vol. 965, p. 130, 2008.

[61] A. Ghicov y P. Schmuki, «Chem. Commun,» p. 2791, 2009.

[62] W. Wei, S. Berger, C. Hauser, K. Mayer, M. Yang y P. Schmuki, «Electrochem Commun,» vol. 1184, p. 12, 2010.

[63] G.-V. S.J., P. Skeldon, G. Thompson y H. Habazaki, «Electrochim. Acta,» vol. 681, p. 52, 2006.

[64] S. P. Albu, A. Ghicov, J. M. Macak y P. Schmuki, «Phys. Status Solidi,» *RRL,* vol. R65, p. 1, 2007.

[65] M. Macak, «Growth of anodic self-organazed titanium dioxide nanotube layers",» *University Erlangen-Nurnberg-Germany,* nº Ph.D. Thesis, 2008.

[66] M. Macak, R. Beranek, H. Tsuchiya, T. Sugishima, L. Taveira, S. Fujimoto, H. Kisch y P. Schmuki, «Enhancement and limits of the photoelectrochemical response from anodic TiO2 nanotubes,» *Appl. Phys. Lett.,* vol. 243114, p. 87, 2005.

[67] L. T. Hei, «Parametric study on the fabrication and modification f TiO2 nanotube arrays for photoelectrocatalytic degradation of organic pollutants,» *Thesis of Ph. D dissertation, B.Eng. Tsingua University,* 2010.

[68] G. Mor, Varghese y M. Paulose, «A review on highly ordered, vertically oriented TiO2 nanotube arrays: Fabrication, material properties, and solar energy applications,» *J. Sol. Energy Mater. Sol. Cells.,* vol. 90, nº 14, pp. 2011-2075, 2006.

[69] V. Norton y L. Samuelson, «Method and apparatus for producing a stabilized antimicrobial non-toxic electrolized saline solutions exhibiting potential as a therapeutic,» *United States Patent application Publications,* 2012.

[70] M. I. A. r. Reserved., «support.minitam.com».

[71] E. T. L. E. E. C. P. Roberto C. Rebollar Gonzalez, «Soluciones superoxidadas: Una alternativa contra el manejo de las heridas infectadas,» *Sociedad Medico Quirurgica Mexico 1930,* vol. 77, nº 2, pp. 98-100, 2010.

[72] L. V. Taveira, J. M. Macak, H. Tsuchiya, L. Dick y J. Schmuki, *J. Electrochem. Soc.,* vol. B405, p. 152, 2005.

[73] S. P. Albu y P. Schmuki, «Phys. Status Solidi,» *RRL,* vol. 215, p. 4, 2010.

ANEXOS.

Materials Science and Engineering C 60 (2016) 239–245

Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science and Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msec

Disinfection of titanium dioxide nanotubes using super-oxidized water decrease bacterial viability without disrupting osteoblast behavior

Ernesto Beltrán-Partida [a,b], Benjamín Valdez-Salas [b,*], Alan Escamilla [b], Mario Curiel [b], Ernesto Valdez-Salas [c], Nicola Nedev [b], Jose M. Bastidas [d]

[a] Department of Biomaterials, Dental Materials and Tissue Engineering, Faculty of Dentistry Mexicali, Autonomous University of Baja California, Av. Zotoluca and Chinampas St., 21040 Mexicali, Baja California, Mexico
[b] Department of Corrosion and Materials, Engineering Institute, Autonomous University of Baja California, Blvd. Benito Juarez and Normal St., 21280 Mexicali, Baja California, Mexico
[c] Ixchel Medical Centre, Av. Bravo y Obregón, 21000 Mexicali, Baja California, Mexico
[d] National Centre for Metallurgical Research, CSIC, Av. Gregorio del Amo 8, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 May 2015
Received in revised form 20 October 2015
Accepted 16 November 2015
Available online 17 November 2015

Keywords:
Titanium
Nanostructures
Sterilization
Bacterial viability
Super-oxidized water

ABSTRACT

Amorphous titanium dioxide (TiO_2) nanotubes (NTs) on Ti6Al4V alloy were synthesized by anodization using a commercially available super-oxidized water (SOW). The NT surfaces were sterilized by ultraviolet (UV) irradiation and disinfected using SOW. The adhesion and cellular morphology of pig periosteal osteoblast (PPO) cells and the behavior of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) cultured on the sterilized and disinfected surfaces were investigated. A non-anodized Ti6Al4V disc sterilized by UV irradiation (without SOW) was used as control. The results of this study reveal that the adhesion, morphology and filopodia development of PPO cells in NTs are dramatically improved, suggesting that SOW cleaning may not disrupt the benefits obtained by NTs. Significantly decreased bacterial viability in NTs after cleaning with SOW and comparing with non-cleaned NTs was seen. The results suggest that UV and SOW could be a recommendable method for implant sterilization and disinfection without altering osteoblast behavior while decreasing bacterial viability.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Titanium (Ti) and Ti-based alloys are among the most widely used clinical materials for orthopedic and dental implants [1], due to their mechanical strength, light weight, corrosion resistance by the formation of a protective TiO_2 layer, and biocompatibility [1,2]. However, bacterial adhesion on the implant surface is a complication that can critically affect the success of biomaterials due to the ability of bacteria to form biofilms which lead to implant failure [3–5]. To address these problems, this study considers NTs produced by anodization, as they can be synthesized with controlled order, improved corrosion resistance, increased surface roughness, a lower water contact angle, and excellent biocompatibility compared to non-modified Ti surfaces [2,6,7]. It has also been suggested that a 70–100 nm NT diameter promotes alkaline phosphatase activity levels and increased calcium deposition compared to non-anodized Ti and smaller NT diameters [8], information that propose 80 nm NTs as a bone forming-functional coating. On the other hand, Ercan et al., reported decreased *Staphylococcus aureus* viability on amorphous 80 nm NTs after comparing to minor diameter NTs (20, 40 and 60 nm) and non-anodized Ti [9]. Likewise, Arenas et al., described that amorphous 100 nm NTs built on Ti6Al4V by anodization promotes superior antibacterial effects against *S. aureus* after comparing to non-anodized Ti6Al4V [10]. As well, they suggested a reduced colonization rate of a clinically *S. aureus* strain (isolated from an infected hip prosthesis) cultured on NT surfaces after comparing to 20 nm diameter TiO_2 nanopores and non-anodized Ti6Al4V [10]. Moreover, in a recent study we observed an elevated and sustained antibacterial performance against *S. aureus* for up to 5 days on amorphous 80 nm NTs fabricated on Ti6Al4V using SOW for anodization, but not for surface disinfection [11]. This information advocates the use of 80–100 nm NTs as an appropriate antibacterial nanostructured coating.

Sterilization is defined as a process that completely eradicates or destroys bacterial life, being widely performed by physical or chemical processes [12], and has been reported to play an important role in the biological behavior (e.g. cellular adhesion or bacterial viability) of implant surfaces [2,13–15], especially Ti. In recent studies autoclaving has commonly been used as a sterilizing technique for Ti surfaces [2], but autoclaving has shown that is capable to reduced hydrophilicity of Ti surfaces through the deposition of hydrophobic contaminants on the material surface [13], resulting in reduced cytocompatibility. Furthermore, sterilization by autoclaving has led to significantly decreased MG63 human osteoblast and MC3T3-E1 mouse osteoblast responses on NTs and non-anodized Ti [13,16]. Moreover, Kummer et al.,

* Corresponding author.
E-mail address: benval@uabc.edu.mx (B. Valdez-Salas).

http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.042
0928-4931/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

suggested increased *S. aureus* growth on 80 and 20 nm diameter NTs and on non-anodized Ti surfaces sterilized by autoclaving, compared to ethanol and UV sterilization methods [2].

SOW is an electrolyzed water that contains oxidizing species such as H_2O_2, oxidizing radical (i.e. hypochlorous species) an chlorine molecules like hypochlorite [17,18]. It has been widely used as a disinfectant for medical instruments and inanimate surfaces [17]. Furthermore, it has been reported to be effective in the treatment of infectious diseases such as skin defects or ulcers, peritonitis and intraperitoneal abscesses [17,19], suggesting that SOW acts as a potent antibacterial agent with a broad-spectrum antibacterial efficacy [20]. In this manner, it has been proposed that SOW works destroying the covalent bonds of the nucleic acid chains, as well as the protein chains in *Escherichia coli* (*E. coli*) JM109 [21,22]. Moreover, an AFM study showed that SOW in contact with *E. coli* for 30 s was able to induced cellular swelling and at the end of 5 min of exposure it was observed that the cells were completely destroyed [23]. These data suggested that SOW acts as an antibacterial agent that negatively interferes with the metabolic activity and membrane integrity of bacteria. On the other hand, SOW has also been recommended for handwashing by medical personnel [17], being proposed as a non-cytotoxic substance. However, the promising effects of SOW as a disinfectant agent have not been investigated on nanostructured Ti. On the basis of the above it is hypothesized that Ti6Al4V NT surfaces sterilized with UV and disinfected by SOW rinsing will offer lower bacterial viability without altering osteoblast adhesion and morphology.

The present study evaluates for the first time the bacterial behavior of 80 nm TiO_2 NTs on Ti6Al4V alloy sterilized by UV and disinfected using a commercially available super-oxidized solution. Osteoblast behavior is explored by evaluating cell adhesion, cellular morphology and the formation of filopodias, as well as cytoplasmic stress fibers. The surface morphology of the material was analyzed by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), the chemical composition by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), and the surface roughness by atomic force microscopy (AFM). *S. aureus* viability on the surfaces was assessed by colony-forming unit (CFU) calculation and bacteria morphology was analyzed using scanning electron microscopy (SEM). Osteoblast behavior was also examined by SEM and fluorescence microscopy.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of NTs

NTs were synthetized as described in a previous study [24]. Discs of Ti6Al4V (ASTM F-136; Supra Alloys Inc., Camarillo, CA, USA) with 150 mm diameter and 5 mm thickness were polished using SiC emery paper (100 to 2000 grit) and 1-μm alumina to achieve a mirror finish. The discs were then mounted on a special flat 125 mL cell and electrolytically anodized using Microdacyn 60® super-oxidized water (Oculus Technologies, Guadalajara, JAL, MEX) at pH 6.8, containing 10 mg/L of NH_4F (Sigma-Aldrich, USA) and 100 mg/L NaCl (Sigma-Aldrich, USA). A 20 V potential was applied using a DC power supply for 5 min and a platinum mesh as counter electrode. The process was carried out at room temperature (defined here as RT). Finally, the discs were cleaned in an ultrasonic bath with distilled water for 5 min to eliminate residues of fluoride salts [25], rinsed with isopropyl alcohol, and dried in a desiccator for 12 h. All experimental substrates were sterilized by UV irradiation (285 nm UVB light source) for 30 min on each side [2,13].In order to systematically evaluate the effect of SOW rinsing, an anodized-Ti6Al4V NTs and non-anodized Ti6Al4V materials (namely here as NT-SOW and Ti6Al4V-SOW respectively) were disinfected by immersion in 20 mL of SOW for 1 h and finally dried at RT before use. A non-anodized Ti6Al4V alloy disc (denoted here as Ti6Al4V) was used as control. Finally, an anodized-Ti6Al4V NT (NT) surface was used as a negative control.

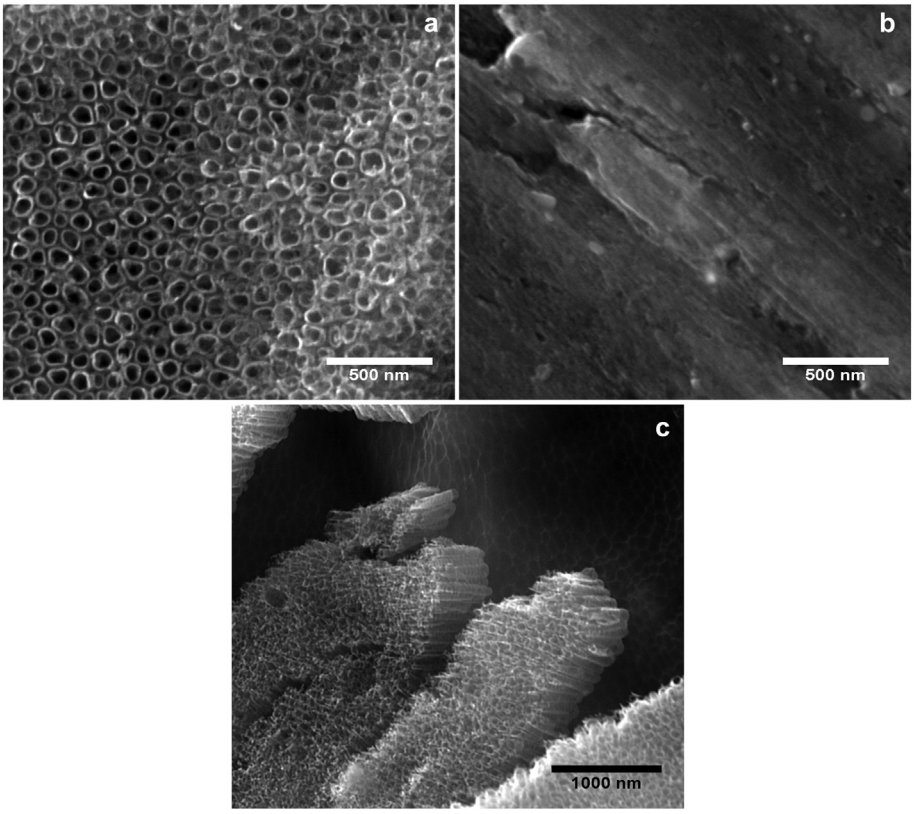


Fig. 1. FE-SEM micrographs of the experimental surfaces cleaned by SOW: (a) anodized Ti6Al4V alloy illustrating the presence of NTs. (b) Ti6Al4V surface showing a flat surface. (c) A cross-section view of NTs.

Table 1
Elemental composition percentages of the experimental surfaces.

Sample	C (%)	V (%)	Al (%)	Ti (%)	O (%)	F (%)
Anodized NT-SOW	4.61	–	4.06	68.10	20.32	2.91
Anodized NTs	5.19	–	4.80	61.50	24.00	4.51
Ti6Al4V-SOW	0.97	4.11	6.26	88.66	–	–
Ti6Al4V	3.40	3.43	6.06	87.11	–	–

2.2. Surface characterization

The structural morphology of the sample surfaces were characterized by FE-SEM (Tescan LYRA 3, Brno Czech Republic), taking images at a 20 kV accelerating voltage. The chemical composition of the alloy surface was assessed by EDX (Tescan LYRA 3, Brno Czech Republic) using a silicon drift detector coupled to the FE-SEM.

An AFM (Quesant Q-Scope 350, AMBIOS, Agura Hills, CA, USA) was used to measure the surface roughness of the experimental substrates. The process was performed at RT using an anti-acoustic box to prevent noise, which can affect the measurements. Topographic images were obtained operating at a scan rate of 1 Hz. A 40-μm X–Y and 4-μm Z scanner equipped with silicon tips and 10 nm tip curvature was used. The experiment scan surface area was 1 μm^2. The root mean square (RMS) is provided in order to quantitatively compare the roughness between NTs and Ti6Al4V surfaces.

2.3. Osteoblast culture and characterization on the materials

For these studies, PPO cells were isolated from pig femur periosteal bone [24]. The cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and a volume fraction of 1% penicillin–streptomycin (PS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C in 5% CO_2. Each experimental sample (NT-SOW, NTs, Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V control surface) was placed in an individual well of a 12-well polystyrene plate. The cells were seeded using 1 mL of medium containing a concentration of 2×10^4 cells per mL onto the materials and stored in a CO_2 chamber for the experimental time [8,24].

In order to count adhered osteoblasts on the experimental samples, DAPI staining was performed. At 4, 12 and 24 h after culturing, the cells on the substrates were washed three times in phosphate-buffered saline (1× PBS) solution to remove non-adhered cells. The remaining cells were fixed in 4% paraformaldehyde (indicated here as PA) in 1× PBS for 30 min at RT. Once fixed, the cells were stained with 4′,6′-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) in 1× PBS and incubated for 5 min at RT, and then washed three times with 1× PBS [26]. Finally, the samples were inverted onto coverslips with a fluorescence mounting medium (DAKO, Agilent Technologies, Carpinteria, CA, USA), visualized, photographed and counted in five random fields using a blue filter by a fluorescence microscope (Axio Observer A1, Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA).

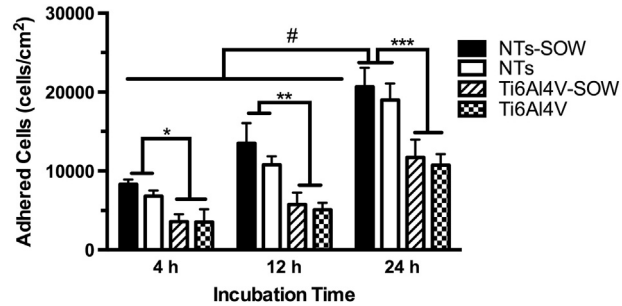


Fig. 3. Number of adhered PPO cells on the biomaterial surfaces as a function of time. Values are mean ± SD, N = 3. *, ** and *** denote differences between NT-SOW and NT groups versus Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V control surfaces after 4 h, 12 h and 24 h of incubation respectively. # indicates significant differences for NT-SOW and NT substrates at 24 h after comparing to all the experimental materials cultured at 4 h and 12 h.

In contemplation to analyze the formation of cellular stress fibers on the disinfected materials, cytoskeletal actin immunofluorescence was performed after 24 h of culture on the NT-SOW and Ti6Al4V-SOW substrates. The samples were initially washed three times with 1× PBS and fixed with PA for 30 min at RT. Once fixed, they were again washed three times with 1× PBS. To permeabilize the cells, 0.1% Triton X-100 in 1× PBS solution was added for 20 min. The cells were washed three times with 1× PBS and the samples were incubated for 1 h at RT in bovine serum albumin (BSA) blocking solution (1% BSA/1× PBS) and washed with 1× PBS. Next, the cells were incubated with Alexa Fluor 488 phalloidin (1:100; Invitrogen, USA) in blocking solution and incubated for 1 h. The cells were again washed three times and counterstained with DAPI for 10 min at RT. Finally the specimens were inverted onto coverslips with a fluorescence mounting medium, examined and photographed using a green (actin) and blue (DAPI) filter by means of a fluorescence microscope [27].

To characterize cell morphology a SEM (JSM-6010LA, JEOL, Tokyo, Japan) analysis was carried out as described by others [8,24]. After

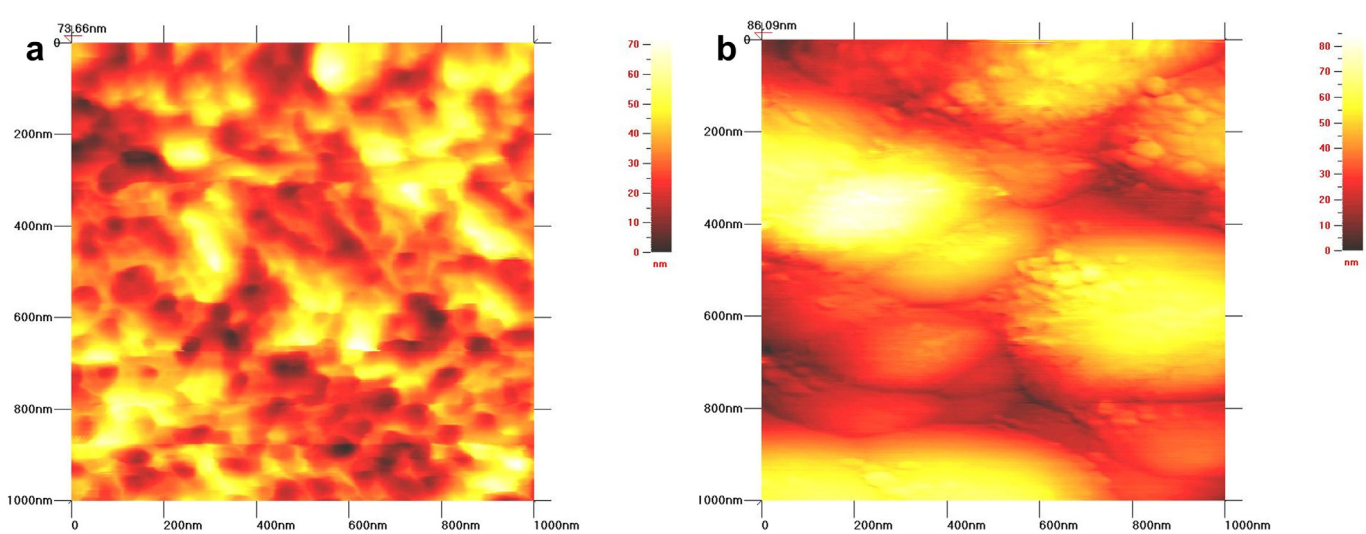


Fig. 2. AFM micrographs of the disinfected Ti6Al4V surfaces: (a) Ti6Al4V surface with anodized NTs showing a rougher surface. (b) Ti6Al4V surface representing a smooth and flat surface.

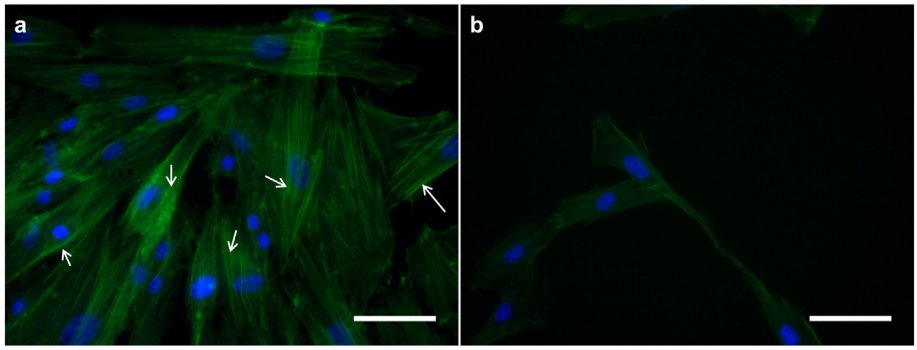


Fig. 4. Fluorescence detection of F-actin in PPO cells cultured on the disinfected experimental materials for 24 h: (a) NT-SOW illustrating spreaded cells with and organized and aligned cytoskeleton, with the evident presence of cytoplasm stress fibers (pointed arrows). (b) Ti6Al4V-SOW surface showing an elongated cellular morphology without the presence of cytoplasm stress fibers. Scale bars are 50 μm.

24 h of seeding, cells on the experimental specimens (NT-SOW and Ti6Al4V-SOW) were washed twice with 1× PBS and fixed with 5% *w/v* glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS for 2 h. After fixation they were washed three times with 1× PBS (10 min each). The cells were then dehydrated in grade series of ethanol (50, 70, 90 and 100%) for 30 min at each concentration. Finally, the samples were sputter-coated with gold (10 nm gold layer) for 8 s. The morphology of the adhered osteoblasts was observed using a SEM at 5 kV accelerating voltage.

2.4. Bacterial culture and characterization

For bacterial growth experiments, *S. aureus* (Strain American Type Cell Culture Collection 25923, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was used. For the preparation of the inoculums, the strain was freshly grown overnight on tryptic soy agar (TSA) plates (Beckton Dickinson, Sparks, Maryland, USA). Discrete colonies were obtained from TSA plates and suspended in tryptic soy broth (TSB) to an optical density (O.D.) of 0.3, pH 7.0; assessed using a spectrophotometer (LAMBDA 25, Perkin Elmer, Connecticut, USA).

For the determination of viable cells on the samples, 100 μL of *S. aureus* suspension containing approximately 1×10^7 CFU/mL (O.D. 0.3) plus 100 μL of fresh TSB was used to cover the surface of the material. This inoculum was incubated on the specimens for 4 and 24 h at 37 °C in a static model. After the corresponding incubation times, the specimens were rinsed twice with 1× PBS to remove any unbounded cells. The substrates were transferred into sterile conical tubes (Falcon, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) with 5 mL of fresh TSB medium. The tubes were placed in an ultrasonic bath and sonicated for 15 min at 120 W to release the attached cells from the biomaterial. This process has been reported in previous studies to completely remove adhered cells [28,29]. The materials were then removed and the remaining suspensions were diluted with 1× PBS and cultured at 37 °C for 24 h in TSA plates. Bacterial viability was assessed by CFU counting on TSA plates. The above procedure was performed 20 times for each material [29].

In order to determine the bacterial density and morphology after 24 h of incubation, the disinfected samples were prepared for SEM analysis according to the following procedure; the discs were rinsed in 1× PBS to wash away non-adhered bacteria and then fixed with 2.5% glutaraldehyde for 2 h at 25 °C. Next, the samples were washed three times with 1× PBS (10 min each wash), dehydrated in a graded series

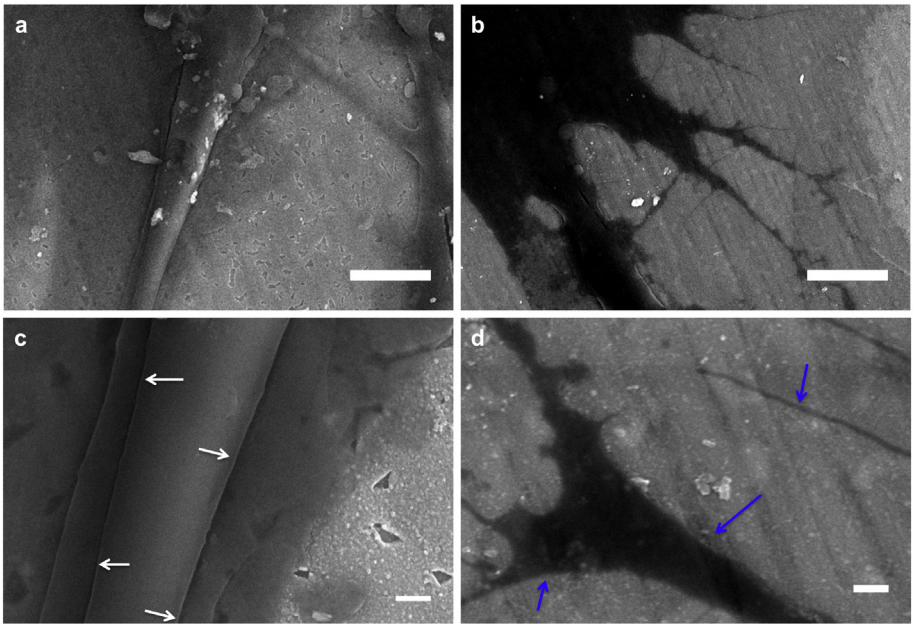


Fig. 5. SEM micrographs of osteoblasts on Ti6Al4V-SOW and NT-SOW at 24 h of culture. (a) NT-SOW surface illustrating an elongated and pronounced filopodia adhered on the substrate. (b) Ti6Al4V-SOW showing lower spreaded filopodias. (c) Higher magnification denoting a thicker filopodia anchored to the NT-SOW (white arrows) and the deposition of ECM. (d) High magnification of Ti6Al4V-SOW surface indicating a translucent adhered filopodia (blue arrows). Scale bars for a and b are 10 μm, for c and d are 1 μm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

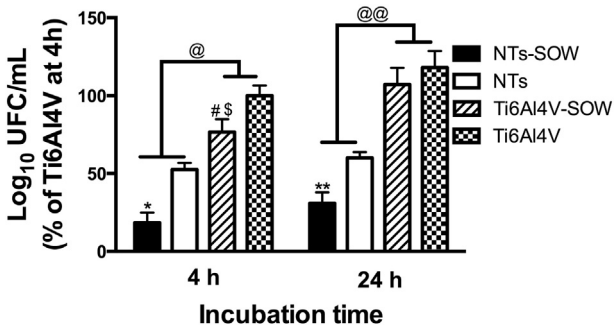


Fig. 6. Viability evaluation of *S. aureus* cultured on the surface specimens after 4 and 24 h of incubation: The bar graphs show the mean ± SD error bars, N = 3, * and ** illustrate significance between NT-SOW and NTs at 4 h and 24 h respectively. @ and @@ denote significance between NT-SOW and NT group surfaces when comparing them to Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V after 4 h and 24 h of culture respectively. Next, # indicates statistical difference between Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V control surface at 4 h of bacterial growth. Finally, $ expresses divergence among Ti6Al4V-SOW at 4 h and Ti6Al4V at 24 h of colonization.

of ethanol solutions (50, 60, 70, 80, 90 and 100% *v*/*v*), and finally sputter-coated with 10-nm gold for the analysis.

2.5. Statistical analysis

At least three independent experiments were performed, each in triplicate. For the microscopic analysis, at least five random fields were analyzed for each experimental group. Numerical data were analyzed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The significance of differences between group means was determined using two-tailed unpaired Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test when appropriate. A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

The surface morphologies of the experimental materials are presented in Fig. 1. Interestingly, Fig. 1a shows FE-SEM micrographs of the anodized NTs, indicating the presence of a nanotubular and uniformly distributed layer over the alloy surface as previously reported [24]. In contrast, Fig. 1b suggests a smooth and flat surface with no evidence of nanostructured morphology, as expected [30]. Fig. 1c offers a cross-section view of the NTs. The NT diameter was estimated to be 80 nm and the length 400 nm.

The chemical composition of the material surfaces is compared in Table 1. The difference between the experimental samples consists of an increased oxygen content (24%) on the NTs and NT-SOW (20.3%) surface and the presence of trace amounts of fluoride (4.51 and 2.91%, respectively) due to anodization, information that strongly suggests the formation of a thick nanostructured layer which is not present on the Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V control surface, in agreement with other studies [24,25,31,32]. Indeed, this information advocates that SOW rinsing may not negatively disturb the chemical properties of the nanostructured surface.

Surface roughness represents an important parameter in the biological behavior of nanostructured surfaces [33]. Interestingly, it has been widely reported that rougher surfaces may potentially increase cellular adhesion while promoting osteoblast functionality, so attention has been paid to the surface topography of the experimental materials (Fig. 2). Fig. 2a indicates an increased surface roughness (9.19 ± 0.22 nm) on anodized NTs, as denoted by the increased formation of highly ordered nanostructured dots, data which correlates with the nanotubular morphology illustrated by FE-SEM images (Fig. 1a). The Ti6Al4V control surface topography is presented in Fig. 2b, indicating a flat and smooth surface (3.71 ± 0.68 nm) as expected, results that are in concordance with the nanotextured and flat surfaces reported in the literature [2,24,25,31,32].

Fig. 3 depicts the cell adhesion process of the PPO cells stained with DAPI on the experimental materials. The cellular adhesion process on the NT and NT-SOW surface increases dramatically with each incubation time (4 h, 12 h and 24 h) compared to the Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V control surface groups. Moreover, a cellular proliferation trend over the NT-SOW and NT surface could be elicited after analyzing with ANOVA (at each culture time), as a similar tendency was denoted on the Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V control surface, though with improved differences on the NT-SOW surface, suggesting that SOW disinfection may not disrupt the osteoblast adhesion process [7,8,31]. Interestingly, increased adhesion and proliferation of primary pig osteoblast cultured on anodized NT surfaces sterilized with UV was evidenced in a previous study [24]. Similarly, Zhao et al. suggested increased primary rat osteoblast adhesion and proliferation on anodized NTs sterilized with UV and ethanol versus an autoclaving process and polished Ti [13]. This trend was explained by the author as being due to the formation of abundant Ti–OH functional groups [34] and the removal of surface hydrophobic contaminants, especially hydrocarbons, by the UV irradiation [34,35]. They also reported increased surface energy for NTs and polished Ti surfaces sterilized by means of UV and ethanol, whereas the autoclaving process did not influence the surface energy [13]. This finding is in agreement with a recent study that described increased surface energy and MG63 osteoblast adhesion on Mg and MgCa alloys sterilized by means of ethanol immersion [12]. According to the aforementioned reports, our results suggest a similar trend to these previously reported, but more studies regarding the chemical behavior of the nanostructured surface after SOW disinfection as well as comparison with different sterilization techniques will be required in order to elucidate these trends.

Cytoskeletal actin organization and cell morphology were also analyzed by means of fluorescence microscopy, showing remarkable differences between the disinfected substrates, as depicted in Fig. 4. Initially, PPO cells cultured on the NT-SOW surfaces (Fig. 4a) showed an

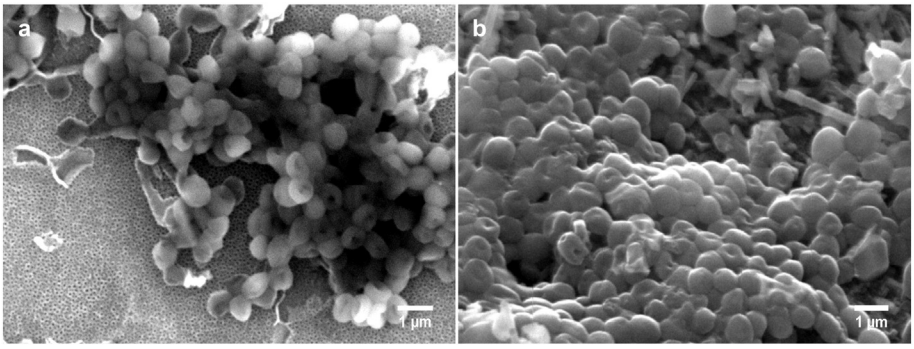


Fig. 7. SEM micrographs of adhered bacteria on the SOW-treated surfaces at 24 h of incubation: (a) Bacteria observed on the NT-SOW surface, illustrating a spherical morphology. (b) Bacteria adhered on the Ti6Al4V-SOW substrate, showing an evident biofilm formation. Denoted similar cell morphology on both experimental substrates.

organized and aligned actin assembly as well as an increased arrangement of criss-cross pattern stress fibers within the cell body (pointed arrows); trends that are in agreement with previous results regarding the configuration of osteoblast cells cultured on nanostructured titanium surfaces [27,36]. These patterns have been closely associated to an increased expression of extracellular proteins such as fibronectin and vinculin present in osteoblasts cultured on nanostructured surfaces, as well as the increased surface roughness provided by NTs (see Fig. 2), data that may explain the aligned and ordered cellular morphology and the increased formation of stress fibers observed on our NT surfaces [27,36,37]. The development of stress fibers is intimately associated to cellular movement such as cell locomotion, organelle movements and changes in cell shape [36]. Interestingly, the increased formation of stress fibers has been closely associated to osteogenesis and hydroxyapatite biomineralization processes [27,38], suggesting that SOW disinfection may not disrupt long-term osteoblast maturation on NT surfaces. When comparing the aforementioned trends with the Ti6Al4V-SOW (Fig. 4b), we detected increased cellular elongation and reduced stress fiber formations, which may suggest poorer cellular adhesion, supporting the cellular adhesion results that were previously discussed (see Fig. 3). Moreover, after comparing the SOW and control groups, we did not find significant differences, information that supports the above discussed finds.

It has been reported that cellular migration is closely associated to two cytoplasmic protrusions, lamellipodia and filopodia [39]. Filopodia is widely known to play an important role in cellular adhesion. Thus, in order to elucidate filopodia development on the SOW-treated experimental surfaces, SEM analysis was performed (Fig. 5). After 24 h, cells cultured on the NT-SOW surfaces elicited an elongated filopodia (Fig. 5a), compared to a smaller and thinner filopodia observed on the Ti6Al4V-SOW surface (Fig. 5b). Higher magnification of the cells confirmed the formation of a thicker anchored filopodia (white arrows) and increased ECM deposition around filopodia on the NT-SOW as depicted in Fig. 5c. Osteoblast filopodia anchored to NT surfaces has been associated with increased alkaline phosphatase activity and a greater secretion of Ca and P [7,8,27], which may suggest that thicker filopodia could promote improved functionality and thus that SOW disinfection may not disturb bone maturation. Furthermore, this information supports the increased stress fiber developed within the osteoblasts cultured on the NT surfaces as described above (see Fig. 4). The Ti6Al4V-SOW surface presented a thinner and translucent filopodia (blue arrows) without evident deposition of ECM as illustrated in Fig. 5d. Likewise, after comparing SOW and control surfaces we did not detect substantial differences among them, information that correlates the F-actin results.

It has been widely reported that the first hours after biomaterial implantation are crucial due to the risk of bacterial contamination on the implant surface by biofilm formation [3,4]. Therefore, *S. aureus* viability on the samples was analyzed and is shown in Fig. 6. At 4 h of bacterial culture, the NT-SOW and NT surfaces illustrated an 81.46% and 47.5% ($P < 0.05$) decrease in viable bacteria compared to the Ti6Al4V control surface. Furthermore, the NT-SOW displayed 64.7% ($P < 0.05$) reduction in healthy bacteria when correlating to the NT surface at 4 h of incubation. After 24 h the NT-SOW and NT surfaces continued to show lower bacterial viability (69 and 40% respectively) in comparison to the Ti6Al4V control surface cultured for 4 h and a similar tendency was observed for Ti6Al4V-SOW at 4 h. Likewise, a significant difference was appreciated after measuring NT-SOW and NTs versus Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V at 24 h of bacterial colonization. An increased bacterial number was observed between the NT-SOW and NT surfaces after 4 h and 24 h of culture, but these differences were not statistically different. In fact, a higher number of live bacteria were determined after analyzing the Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V control surfaces at 4 and 24 h of incubation compared to the NT-SOW and NT materials at 4 h and 24 h. After 24 h of incubation an increased number of viable bacteria i.e. 18% was calculated on the Ti6Al4V control surface compared to the same one at 4 h. In summary, a smaller number of live bacteria is observed on the NTs disinfected by SOW rinsing, while the Ti6Al4V control surface as well as Ti6Al4V-SOW yielded bacterial growth. These trends could be explained by the chemical modification of the surface due to the presence of fluoride on the NT surface after anodization. Anodization was carried out by immersion in NH_4F and the application of voltage on Ti, resulting in a greatly increased fluorine content on the anodized surfaces, basically due to the presence of TiF_6^{2-} species [9]. Moreover, the aforementioned trends are in concordance to Ercan et al., who reported a high number of dead S. aureus after 1 h of incubation on nanotubular TiO_2 [9]. Furthermore, Arenas et al. described increased antibacterial properties of anodized NTs with a high percentage of fluoride against clinical strains of *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) compared to conventional non-modified Ti and NTs with a lower fluoride content [5], data that are in agreement with the decreased bacterial viability reported here. The sterilization process may also count as another variable to explain the abovementioned results. For instance, Puckett et al. suggested an increased percentage of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *Pseudomona aeroginosa* (*P. aeroginosa*) on nanotubular Ti manufactured by anodization using fluoride and autoclaving as sterilization [40]. In contrast, Lin et al. reported decreased *S. aureus* viability in vitro and in vivo on anodized 80 nm diameter NTs and on NTs loaded with gentamicin manufactured using fluoride and sterilized with UV in comparison to a conventional non-anodized Ti surface [41]. Similarly, Zhang et al. suggested decreased viability of *S. aureus* in vitro and in vivo on sintered nanotubular Ti with no presence of fluoride and NTs loaded with vancomycin but sterilized using ethylene oxide [42]. Additionally, the presence of SOW species used for NT preparation as well for surface cleaning on the nanostructured material may synergistically contributed to the increased antibacterial effects observed on NT-SOW, possibly due to the alteration of bacterial DNA and by the destruction of bacterial membrane [21,43]. In the present study, decreased viable bacteria has been elucidated on NT surfaces sterilized by means of UV and disinfected using SOW, following a similar tendency as reported by others [2,14,41]. These results may suggest the combination of UV and SOW as a novel protocol for sterilization and disinfection of nanostructured Ti surfaces.

Finally, Fig. 7 showed the *S. aureus* morphology on the experimental materials (NT-SOW and Ti6Al4V-SOW) incubated for 24 h. In Fig. 7a the presence of *S. aureus* is detected on the NT surface, denoting a spherical morphology. Similarly, Fig. 7b illustrates the presence of *S. aureus* on Ti6Al4V-SOW, indicating a similar spherical morphology. However, a high number of adhered bacteria were observed on the Ti6Al4V-SOW, supporting the bacterial viability information. These results are in concordance with Ercan et al., who reported a similar *S. aureus* morphology on anodized NT and Ti6Al4V surfaces [32]. Additionally, no significant differences on bacterial morphology were detected between the control and disinfected surfaces, data that suggest that SOW may act inhibiting *S. aureus* adhesion.

To the best of our knowledge this is the first study regarding the use of UV and SOW for Ti sterilization and disinfection. Nonetheless, we recommend the evaluation of more NT diameters, and the comparison of different sterilization techniques. Furthermore, the chemical composition of the NTs after SOW disinfection should be assessed using different analytical methods in order to elucidate more precisely the mechanisms involved in the aforementioned results. Further studies focused on in vivo behavior are recommended.

4. Conclusions

SOW has been widely used for cleaning and disinfecting medical instrumentation. This study has shown reduced bacterial viability for NTs sterilized and disinfected by means of UV and SOW without disrupting osteoblast adhesion and morphology in comparison with an anodized Ti6Al4V alloy and a non-anodized Ti6Al4V surface. These results suggest

that SOW could potentially be used as a disinfecting agent for nanostructured implant biomaterials without compromising their performance.

5. Disclosures

The authors declare no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgments

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-CVU 348737, 114359), Mexico, for a PhD Scholarship. The authors also want to acknowledge to UABC due to the grant number 2058 from 1ra Convocatoria Especial Para PTC Contratados en 2013 y 2014.

References

[1] F. Ordikhani, A. Simchi, Appl. Surf. Sci. 317 (2014) 56–66.
[2] K.M. Kummer, E.N. Taylor, N.G. Durmas, K.M. Tarquinio, B. Ercan, T.J. Webster, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 101 (2013) 677–688.
[3] A. Winkel, W. Dempwolf, E. Gellermann, M. Sluszniak, S. Grade, W. Heuer, M. Eisenburger, H. Menzel, M. Stiesch, Int. J. Mol. Sci. 16 (2015) 4327–4342.
[4] A.M. Gallardo-Moreno, M.A. Pacha-Olivenza, M.-C. Fernández-Calderón, C. Pérez-Giraldo, J.M. Bruque, M.-L. González-Martín, Biomaterials 31 (2010) 5159–5168.
[5] M.A. Arenas, C. Perez-Jorge, A. Conde, E. Matykina, J.M. Hernandez-Lopez, R. Perez-Tanoira, J.J. de Damborenea, E. Gomez-Barrena, J. Esteba, Colloids Surf. B Biointerfaces 105 (2013) 106–112.
[6] W.Q. Yu, X.Q. Jiang, L. Xu, Y.F. Zhao, F.Q. Zhang, X. Cao, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 99 (2011) 207–216.
[7] S. Oh, C. Daraio, L.H. Chen, T.R. Pisanic, R.R. Finones, S. Jin, J. Biomed. Mater. Res. A 78 (2006) 97–103.
[8] K.S. Brammer, S. Oh, C.J. Cobb, L.M. Bjursten, H.v.d. Heyde, S. Jin, Acta Biomater. 5 (2009) 3215–3223.
[9] B. Ercan, E. Taylor, E. Alpaslan, T.J. Webster, Nanotechnology 22 (2011) 295102.
[10] C. Perez-Jorge, A. Conde, M.A. Arenas, R. Perez-Tanoira, E. Matykina, J.J. de Damborenea, E. Gomez-Barrena, J. Esteban, J. Biomed. Mater. Res. A 100 (2012) 1696–1705.
[11] E. Beltrán-Partida, B. Valdez-Salas, A. Escamilla, A. Moreno-Ulloa, L. Burtseva, E. Valdez-Salas, M. Curiel Alvarez, N. Nedev, J. Nanomater. 2015 (2015) 1–9.
[12] X.L. Liu, W.R. Zhou, Y.H. Wu, Y. Cheng, Y.F. Zheng, Mater. Sci. Eng. C 33 (2013) 4144–4154.
[13] L. Zhao, S. Mei, W. Wang, P.K. Chu, Z. Wu, Y. Zhang, Biomaterials 31 (2010) 2055–2063.
[14] S. Oh, K.S. Brammer, K.-S. Moon, J.-M. Bae, S. Jin, Mater. Sci. Eng. C 31 (2011) 873–879.
[15] M. Hirano, T. Kozuka, Y. Asano, Y. Kakuchi, H. Arai, N. Ohtsu, Appl. Surf. Sci. 311 (2014) 498–502.
[16] J.H. Park, R. Olivares-Navarrete, R.E. Baier, A.E. Meyer, R. Tannenbaum, B.D. Boyan, Z. Schwartz, Acta Biomater. 8 (2012) 1966–1975.
[17] C. Landa-Solis, D. Gonzalez-Espinosa, B. Guzman-Soriano, M. Snyder, G. Reyes-Teran, K. Torres, A.A. Gutierrez, J. Hosp. Infect. 61 (2005) 291–299.
[18] J. Medina-Tamayo, E. Sánchez-Miranda, H. Balleza-Tapia, X. Ambriz, M.E. Cid, D. González-Espinosa, A.A. Gutiérrez, C. González-Espinosa, Int. Immunopharmacol. 7 (2007) 1013–1024.
[19] S. Sekiya, K. Ohmori, K. Harii, Artif. Organs 21 (1997) 32–38.
[20] M.E. Velazquez-Meza, M. Hernandez-Salgado, M.A. Sanchez-Aleman, Microb. Drug Resist. (Larchmont, N.Y.) 21 (2015) 367–372.
[21] V. Zinkevich, I.B. Beech, R. Tapper, I. Bogdarina, J. Hosp. Infect. 46 (2000) 153–156.
[22] T.-Y. Chen, S.-H. Kuo, S.-T. Chen, D.-F. Hwang, Food Chem. 194 (2016) 529–537.
[23] R.M.S. Thorn, S.W.H. Lee, G.M. Robinson, J. Greenman, D.M. Reynolds, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 31 (2012) 641–653.
[24] E. Beltrán-Partida, A. Moreno-Ulloa, B. Valdez-Salas, C. Velasquillo, M. Carrillo, A. Escamilla, E. Valdez, F. Villarreal, Materials 8 (2015) 867–883.
[25] C. Yao, E.B. Slamovich, T.J. Webster, J. Biomed. Mater. Res. A 85 (2008) 157–166.
[26] G. Lan, M. Li, Y. Tan, L. Li, X. Yang, L. Ma, Q. Yin, H. Xia, Y. Zhang, G. Tan, C. Ning, J. Mater. Sci. Technol. 31 (2015) 182–190.
[27] C.J. Frandsen, K.S. Brammer, K. Noh, G. Johnston, S. Jin, Mater. Sci. Eng. C 37 (2014) 332–341.
[28] G. Bjerkan, E. Witso, K. Bergh, Acta Orthop. 80 (2009) 245–250.
[29] I. Yoda, H. Koseki, M. Tomita, T. Shida, H. Horiuchi, H. Sakoda, M. Osaki, BMC Microbiol. 14 (2014) 234.
[30] B. Ercan, T.J. Webster, Int. J. Nanomedicine 3 (2008) 477–485.
[31] K. Burns, C. Yao, T.J. Webster, J. Biomed. Mater. Res. A 88 (2009) 561–568.
[32] B. Ercan, K.M. Kummer, K.M. Tarquinio, T.J. Webster, Acta Biomater. 7 (2011) 3003–3012.
[33] R. Olivares-Navarrete, S.E. Rodil, S.L. Hyzy, G.R. Dunn, A. Almaguer-Flores, Z. Schwartz, B.D. Boyan, Biomaterials 51 (2015) 69–79.
[34] W. Att, N. Hori, F. Iwasa, M. Yamada, T. Ueno, T. Ogawa, Biomaterials 30 (2009) 4268–4276.
[35] Y. Han, D. Chen, J. Sun, Y. Zhang, K. Xu, Acta Biomater. 4 (2008) 1518–1529.
[36] S. Faghihi, F. Azari, A.P. Zhilyaev, J.A. Szpunar, H. Vali, M. Tabrizian, Biomaterials 28 (2007) 3887–3895.
[37] J.A. Wilkins, S. Lin, Cell 28 (1982) 83–90.
[38] G. Daculsi, P. Pilet, M. Cottrel, G. Guicheux, J. Biomed. Mater. Res. 47 (1999) 228–233.
[39] J.W. Lee, K.B. Lee, H.S. Jeon, H.K. Park, Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem. 27 (2011) 369.
[40] S.D. Puckett, E. Taylor, T. Raimondo, T.J. Webster, Biomaterials 31 (2010) 706–713.
[41] W.T. Lin, H.L. Tan, Z.L. Duan, B. Yue, R. Ma, G. He, T.T. Tang, Int. J. Nanomedicine 9 (2014) 1215–1230.
[42] H. Zhang, Y. Sun, A. Tian, X.X. Xue, L. Wang, A. Alquhali, X. Bai, Int. J. Nanomedicine 8 (2013) 4379–4389.
[43] T.E. Cloete, M.S. Thantsha, M.R. Maluleke, R. Kirkpatrick, J. Appl. Microbiol. 107 (2009) 379–384.

Materials **2015**, *8*, 867-883; doi:10.3390/ma8030867

OPEN ACCESS

materials

ISSN 1996-1944

www.mdpi.com/journal/materials

Article

Improved Osteoblast and Chondrocyte Adhesion and Viability by Surface-Modified Ti6Al4V Alloy with Anodized TiO_2 Nanotubes Using a Super-Oxidative Solution

Ernesto Beltrán-Partida [1,2,3,4,†], Aldo Moreno-Ulloa [3,5], Benjamín Valdez-Salas [2,†,*], Cristina Velasquillo [4], Monica Carrillo [2], Alan Escamilla [2], Ernesto Valdez [6] and Francisco Villarreal [3]

1 Facultad de Odontología Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Av. Zotoluca y Chinampas, s/n, Mexicali C.P. 21040, Baja California, Mexico; E-Mail: beltrane@uabc.edu.mx

2 Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. B. Juárez y Calle de la Normal s/n, Mexicali C.P. 21280, Baja California, Mexico; E-Mails: monica@uabc.edu.mx (M.C.); alan.escamilla@uabc.edu.mx (A.E.)

3 School of Medicine, University of California San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093, USA; E-Mails: aldiux_1@yahoo.com.mx (A.M.-U.); fvillarr@ucsd.edu (F.V.)

4 Instituto Nacional de Rehabilitación, Calz. México Xochimilco, No. 289, Arenal de Guadalupe, México C.P. 14389, D.F., Mexico; E-Mail: mvelasquillo@ciencias.unam.mx

5 Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón, México C.P. 11340, D.F., Mexico

6 Centro Medico Ixchel, Bravo y Obregón, Mexicali C.P. 21000, Baja California, Mexico; E-Mail: ixchelcentromedico@hotmail.com

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: benval@uabc.edu.mx; Tel./Fax: +52-686-566-4150.

Academic Editor: Carla Renata Arciola

Received: 12 December 2014 / Accepted: 17 February 2015 / Published: 2 March 2015

Abstract: Titanium (Ti) and its alloys are amongst the most commonly-used biomaterials in orthopedic and dental applications. The Ti-aluminum-vanadium alloy (Ti6Al4V) is widely used as a biomaterial for these applications by virtue of its favorable properties, such as high tensile strength, good biocompatibility and excellent corrosion resistance.

TiO_2 nanotube (NTs) layers formed by anodization on Ti6Al4V alloy have been shown to improve osteoblast adhesion and function when compared to non-anodized material. In his study, NTs were grown on a Ti6Al4V alloy by anodic oxidation for 5 min using a super-oxidative aqueous solution, and their *in vitro* biocompatibility was investigated in pig periosteal osteoblasts and cartilage chondrocytes. Scanning electron microscopy (SEM), energy dispersion X-ray analysis (EDX) and atomic force microscopy (AFM) were used to characterize the materials. Cell morphology was analyzed by SEM and AFM. Cell viability was examined by fluorescence microscopy. Cell adhesion was evaluated by nuclei staining and cell number quantification by fluorescence microscopy. The average diameter of the NTs was 80 nm. The results demonstrate improved cell adhesion and viability at Day 1 and Day 3 of cell growth on the nanostructured material as compared to the non-anodized alloy. In conclusion, this study evidences the suitability of NTs grown on Ti6Al4V alloy using a super-oxidative water and a short anodization process to enhance the adhesion and viability of osteoblasts and chondrocytes. The results warrant further investigation for its use as medical implant materials.

Keywords: titanium; TiO_2 nanotubes; chondrocyte; osteoblasts; adhesion; tissue engineering

1. Introduction

An imperative goal in bone and cartilage regeneration is the refinement of biomaterials with physicochemical and biological properties that better resemble the native architecture of human tissues to regenerate. Thus far, Ti and its alloys have frequently been used for dental and orthopedic implants because they offer good biocompatibility, low toxicity, corrosion resistance and favorable mechanical properties [1–8]. In this regard, the Ti6Al4V alloy offers superior physical and mechanical properties than commercially pure Ti (Cp-Ti), as well as excellent biocompatibility [9]. However, Ti- and its alloy-based implants occasionally loosen and fail [10]. Some of the factors that appear to lead to clinical failure are incomplete integration of the surrounding bone (*i.e.*, osseointegration) and cartilage with the material implanted [11,12]. Interestingly, it has been suggested that by improving the osseointegration on the material, long-term implant failures will decrease [13]. The manipulation of cell-surface material interactions can have a profound effect in osseointegration. To enhance this process, several techniques focused on the biomaterial surface have been investigated, such as grit blasting, acid etching, anodic oxidation, molecule immobilization, sol-gel and calcium phosphate coating [3,14–19]. It is well known that anodic oxidation has been shown to provide a strong adherence of an NTs layer to the material surface [20,21], increasing material corrosion resistance [22–24], surface area [25–27] and, more importantly, bone growth [25] and cartilage adhesion [22].

Various studies suggest that nanostructured biomaterials may provide physical/chemical properties that resemble the native bone structure and, thus, may offer ideal substrates to support bone regeneration [28]. It is worth noting that the NTs' diameter on the material surface has a significant effect on bone and cartilage integration [8,20,23]. For example, it has been reported that cultured preosteoblasts on NTs with a 70–100 nm diameter elicit good cell adhesion and selective

differentiation into osteoblast-like cells when compared to smaller NTs (~30 nm) [29]. Moreover, NTs of 70–100 nm in diameter exhibit higher alkaline phosphatase activity levels, suggesting greater bone-forming ability with a superior filopodia elongation than smaller NTs [30]. Filopodia are highly dynamic structures containing actin filaments [31]. They play an important role in osteoblasts adhesion and act as a sensory organelle for cellular spreading and actin polymerization [32,33]. Nonetheless, previous reports suggest that the anodization process using fluoride as an electrolyte to obtain NTs of 80–100 nm diameter requires periods of 1 h [34,35] and perhaps 2 h [20]. According to this fact, we hypothesize that using a fluoride solution dissolved in super-oxidative water will accelerate the fabrication of NTs, which, in turn, will positively impact adhesion, proliferation and viability of primary osteoblasts and chondrocytes.

To our knowledge, this is the first study aimed at fabricating and characterizing NTs on the Ti6Al4V surface by anodic oxidation using a novel short process constituted by a commercial super-oxidative water used for medical instrument disinfection [36,37], containing ammonium fluoride, and studying its biological effects on primary pig periosteal osteoblast (PPO) and elastic cartilage pig chondrocytes (PCC). Cell morphology was examined by SEM and AFM. Cell adhesion and viability were evaluated by means of fluorescence microscopy.

2. Results

2.1. Surface Characterization

2.1.1. SEM Material Characterization

The non-anodized Ti6Al4V alloy surface features are displayed in Figure 1a, which shows, as expected, the smooth texture of the material. Following electrolytic anodization, a nanotubular and uniformly distributed layer was formed over the Ti6Al4V alloy surface, as noted by SEM examination (Figure 1b). The estimated diameter of the nanotubes was between 80 and 90 nm.

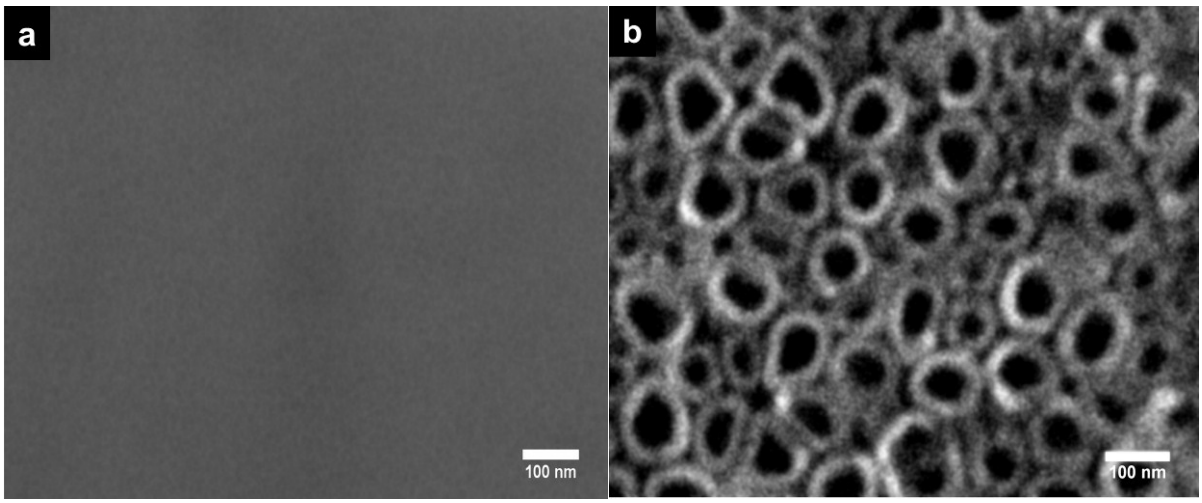


Figure 1. SEM micrographs of the experimental Ti6Al4V alloys. (**a**) Non-anodized flat Ti6Al4V alloy; (**b**) anodized Ti6Al4V alloy with NTs.

2.1.2. Chemical Composition

Chemical composition analysis suggests that NTs formed on the anodized Ti6Al4V alloy due to the presence of increased oxygen content compared to the non-anodized alloy (Table 1). There is some contamination of fluoride in the anodized alloy due to the electrolytes used for anodization.

Table 1. Surface elemental compositions.

Sample	C (%)	N (%)	Al (%)	Ti (%)	O (%)	F (%)
Anodized Ti6Al4V	3.9	-	5.40	61.91	25.51	3.28
Non-anodized Ti6Al4V	3.45	3.38	6.06	87.11	-	-

2.1.3. Surface Roughness

Representative AFM images of non-anodized and anodized Ti6Al4V alloys are shown in Figure 2. Non-anodized alloys show a flat and smooth surface compared to the anodize alloys (Figure 2a). Unfortunately, tube mouths could not be resolved, due to convolution with the probe tips used, which were not ultra-sharp; however, anodized alloy surfaces show increased roughness (Figure 2b), which is clearly associated with the tubular porous surface (represented by spots).

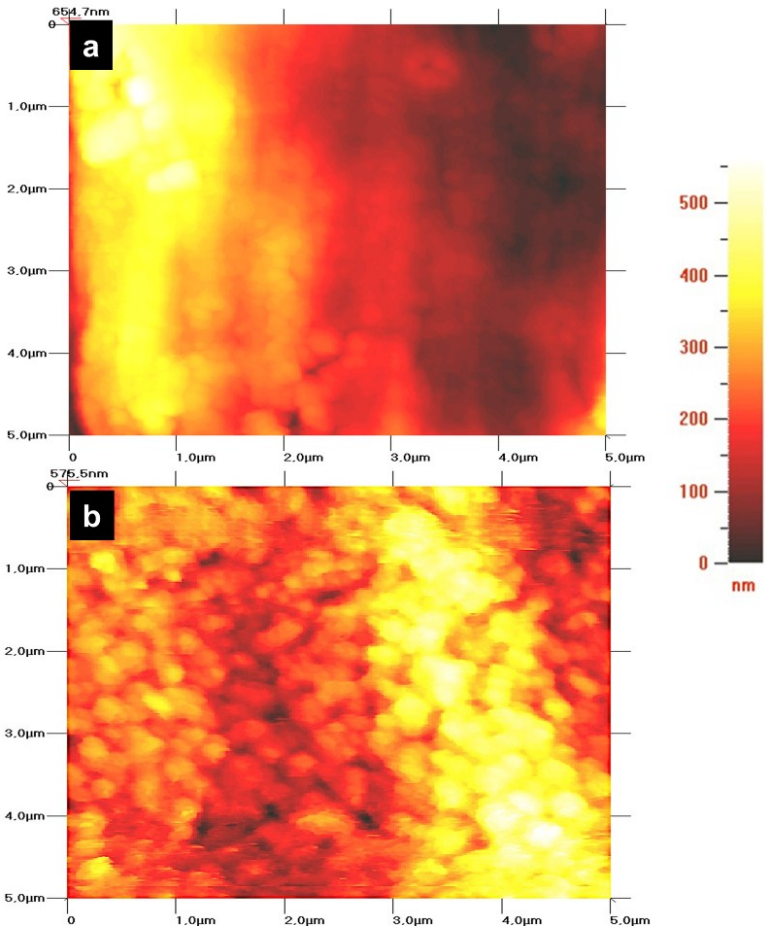


Figure 2. AFM micrographs of the Ti6Al4V alloy surface. (**a**) Non-anodized Ti6Al4V alloy, showing a smooth surface; (**b**) anodized Ti6Al4V alloy, showing a rougher surface. The scan area is 25 µm^2. The color bar represents the surface height.

2.2. Biological Activity

2.2.1. Biocompatibility Assay

PPO and PCC cellular viability was evaluated by using a live/dead staining kit (Figure 3). Representative fluorescence images of PCC cells grown on non-anodized and anodized alloy sheets for three days are shown in Figure 3a,b, respectively. After one and three days of PCC cell growth on anodized alloy, an increased percentage of live cells was observed when compared to the non-anodized alloy (Figure 3b,c). Moreover, in the non-anodized alloy, after three days of PCC cell growth, a lower number of live cells compared to the anodized alloy was observed, suggesting cell toxicity (Figure 3c). Significant differences were observed at Day 1 and 3 in the anodized alloy, suggesting greater PCC proliferation. Representative images of PPO cells after three days of growth on non-anodized and anodized alloys are shown in Figure 3d,e, respectively. The quantification of live PPO cells (Figure 3f) indicates a higher number of live PPO cells on the anodized alloy at both days as compared to the non-anodized material. Moreover, differences were observed in the live PPO cell percentage within the anodized alloy groups at Day 1 and Day 3, as observed for PCC analysis. In addition, the dead PPO cell number was increased on the non-anodized alloy compared to the anodized material, as observed in Figure 3d.

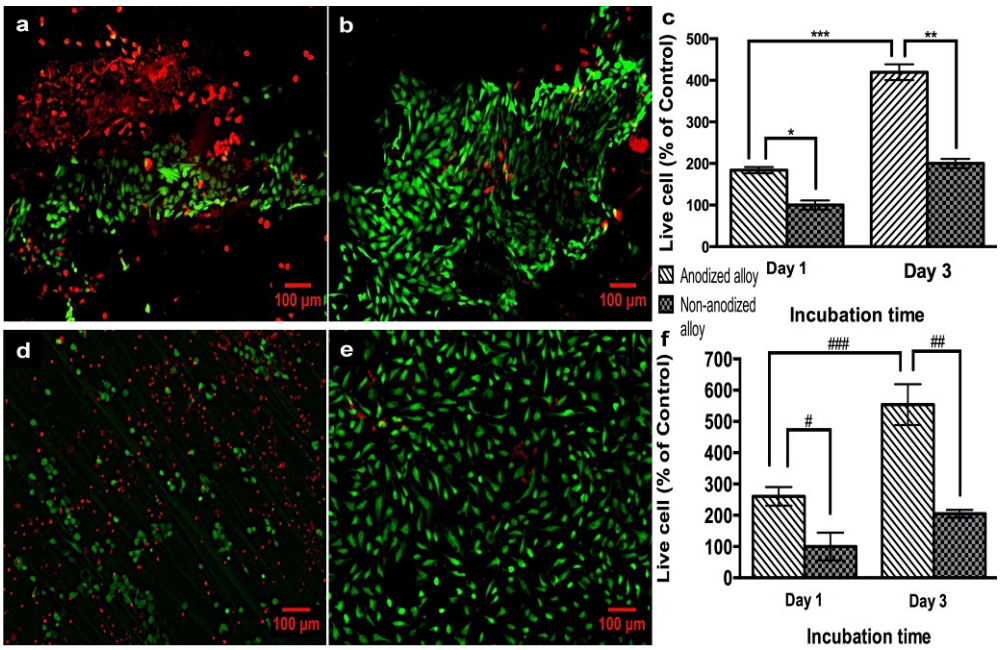


Figure 3. Live/dead staining of pig periosteal osteoblast (PPO) and pig cartilage chondrocytes (PCC) cells on the samples. (**a**) PCC cells on non-anodized Ti6Al4V alloy; (**b**) PCC cells on anodized Ti6Al4V alloy; (**c**) cell counting of live PCC cells; (**d**) PPO on the non-anodized Ti6Al4V alloy; (**e**) PPO on anodized Ti6Al4V alloy; (**f**) cell counting of live PPO cells. (Values are the mean ± SD, n = 3; * $p < 0.05$ and $^{\#}$ $p < 0.05$, significantly different from non-anodized Ti6Al4V at Day 1 of cell growth; ** $p < 0.05$ and $^{\#\#}$ $p < 0.05$, significantly different from non-anodized Ti6Al4V at Day 3 of cell growth; *** $p < 0.05$ and $^{\#\#\#}$ $p < 0.05$, significantly different from anodized Ti6Al4V at Day 3. All the images are the same magnification. The bar is 100 µm).

2.2.2. Cell Adhesion

The cell adhesion results of PPO grown on non-anodized and anodized Ti6Al4V alloys are illustrated in Figure 4a. The data show increased PPO cell number on the anodized alloy compared to the non-anodized material at both days of culture. Figure 4b indicates the PCC cell number at 2 h and 4 h of cell growth on the non-anodized and anodized alloys. The data show an increased cell adhesion on the anodized material at both times of culture when compared to the non-anodized alloy.

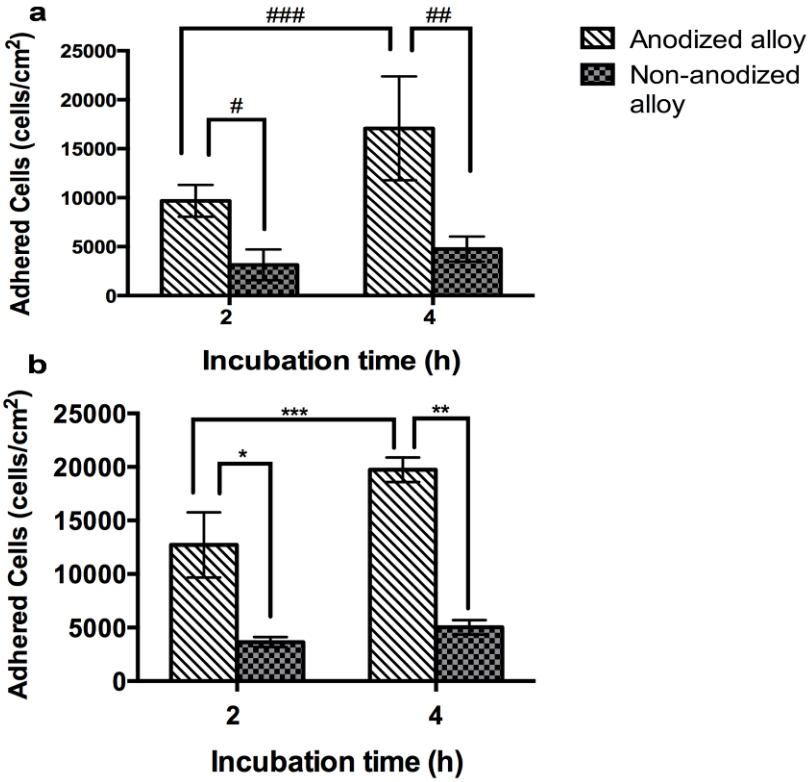


Figure 4. Cell counting using nuclei (DAPI) staining for PPO and PCC cells. (**a**) PPO and (**b**) PCC adhesion. (Values are the mean ± SD, n = 3; $^{\#}$ $p < 0.05$ and * $p < 0.05$, significantly different from non-anodized Ti6Al4V alloy at 2 h of cell growth; $^{\#\#}$ $p < 0.05$ and ** $p < 0.05$, significantly different from non-anodized Ti6Al4V at 4 h of cell growth; $^{\#\#\#}$ $p < 0.05$ and *** $p < 0.05$, significantly different from anodized Ti6Al4V at 4 h).

2.2.3. Cell Morphology by SEM

Figure 5 shows images of PPO cells at three days grown on non-anodized and anodized Ti6Al4V alloys. On the non-anodized alloy, PPO cells show a flatter appearance, elongated spread (which denotes a fibroblast like shape) (Figure 5b) and lower intercellular connections compared to cells on the nanostructured Ti6Al4V material (Figure 5a). Moreover, the anodized material enhanced the osteoblast-like morphology, which indicates a greater number of cellular interconnections, and anchored filopodia to the material surface (Figure 5c). Additionally, the filopodia morphology observed on the anodized alloy had a very dense fibril-type form, which was lacking in cells grown on the non-anodized alloy (Figure 5d). The PCC morphology analyzed after three days in culture on the alloys is presented in Figure 6. On the anodized material, PCC cells (Figure 6a) present a greater

number of intercellular connections and an elongated filopodia formation compared to the non-anodized material (Figure 6b). Moreover, at higher magnification, cell bodies can be observed with an increased number of cellular filopodia anchored to the nanostructured material surface (Figure 6c) *vs.* the translucent and thinner filopodia present on the non-anodized material (Figure 6d). Interestingly, on the non-anodized and anodized alloy, a similar cellular polygonal shape is observed, although the cell density is higher on the nanostructured surface material.

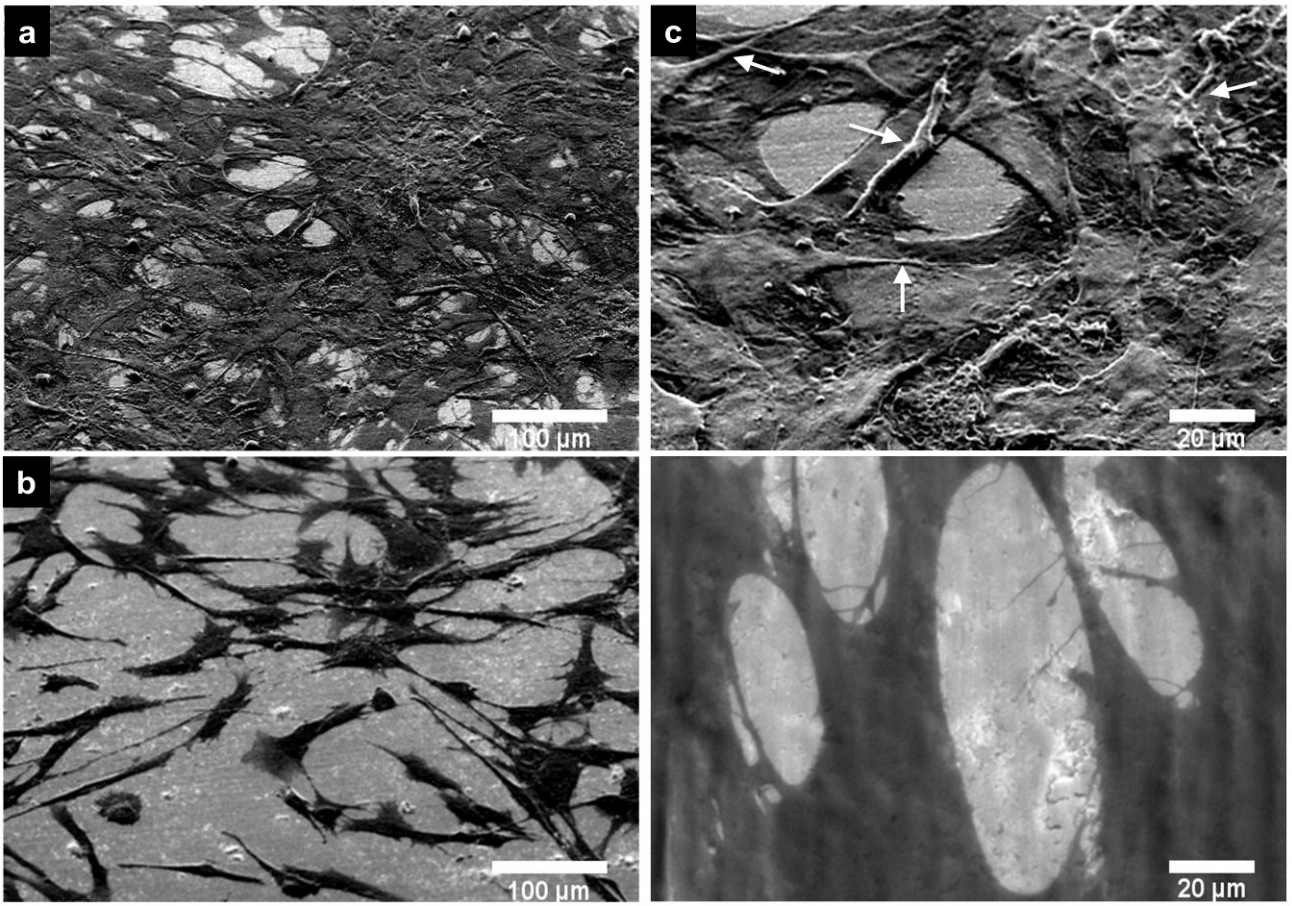


Figure 5. SEM micrographs of PPO cells at Day 3 of cell growth on the Ti6Al4V alloys. (**a**) PPO on anodized Ti6Al4V alloy; (**b**) PPO on non-anodized Ti6Al4V alloy; (**c**) PPO on anodized Ti6Al4V alloy (high magnification); (**d**) PPO on the non-anodized Ti6Al4V alloy (high magnification). White arrows denote filopodia.

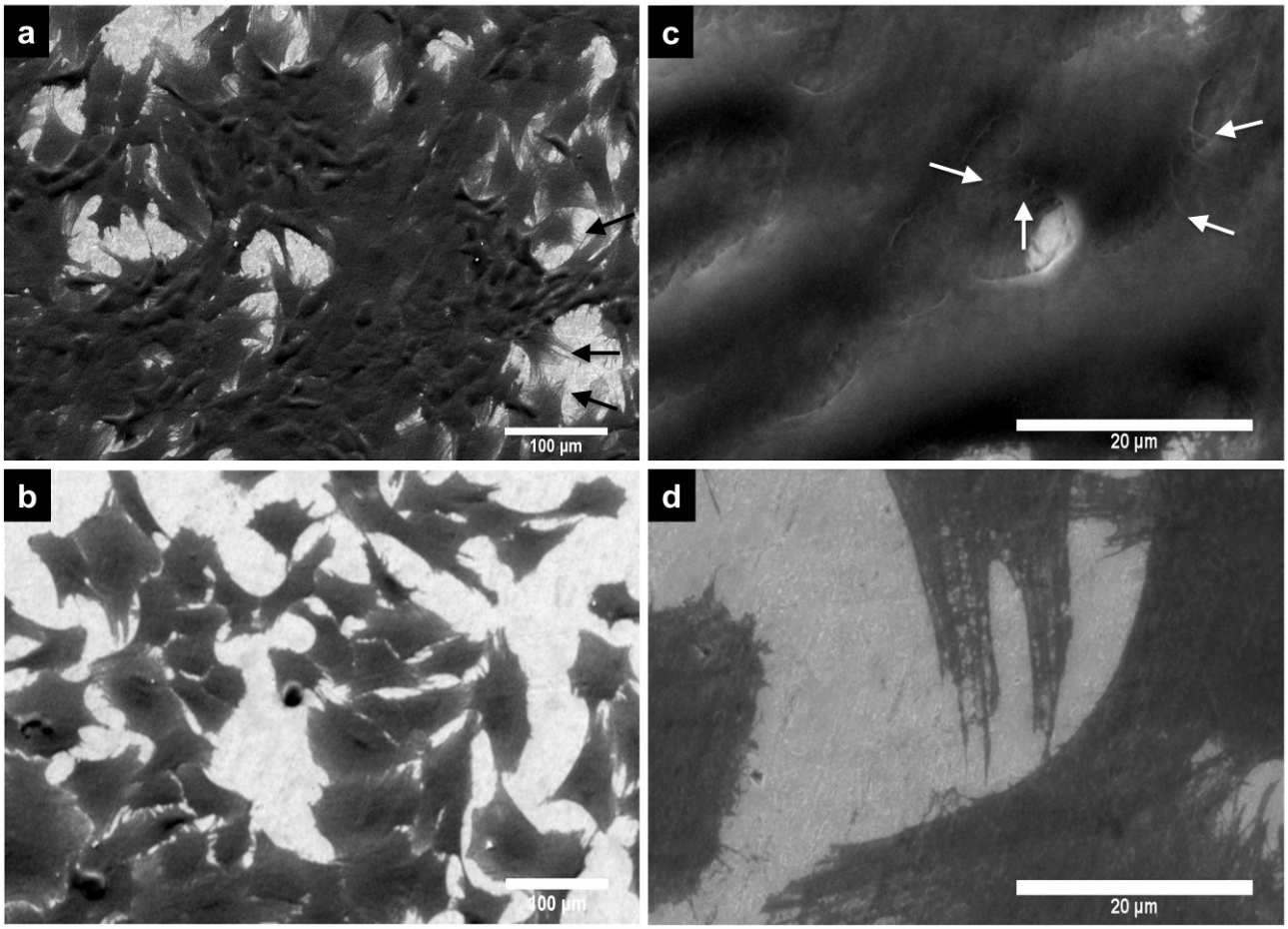


Figure 6. SEM images of PCC cell at Day 3 of cell growth on the Ti6Al4V alloys. (**a**) PCC on anodized Ti6Al4V alloy; (**b**) PCC on the non-anodized Ti6Al4V alloy; (**c**) PCC on anodized Ti6Al4V alloy (high magnification); (**d**) PCC on the non-anodized Ti6Al4V alloy (high magnification). White arrows denote filopodia.

2.2.4. Cell Morphology by AFM

The PPO and PCC cell morphology after three days in culture on the anodized alloys are displayed in Figure 7. PPO cells cultured on the nanostructured material show the evident formation of filopodia (green dotted arrow) anchored to the material surface (Figure 7a), which indicates an evident morphological modification that denotes a fibril-type form (associated with cellular filopodia) compared to the uniform tubular porous (white dotted circles). Figure 7b shows morphological alterations, suggesting a monolayer-like morphology (blue dotted arrow) around the material surface.

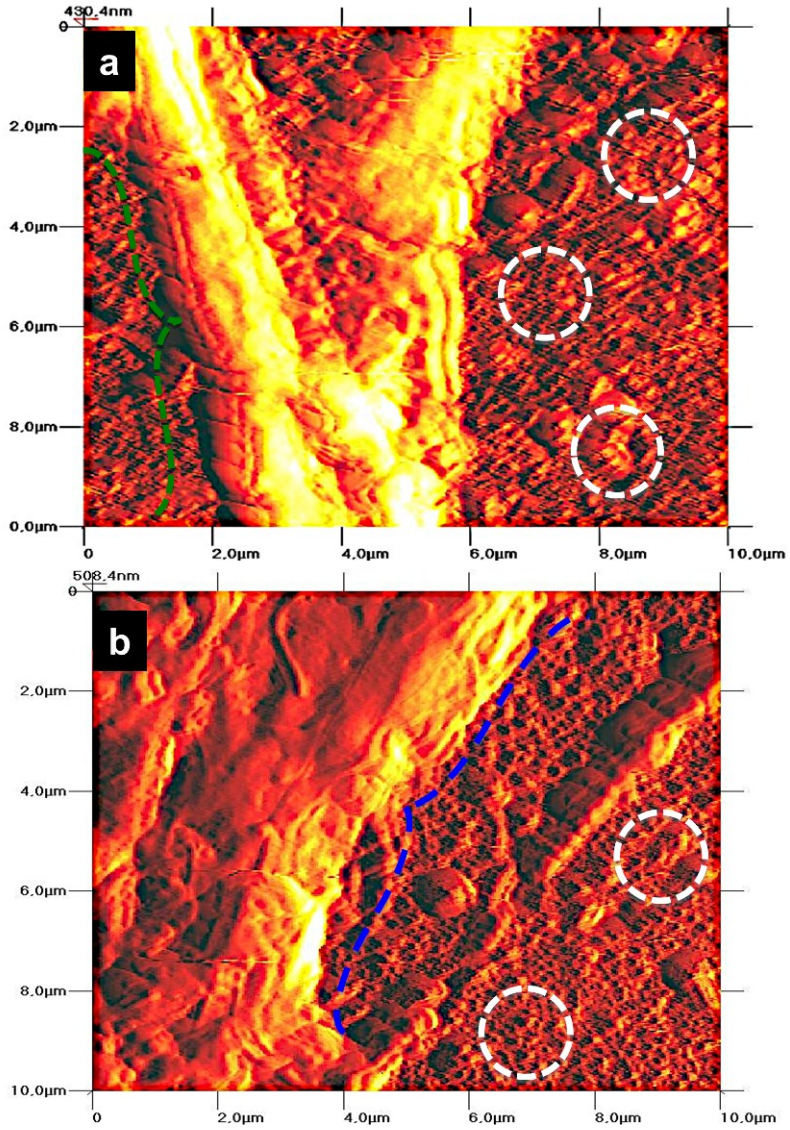


Figure 7. AFM micrographs for PPO and PCC cells at Day 3 of cell growth on anodized Ti6Al4V alloy. (**a**) PPO; (**b**) PCC. (The green dashed arrow indicates cellular filopodia; the blue dashed arrow indicates monolayer-like morphology; circles represent the NTs' surface).

3. Discussion

Enhancing tissue development around grafts is a process that involves adhesion, proliferation, secretion of extracellular matrix (ECM) proteins and mineralization for bone formation [5]. It is well known that the interaction between cells in our body and the ECM is necessary for optimal cell function and support [25]. Interestingly, this communication between the cells and the ECM is suggested to potentially occur at a nanoscale level. Indeed, nanostructured surface materials have been suggested to impact cell physiology in the same manner as the natural ECM [38]. Specifically, various studies have reported that nanostructured surface modifications on Ti and its alloys exhibit enhanced effects on cell adhesion, proliferation and bone formation, which, as a consequence, results in good osseointegration [39,40].

Thus far, Ti has been the most studied biomaterial with surface modifications, specifically NTs' effects on osteoblast cell biology *in vitro*. However, the effects of NTs on Ti6Al4V alloy built by

anodization using a commercial super-oxidative water with fluoride have not been investigated. Using this novel electrolyte allows us to obtain 80 nm NTs with just only 5 min of anodization (Figure 1b) with similar morphology as reported by Wang *et al.*, who anodized for 1 h [34], and Narayanan *et al.* for 2 h [20] with fluoride and deionized water as the electrolyte. Moreover, Yao *et al.* reported that using 0.5% HF and 20 V, a nanotube-like structure appeared between 2 and 5 min of anodization and was completely observed at 20 min [35], while here, we observed the NT's morphology in 5 min, probably due to the presence of the oxidative components that, with fluoride, synergistically act, promoting a faster oxidation, which leads to a nanostructured morphology.

In a recent study, Stan *et al.* suggested that NTs on Ti6Al4V alloy enhanced G292 osteoblast cell growth when compared to anodized Ti6Al7Nb alloy [41]. Likewise, in another study, Saharudin *et al.* suggested that NTs on Ti6Al4V alloy increased PA6 cell adhesion and viability when compared to the non-anodized material [42]. Therefore, considering the aforementioned enhanced cellular response on nanostructured Ti6Al4V alloy and the improved corrosion resistance, as well as wear resistance, we investigated the biological effects that our NTs grown on Ti6Al4V alloy have on cell adhesion and viability.

In agreement with the aforementioned studies on nanostructured Ti6Al4V alloy, we have evidenced that our NTs enhance PPO cell adhesion. Importantly, osteoblast cell adhesion on the material surface is necessary for promote bone building [38]. However, adhered cells on the material surface do not suffice as a good indication of proper osseointegration; also, viable osteoblasts are necessary to sustain the functionality during regeneration and eventually integrate into the host tissue [43]. Indeed, our results also suggest increased osteoblast cell viability at one day and three days of culture on the anodized alloy compared to the non-anodized material, suggesting a higher number of osteoblasts capable of interacting and perhaps integrating in the long term with the material. A possible explanation for the increased osteoblast adhesion and viability is that NTs increase the surface area and decreased the wettability [2,30,44], a property widely observed for NTs obtained by anodization, which, in turn, may promote an elevated attachment of ions, small molecules and proteins, enhancing a higher cell-cell interaction via ECM proteins and, thereby, anchoring a major number of cellular filopodia to the nanostructured surface [29,45–47]. Filopodia act as a partial regulator of cell adhesion, proliferation and cell-cell interactions [48] and have been associated with increased alkaline phosphatase activity and a superior rate of Ca and P secreted by osteoblasts cultured on NTs, as reported by others [30,49]. This notion is supported based on our findings that show a greater number of cellular interconnections and a higher number of anchored cellular filopodia on the NTs (Figure 5a,c); whereas, the osteoblasts grown on the non-anodized material have poor cellular interconnections, flat and spread elongation, which denotes a fibroblast-like shape, decreased dissemination, and lack filopodia propagation (Figure 5b,d), suggesting concordance with previous reports [30,38]. Besides, it is well documented that NTs have increased surface roughness, a property observed in this study (Figure 2), which elicits increased osteoblast adhesion, proliferation and a well-supported osteoblast-like morphology, as reported in various studies [30,44,46].

During endochondral bone formation, chondrocytes promote mineralization, which, in turn, serves as a template for bone deposition [50]. On the other hand, the inability of chondrocytes to adhere and consequently create new cartilage tissue on the biomaterial used for regenerative purpose has remained a considerable problem [51]. Despite the important role that chondrocytes have in bone and cartilage

regeneration, only a few reports exist addressing this point in nanomaterial research. A study by Burns *et al.* reported the effects that nanotubular-anodized Ti has on human articular chondrocytes, whereby he suggested increased cell adhesion at 4 h of cell culture on NTs [22]. Moreover, Brammer *et al.* described enhanced glycosaminoglycan secretion, as well as increased collagen II transcription levels for chondrocytes incubated on anodized Ti [23]. Here, we evidence not only increased chondrocyte cell adhesion, but also cell viability at Day 1 and Day 3 of cell growth on anodized Ti6Al4V alloy. Furthermore, a superior number of intercellular connections and filopodia are observed in chondrocytes cultured on NTs (Figure 6a,b), while on non-anodized alloy, we found a flat cellular morphology and decreased number of filopodia anchored to the material surface (Figure 6b,d), as suggested in earlier studies [23,52].

It is worth noting that the dimension of anodized nanotubes varies between the scientific literature and, so, the biological effects on cells. Brammer *et al.* suggested that NTs with a diameter between 70 and 100 nm evoke increased elongated MC3T3-E1 (mouse osteoblast) cellular morphology, nuclei and alkaline phosphatase activity, suggesting greater bone-forming capability when compared to NTs with smaller diameters [30]. Li *et al.* evidenced that 70 nm diameter NTs grown on Ti by anodic oxidation enhanced MC3T3-E1 cell adhesion and proliferation at four and seven days of culture compared to non-anodized and nanopore-based Ti [27]. Moreover, Smith *et al.* provided evidence that NTs grown on Ti with an average diameter of 70–90 nm showed the highest human dermal fibroblasts and human epidermal keratinocyte adhesion and viability at four days in culture when compared to non-anodized Ti [53]. Our results provide further evidence that our 80 nm diameter NTs grown on Ti6Al4V alloy have considerable beneficial effects on osteoblast cell adhesion and viability, when compared to non-anodized alloy. Furthermore, our data suggest that our nanostructured surface increases the chondrocyte cell adhesion, proliferation and viability. Overall, this study provides evidence of anodic oxidation using super-oxidative water as a means to grow NTs on Ti6Al4V alloy and its increased biocompatibility on chondrocyte and osteoblast cells. Nonetheless, more research is needed in order to extrapolate these findings to *in vivo* experiments as a means to develop new materials capable of supporting bone and cartilage growth.

4. Experimental Section

4.1. Synthesis of NTs

Discs of Ti6Al4V (ASTM F-136; Supra Alloys Inc., Camarillo, CA, USA) with a 1.5 cm^2 surface area were polished using SiC emery paper (100 to 2000 grit) and 1 micron alumina for finishing. Mirror finish disc surfaces were mounted in a special flat 125 mL cell and electrolytically anodized using Microdacyn 60 super-oxidative water (Oculus Technologies, Guadalajara, JAL, Mexico) at pH 6.8, containing 35.7 mg/L sodium hypochlorite (NaOCl), 25.2 mg/L hypochlorous acid (HClO), 100 mg/L sodium chloride (NaCl) and 10 mg/L ammonium fluoride (NH_4F Sigma Aldrich). A 20 V potential was applied using a DC power supply for 5 minutes and a platinum mesh as the counter electrode. The process was carried out at room temperature. Finally, the discs were cleaned in an ultrasonic bath with distilled water for 5 minutes to eliminate residues of fluoride salts [35], rinsed with isopropyl alcohol and dried in a desiccator for 12 h. Non-anodized Ti6Al4V alloy discs were used as a control.

4.2. Substrate Surface Characterization

4.2.1. SEM

The structural morphology of anodized and non-anodized Ti6Al4V alloy were examined by SEM (JSM-6010LA, JEOL, Peabody, MD, USA); the images were taken at a 15 kV accelerating voltage.

4.2.2. EDX

Surface chemical compositions of anodized and non-anodized Ti6Al4V alloy were assessed using EDX (JSM-6010LA, JEOL) with a Silicon Drift Detector, connected to the SEM.

4.2.3. AFM

AFM (Quesant Q-Scope 350, AMBIOS, Agura Hills, CA, USA) was used to evaluate the surface roughness of the anodized and non-anodized Ti6Al4V alloy. The process was performed at room temperature and ambient conditions; using an anti-acoustic box to prevent noises, which can affect measurements. Topographic images were obtained by operating the instrument in the contact mode. A 40-µm X-Y and 4-µm Z scanner equipped with silicon tips and 10 nm tip curvature were used. The experiment scan area was 25 μm^2.

4.3. Biological Activity

4.3.1. Cell Culture

PPO cells were obtained from pig femur periosteal bone. PCC cells were isolated from pig cartilage ear. The cells were cultured in DMEM-F12 (1:1) (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Ham's F-12, Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco-Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco-Invitrogen) at 37 °C in 5% CO_2. The culture media were changed every 3 days. The cells were seeded on the anodized and non-anodized Ti6Al4V alloys at a cell density of 25,000 cells/cm^2, previously collocated in 12-well plates. Cells were grown for 1 and 3 days for subsequent biological analysis. To confirm chondrocyte phenotype, immunofluorescence of collagen type II was performed (data not shown). All experiments were conducted with cells at 1st–3rd passage to avoid loss of phenotype.

4.3.2. Cell Viability

Cell viability was evaluated after 3 days of PPO and PCC cell growth using a live/dead viability/cytotoxicity assay kit (Molecular Probes; Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). This method is based on the determination of living and dead cells by two analyses: calcein-AM for esterase activity and ethidiumhomodimer-1 for plasma membrane integrity [54,55]. In brief, cells were incubated with a mixture of 1 mM calcein-AM and 2 mg/mL ethidium homodimer-1 for 45 min at 37 °C. Thereafter, specimens were inverted onto glass slides with fluorescence mounting medium (DAKO, Agilent Technologies, Carpinteria, CA, USA), examined and photographed using a green (live) and red (dead) filter under a fluorescence microscope (Axio Observer A1, Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA).

At least five fields of view were imaged at random, and cells were analyzed with the AxionVision software.

4.3.3. Cell Adhesion

PPO and PCC cell adhesion was evaluated by fluorescence microscopy after 2 and 4 h of cell growth. At this time, non-adhered cells were removed by rinsing with phosphate buffered saline (PBS). Thereafter, cells were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) for 5 min at room temperature and then washed with PBS. Finally, samples were inverted onto cover slips, mounted, visualized and photographed using a blue filter by a fluorescence microscope (Axio Observer A1, Carl Zeiss). Cell number was obtained from five random fields using a fluorescence microscope (Axio Observer A1, Carl Zeiss).

4.3.4. Cell Morphology by SEM

After 3 days, cells on the anodized and non-anodized Ti6Al4V alloy were fixed with 5% (w/v) glutaraldehyde (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 2 h at 25 °C. After fixation, they were washed three times with PBS (10 min) each wash. Then, cells were dehydrated in grade series of alcohol (50%, 70%, 90% and 100%) for 30 min at each concentration. Finally, samples were sputter-coated with gold (50 nm gold layer) for 8 s. The morphology of PCC and PPO cells was observed under SEM.

4.3.5. Cell Morphology by AFM

Following 3 days of PPO and PCC cell growth on the anodized alloy, AFM was also used to analyze cell morphology because of its high-resolution probe with an acceptable resolution in the sub-nanometer range [56]. The cells were examined by visual scanning at 1 Hz over a 100 μm^2 region at a scale angle of 0°. All experiments were conducted at room temperature and ambient conditions over a 20 to 30 min period.

4.4. Statistical Analysis

Three independent experiments were performed, each in triplicate. Numerical data were analyzed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The significance of differences between group means was determined using two-tailed unpaired Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test when appropriate. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Acknowledgments

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-CVU 348737, 114359) for a PhD scholarship. The authors would like to thank Julieta Garcia (Instituto Nacional de Rehabilitación, Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa) for her technical support.

Author Contributions

The process design, experimental work and writing of the first draft of the manuscript were all carried out by Ernesto Beltrán-Partida and Benjamín Valdez-Salas. Alan Escamilla collaborated with the anodization process. Aldo Moreno-Ulloa and Francisco Villarreal worked on the draft corrections. Monica Carrillo and Ernesto Valdez contributed with constructive suggestions. Benjamín Valdez-Salas and Cristina Velasquillo supervised every step of the entire work.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* **2000**, *21*, 667–681.
2. Hao, Y.Q.; Li, S.J.; Hao, Y.L.; Zhao, Y.K.; Ai, H.J. Effect of nanotube diameters on bioactivity of a multifunctional titanium alloy. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, *268*, 44–51.
3. Chen, Z.X.; Takao, Y.; Wang, W.X.; Matsubara, T.; Ren, L.M. Surface characteristics and *in vitro* biocompatibility of titanium anodized in a phosphoric acid solution at different voltages. *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, doi:10.1088/1748-6041/4/6/065003.
4. Tavangar, A.; Tan, B.; Venkatakrishnan, K. Synthesis of bio-functionalized three-dimensional titania nanofibrous structures using femtosecond laser ablation. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2726–2732.
5. Das, K.; Bose, S.; Bandyopadhyay, A. TiO_2 nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell-materials interaction. *J Biomed. Mater. Res A* **2009**, *90*, 225–237.
6. Chiapasco, M.; Gatti, C. Implant-retained mandibular overdentures with immediate loading: A 3- to 8-year prospective study on 328 implants. *Clin. Implant Dent. Relat Res.* **2003**, *5*, 29–38.
7. Rosa, A.L.; Beloti, M.M. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. *Clin. Oral Implants Res.* **2003**, *14*, 43–48.
8. Sun, S.; Yu, W.; Zhang, Y.; Zhang, F. Increased preosteoblast adhesion and osteogenic gene expression on TiO_2 nanotubes modified with KRSR. *J Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 1079–1091.
9. Giordano, C.; Saino, E.; Rimondini, L.; Pedeferri, M.P.; Visai, L.; Cigada, A.; Chiesa, R. Electrochemically induced anatase inhibits bacterial colonization on Titanium Grade 2 and Ti6Al4V alloy for dental and orthopedic devices. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *88*, 648–655.
10. Junker, R.; Dimakis, A.; Thoneick, M.; Jansen, J.A. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: A systematic review. *Clin. Oral Implants Res.* **2009**, *20*, 185–206.
11. Qu, D.; Mosher, C.Z.; Boushell, M.K.; Lu, H.H. Engineering complex orthopaedic tissues via strategic biomimicry. *Ann. Biomed. Eng.* **2014**, doi:10.1007/s10439-014-1190-6.
12. Grenier, S.; Donnelly, P.E.; Gittens, J.; Torzilli, P.A. Resurfacing damaged articular cartilage to restore compressive properties. *J. Biomech.* **2014**, *48*, 122–129.
13. Sundfeldt, M.; Carlsson, L.V.; Johansson, C.B.; Thomsen, P.; Gretzer, C. Aseptic loosening, not only a question of wear: A review of different theories. *Acta Orthop.* **2006**, *77*, 177–197.

14. Liu, H.Y.; Wang, X.J.; Wang, L.P.; Lei, F.Y.; Wang, X.F.; Ai, H.J. Effect of fluoride-ion implantation on the biocompatibility of titanium for dental applications. *Appl. Surf. Sci.* **2008**, *254*, 6305–6312.
15. Advincula, M.C.; Petersen, D.; Rahemtulla, F.; Advincula, R.; Lemons, J.E. Surface analysis and biocorrosion properties of nanostructured surface sol-gel coatings on Ti6Al4V titanium alloy implants. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2007**, *80*, 107–120.
16. Gao, Y.; Gao, B.; Wang, R.; Wu, J.; Zhang, L.J.; Hao, Y.L.; Tao, X.J. Improved biological performance of low modulus Ti-24Nb-4Zr-7.9Sn implants due to surface modification by anodic oxidation. *Appl. Surf. Sci.* **2009**, *255*, 5009–5015.
17. Zheng, C.Y.; Nie, F.L.; Zheng, Y.F.; Cheng, Y.; Wei, S.C.; Valiev, R.Z. Enhanced *in vitro* biocompatibility of ultrafine-grained biomedical NiTi alloy with microporous surface. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 9086–9093.
18. Le Guéhennec, L.; Soueidan, A.; Layrolle, P.; Amouriq, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent. Mater.* **2007**, *23*, 844–854.
19. Xiao, S.J.; Textor, M.; Spencer, N.D.; Wieland, M.; Keller, B.; Sigrist, H. Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1997**, *8*, 867–872.
20. Narayanan, R.; Lee, H.-J.; Kwon, T.-Y.; Kim, K.-H. Anodic TiO_2 nanotubes from stirred baths: Hydroxyapatite growth & osteoblast responses. *Mater. Chem. Phys.* **2011**, *125*, 510–517.
21. Cao, X.; Yu, W.Q.; Qiu, J.; Zhao, Y.F.; Zhang, Y.L.; Zhang, F.Q. RGD peptide immobilized on TiO_2 nanotubes for increased bone marrow stromal cells adhesion and osteogenic gene expression. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 527–536.
22. Burns, K.; Yao, C.; Webster, T.J. Increased chondrocyte adhesion on nanotubular anodized titanium. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, *88*, 561–568.
23. Brammer, K.S.; Oh, S.; Frandsen, C.J.; Varghese, S.; Jin, S. Nanotube surface triggers increased chondrocyte extracellular matrix production. *Mater. Sci. Eng. C* **2010**, *30*, 518–525.
24. Narayanan, R.; Mukherjee, P.; Seshadri, S.K. Synthesis, corrosion and wear of anodic oxide coatings on Ti-6Al-4V. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 779–786.
25. Christenson, E.M.; Anseth, K.S.; van den Beucken, J.J.; Chan, C.K.; Ercan, B.; Jansen, J.A.; Laurencin, C.T.; Li, W.J.; Murugan, R.; Nair, L.S.; *et al*. Nanobiomaterial applications in orthopedics. *J. Orthop. Res.* **2007**, *25*, 11–22.
26. Tsuchiya, H.; Macak, J.M.; Muller, L.; Kunze, J.; Muller, F.; Greil, P.; Virtanen, S.; Schmuki, P. Hydroxyapatite growth on anodic TiO_2 nanotubes. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *77*, 534–541.
27. Li, B.; Li, Y.; Li, J.; Fu, X.; Li, H.; Wang, H.; Xin, S.; Zhou, L.; Liang, C.; Li, C. Influence of nanostructures on the biological properties of Ti implants after anodic oxidation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2014**, *25*, 199–205.
28. Liu, H.; Webster, T.J. Mechanical properties of dispersed ceramic nanoparticles in polymer composites for orthopedic applications. *Int. J. Nanomed.* **2010**, *5*, 299–313.
29. Oh, S.; Brammer, K.S.; Li, Y.S.; Teng, D.; Engler, A.J.; Chien, S.; Jin, S. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2130–2135.
30. Brammer, K.S.; Oh, S.; Cobb, C.J.; Bjursten, L.M.; van de Heyde, H.; Jin, S. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO_2 nanotube surface. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 3215–3223.

31. Faix, J.; Breitsprecher, D.; Stradal, T.E.B.; Rottner, K. Filopodia: Complex models for simple rods. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 1656–1664.
32. Altmann, B.; Löchner, A.; Swain, M.; Kohal, R.-J.; Giselbrecht, S.; Gottwald, E.; Steinberg, T.; Tomakidi, P. Differences in morphogenesis of 3D cultured primary human osteoblasts under static and microfluidic growth conditions. *Biomaterials* **2014**, *35*, 3208–3219.
33. Mellor, H. The role of formins in filopodia formation. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, *1803*, 191–200.
34. Wang, L.; Zhao, T.T.; Zhang, Z.; Li, G. Fabrication of highly ordered TiO_2 nanotube arrays via anodization of Ti-6Al-4V alloy sheet. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10*, 8312–8321.
35. Yao, C.; Slamovich, E.B.; Webster, T.J. Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *85*, 157–166.
36. Méndez-Durán, A. Eficacia y seguridad del uso de solución de superoxidación en la prevención de infecciones relacionadas con diálisis. *Diálisis Trasplante* **2013**, *34*, 160–165. (In Spanish)
37. Gonzalez-Espinosa, D.; Perez-Romano, L.; Guzman-Soriano, B.; Arias, E.; Bongiovanni, C.M.; Gutierrez, A.A. Effects of pH-neutral, super-oxidised solution on human dermal fibroblasts *in vitro*. *Int. Wound J.* **2007**, *4*, 241–250.
38. Brammer, K.S.; Frandsen, C.J.; Jin, S. TiO_2 nanotubes for bone regeneration. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 315–322.
39. Balasundaram, G.; Webster, T.J. A perspective on nanophase materials for orthopedic implant applications. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 3737–3745.
40. Minagar, S.; Wang, J.; Berndt, C.C.; Ivanova, E.P.; Wen, C. Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *101*, 2726–2739.
41. Stan, M.S.; Memet, I.; Fratila, C.; Krasicka-Cydzik, E.; Roman, I.; Dinischiotu, A. Effects of titanium-based nanotube films on osteoblast behavior *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2014**, *103*, 48–56.
42. Saharudin, K.A.; Sreekantan, S.; Abd Aziz, S.N.; Hazan, R.; Lai, C.W.; Mydin, R.B.; Mat, I. Surface modification and bioactivity of anodic Ti6Al4V alloy. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, *13*, 1696–1705.
43. Swami, N.; Cui, Z.W.; Nair, L.S. Titania nanotubes: Novel nanostructures for improved osseointegration. *J. Heat Trans.-Trans. ASME* **2011**, *133*, doi:10.1115/1.4002465.
44. Kim, S.Y.; Kim, Y.K.; Park, S., II; Jin, G.C.; Bae, T.S.; Lee, M.H. Effect of alkali and heat treatments for bioactivity of TiO_2 nanotubes. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *321*, 412–419.
45. Blau, A. Cell adhesion promotion strategies for signal transduction enhancement in microelectrode array *in vitro* electrophysiology: An introductory overview and critical discussion. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2013**, *18*, 481–492.
46. Tan, A.W.; Ismail, R.; Chua, K.H.; Ahmad, R.; Akbar, S.A.; Pingguan-Murphy, B. Osteogenic potential of *in situ* TiO_2 nanowire surfaces formed by thermal oxidation of titanium alloy substrate. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *320*, 161–170.
47. Tan, A.W.; Pingguan-Murphy, B.; Ahmad, R.; Akbar, S.A. Review of titania nanotubes: Fabrication and cellular response. *Ceram. Int.* **2012**, *38*, 4421–4435.
48. Lee, J.W.; Lee, K.B.; Jeon, H.S.; Park, H.K. Effects of surface nano-topography on human osteoblast filopodia. *Anal. Sci.* **2011**, *27*, doi:10.2116/analsci.27.369.

49. Frandsen, C.J.; Brammer, K.S.; Noh, K.; Johnston, G.; Jin, S. Tantalum coating on TiO_2 nanotubes induces superior rate of matrix mineralization and osteofunctionality in human osteoblasts. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *37*, 332–341.
50. Adams, S.L.; Cohen, A.J.; Lassova, L. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *213*, 635–641.
51. Mobasheri, A.; Kalamegam, G.; Musumeci, G.; Batt, M.E. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas* **2014**, *78*, 188–198.
52. Tan, A.W.; Dalilottojari, A.; Pingguan-Murphy, B.; Ahmad, R.; Akbar, S. *In vitro* chondrocyte interactions with TiO_2 nanofibers grown on Ti-6Al-4V substrate by oxidation. *Ceram. Int.* **2014**, *40*, 8301–8304.
53. Smith, B.S.; Yoriya, S.; Johnson, T.; Popat, K.C. Dermal fibroblast and epidermal keratinocyte functionality on titania nanotube arrays. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2686–2696.
54. Hong, Y.; Yu, M.; Weng, W.; Cheng, K.; Wang, H.; Lin, J. Light-induced cell detachment for cell sheet technology. *Biomaterials* **2013**, *34*, 11–18.
55. Sasagawa, T.; Shimizu, T.; Sekiya, S.; Haraguchi, Y.; Yamato, M.; Sawa, Y.; Okano, T. Design of prevascularized three-dimensional cell-dense tissues using a cell sheet stacking manipulation technology. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1646–1654.
56. Kim, Y.S.; Kim, K.S.; Han, I.; Kim, M.H.; Jung, M.H.; Park, H.K. Quantitative and qualitative analysis of the antifungal activity of allicin alone and in combination with antifungal drugs. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0038242.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Hindawi Publishing Corporation
Journal of Nanomaterials
Volume 2015, Article ID 818565, 9 pages
http://dx.doi.org/10.1155/2015/818565

Research Article

The Promotion of Antibacterial Effects of Ti6Al4V Alloy Modified with TiO_2 Nanotubes Using a Superoxidized Solution

Ernesto Beltrán-Partida,[1,2] Benjamin Valdez-Salas,[2] Alan Escamilla,[2] Aldo Moreno-Ulloa,[3,4] Larysa Burtseva,[2] Ernesto Valdez-Salas,[5] Mario Curiel Alvarez,[2] and Nicola Nedev[2]

[1] *Facultad de Odontología Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Avenida Zotoluca y Chinampas, s/n, 21040 Mexicali, BC, Mexico*
[2] *Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Boulevard B. Juárez y Calle de la Normal s/n, 21280 Mexicali, BC, Mexico*
[3] *University of California San Diego, School of Medicine, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093, USA*
[4] *Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón, 11340 México, DF, Mexico*
[5] *Centro Medico Ixchel, Bravo y Obregón, 21000 Mexicali, BC, Mexico*

Correspondence should be addressed to Benjamin Valdez-Salas; benval@uabc.edu.mx

Received 18 February 2015; Revised 9 April 2015; Accepted 20 April 2015

Academic Editor: P. Davide Cozzoli

Copyright © 2015 Ernesto Beltrán-Partida et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The purpose of the present study was to synthetize 80 nm diameter TiO2 nanotubes (NTs) on Ti6Al4V alloy using a commercially superoxidized water (SOW) enriched with fluoride to reduce anodization time and promote the antibacterial efficacy against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). The alloy discs were anodized for 5 min and as a result, NTs of approximately 80 nm diameters were obtained with similar morphology as reported in previous studies using longer anodization times (1-2 h). Filed emission-scanning electron microscopy (FE-SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) were used to characterize the materials surfaces. The NTs showed significantly decreased *S. aureus* viability after 1, 3, and 5 days of culture in comparison to nonanodized alloy. Likewise, SEM analysis also suggested lower bacterial adhesion on the NTs surface. No differences in bacterial morphology and topography were observed on both materials, as analyzed by SEM and atomic force microscopy (AFM). In conclusion, 80 nm diameter NTs were grown on Ti6Al4V alloy in 5 min by using a SOW solution enriched with fluoride, which resulted in a material with promoted antibacterial efficacy against *S. aureus* for up to 5 days of in vitro culture when compared to nonanodized alloy.

1. Introduction

Despite strict sterilization procedures biomaterials associated infection (BAI) is a common complication associated with any implanted biomaterial [1]. Once infection arises, bacteria tend to aggregate into a polymeric matrix forming a biofilm on the biomaterial surface, which is difficult for the host defense and antimicrobial therapy to destroy [2, 3]. Such BAI may lead to removal of the implant, revision surgery, and even amputation, all of which are associated with high medical costs [4, 5]. One of the most common causes of BAI is related to *S. aureus*, which has become an important protagonist in metallic materials, bone joints, orthopedic implants, and soft tissue infections [6–11]. Therefore, there is the need for biomaterials with improved antibacterial properties in order to increase the success of dental and orthopedic implants.

Bacterial adhesion to the implanted material is known to be the first and most critical step in the pathogenesis of the infection, in part because nonadhered bacteria are rapidly phagocytized by the immune system [12, 13]. Thus, prevention of bacterial adhesion exerts a fundamental role in preventing the implant infection [14]. Currently, bacterial infection has been safeguarded through the chemoprophylactic use of antimicrobial agents before surgery, primarily when they are systematically administered and in some cases even locally released from the biomaterial. Nevertheless, this latter

strategy has important limitations such as the rapid release of the adsorbed antibiotic, antibiotics resistance, or systemic toxicity [12, 13, 15].

Another important strategy for inhibiting the bacterial adhesion and development of biofilm is by means of modifying the material surface properties. Surface modification techniques tailor the surface chemistry and topography of the biomaterial, which affects microbial colonization [13]. Different procedures have been developed to modify the chemical composition and/or the topography of the biomaterial surface such as surface functionalization with antibacterial copolymers, UV irradiation, or peptide immobilization, therefore inhibiting bacterial adhesion in a favorable manner [16–18].

Metal-based biomaterials such as titanium (Ti) and its alloys are widely used for orthopedic and dental applications due to their favorable mechanical properties, corrosion resistance, and biocompatibility [2, 19]. In this regard, the Ti6Al4V alloy offers superior physical and mechanical properties compared to commercially pure Ti (CP-Ti), as well as excellent biocompatibility [20]. Among the surface modification techniques to fabricate nanostructural coatings, anodic oxidation is a well-known process that provides a strong adhered NTs layer to the material surface [21, 22], increasing its corrosion resistance [23, 24], surface area [25], hydrophilicity [26], and more importantly biocompatibility [27]. Nonetheless, previous reports suggest that the anodization process using fluoride with distilled water as an electrolyte to obtain NTs of 80–100 nm diameter requires period of 1 h [28, 29] and perhaps 2 h [21]. Moreover, various studies suggest that Ti alloy surfaces modified with a nanostructured coating could decrease bacterial adhesion; that is, Ercan et al. showed that amorphous NTs treated with electrical stimulation could decrease *S. aureus* after 2 days of culture [30]; Grigorescu et al. suggest that TiZr NTs grown for 2 h by anodization reduce *Escherichia coli* (*E. coli*) after 18 h of incubation [31]. Furthermore, Puckett et al. reported an increased number of dead *S. aureus* bacteria on amorphous NTs after 1 h of cultivation [26], suggesting that a nanostructured surface may provide antibacterial properties decreasing bacterial adhesion [6, 32]. According to this fact, we hypothesize that a metallic biomaterial implant improved with NTs coating fabricated using a SOW solution used for disinfection of medical devices [33, 34] and enriched with fluoride will enhance its antibacterial effects, decreasing BAI.

In this work we synthetized for the first time 80 nm NTs on Ti6AlV4 alloy by anodic oxidation using a commercially available superoxidized water solution enriched with fluoride and ethylene glycol. Moreover, we also used UV and SOW for NTs sterilization and we explored its antibacterial effects comparing those of nonanodized alloy. The materials surface was characterized by FE-SEM and the chemical composition by EDX. The *S. aureus* viability on the materials surface was assessed by colony-forming unit (CFU) calculation. Adhered bacteria and topography were also evaluated by SEM and AFM, respectively.

2. Materials and Methods

2.1. Materials for NTs Synthesis. Ti6Al4V alloy (ASTM F136-02) discs with a 150 mm^2 surface area from Supra Alloys Inc. (Camarillo, California, USA) were used. Microdacyn 60, commercially available superoxidized water with the following composition, sodium (<55 ppm) and chloride (<80 ppm), was obtained from Oculus Technologies (Mexico, Mexico). Ammonium fluoride powder (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO) and ethylene glycol (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO) were purchased and used as received.

2.2. Synthesis of NTs. Ti6Al4V alloy discs were polished using SiC emery paper (100 to 2000 grit) and 1-micron alumina was used for finishing. The samples were subsequently cleaned by sonication in water, acetone, and ethanol for 5 min each [31]. Next, mirror finished disc surfaces were mounted on a flat 125 mL cell and then electrolytically anodized using Microdacyn 60 at pH 6.8, containing 10 mg/L of NH_4F and 20% ethylene glycol. A 20 V potential was applied using a DC power supply for 5 minutes and a platinum mesh as a counter electrode. The process was carried out at 24°C. Finally, discs were cleaned in an ultrasonic bath (Transsonic 570 Elma) at 300 W with distilled water for 5 minutes to eliminate the excess of fluoride salts, rinsed with isopropyl alcohol, and then dried in a desiccator for 12 hours. No thermal treatment was applied after the cleaning process and a nonanodized alloy was used as a control.

2.3. Surface Characterization of the Samples. The structural morphology of anodized and nonanodized Ti6Al4V alloys was characterized using FE-SEM (Tescan LYRA 3, Brno, Czech Republic); the images were taken at a 15 and 20 kV accelerating voltage. The chemical composition of the alloys surface was examined using EDX (JSM-6010LA, JEOL, Tokyo, Japan) with a silicon drift detector, coupled to the SEM.

2.4. Bacterial Cell Culture. For the bacterial growth experiments, *S. aureus* (Strain American Type Culture Collection 25923, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) which has been shown to be a good biofilm former and capable of producing mature biofilms after only 24 hours was used [6, 30]. For the preparation of the inoculums, the strain was freshly grown overnight on tryptic soy agar (TSA) plates (Beckton Dickinson, Sparks, Maryland, USA). Discrete colonies were obtained from TSA plates and suspended in tryptic soy broth (TSB) to an optical density (O.D.) of 0.3, pH 7.0, assessed using a spectrophotometer (LAMBDA 25, Perkin Elmer, Connecticut, USA). All experimental specimens were sterilized using ultraviolent (UV) irradiation for 30 minutes each side [35] and rinsed with SOW for 1 h.

2.5. Bacterial Viability on the Samples. For the determination of viable cells on the samples, 100 μL of *S. aureus* suspension containing approximately 1×10^7 CFU/mL (O.D. 0.3) plus 100 μL of fresh TSB was used to cover the material's surface. This inoculum was incubated on the specimens for 4 hours at

Table 1: Surface elemental composition by EDX analysis.

Surface	Atomic concentration (%)					
	C	V	Al	Ti	O	F
Non-anodized alloy	5.96	5.67	5.37	83.00	0.00	0.00
NTs	4.00	0.00	5.40	61.91	25.51	3.18

37°C to allow adhesion in a static model. Thereafter, 2 mL of warm TSB was deposited, and the incubation time continues for D1, D3, and D5. After the corresponding incubation days, the specimens were rinsed twice with phosphate saline buffer (PBS; pH 7.0) to remove any unbounded cells. The substrates were transferred into sterile conical tubes (Falcon, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) with 5 mL of fresh TSB medium. The tubes were placed in an ultrasonic bath and sonicated for 15 minutes at 120 W to release the attached cells from the biomaterial [36, 37]. Next the materials were removed and the remaining suspensions were diluted with PBS (pH 7.0) and cultured at 37°C for 24 hours in TSA plates. Bacterial viability was assessed by CFU counting in TSA plates. The above procedure was performed 20 times for each material [36]. The viability was expressed as $\log_{10}$ CFU/mL ± SD.

2.6. Bacterial Density and Morphology on the Samples by SEM. In order to determine the bacterial density and morphology at the end of each incubation period, the samples were prepared for SEM (JSM-6010LA, JEOL, Tokyo, Japan) analysis according to the following procedure: the discs were rinsed in PBS (pH 7.0) to wash away nonadhered bacteria and then fixed with 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO) in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) for 2 h at 25°C. Next, samples were washed three times with PBS (10 minutes each wash), dehydrated in a graded series of ethanol solutions (50, 60, 70, 80, 90, and 100% v/v), and finally sputter-coated with 10 nm gold layer for the analysis.

2.7. Bacterial Topography on the Samples by AFM. To assess any changes on bacteria's topography incubated on the materials, we used AFM analysis. However, we only analyzed D1 in order to obtain a more precise analysis of only a subset of bacteria's surface instead of layers of bacteria. Thus, following D1 of bacterial growth, the samples were prepared in the same way as for SEM, as described above [38]. A Quesant Q-Scope 350 AFM (AMBIOS, Agura Hills, California, USA) was used because of its high-resolution probe with an acceptable resolution in the subnanometer range [39]. The analyses were carried out at room temperature using an antiacoustic box to prevent noises, which can affect measurements. The system was operated in the contact mode, using a 40 μm X-Y and 4 μm Z scanner equipped with a silicon tip and 10 nm tip curvature. The scan speed was 0.5 Hz/sec. The experiment scan area was 25 μm^2.

2.8. Statistical Analysis. At least three independent experiments were performed, each in triplicate. Numerical data were analyzed using GraphPad Prism 6 (San Diego, California, USA). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey's test was used to determine statistical significance. A P value below 0.05 was considered statistically significant.

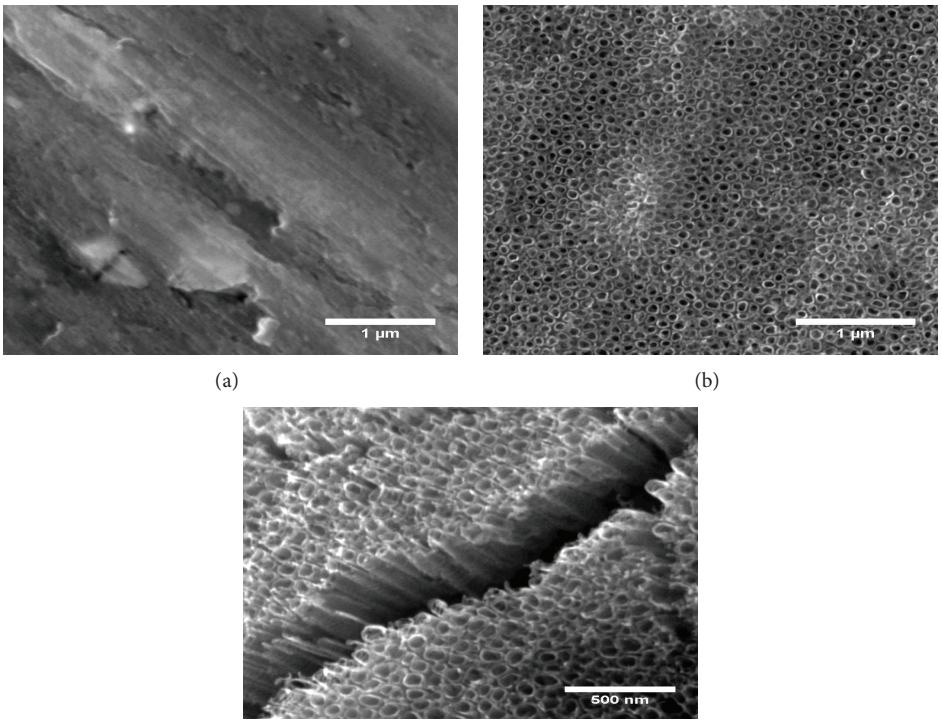
3. Results

3.1. Surface Characterization. Nonanodized Ti6Al4V alloy surface morphology is depicted in Figure 1(a), denoting a smooth texture as expected. Following anodization, a uniform layer of NTs was fabricated over the Ti6Al4V alloy surface, as observed in Figure 1(b). Cross section view is presented in Figure 1(c). The NTs diameter was estimated to be 80 nm and the length 380 nm.

The EDX analyses suggest the formation of NTs based on an increased percentage of oxygen in the chemical composition analysis compared to the nonanodized alloy (see Table 1). Moreover, a trace amount of fluoride can be detected on the NTs surface as shown by an increased percentage of fluoride content (Table 1).

3.2. Bacterial Viability on the Samples by CFU Analysis. The *S. aureus* viability on the samples is shown in Figure 2. At day 1 (D1) of bacterial incubation, the NTs showed 35.4% ($P < 0.05$) decreased viable bacteria when compared to nonanodized material. At day 3 (D3), the number of viable bacteria increased on both materials; nonetheless, a lower bacterial viability was observed on the NTs surface, that is, a 31.5% bacterial growth inhibition ($P < 0.05$) in comparison to the nonanodized material. Finally at day 5 (D5), the NTs surface showed 25% ($P < 0.05$) reduced viable bacteria compared to nonanodized alloy. Also, at D5 no significant changes in bacterial viability were observed compared to D3 on both samples.

3.3. Bacterial Density and Morphology on Samples by SEM. The morphology of the bacterial colonies on the anodized and nonanodized alloys did not vary, as tested by SEM (Figure 3). However, at D1 of incubation we detected an increased cellular colonization and agglomeration on the nonanodized alloy surface (Figure 3(a)) compared to the NTs (Figure 3(b)). At D3, the bacterial colonization increased in both samples (Figures 3(c) and 3(d)), despite being to a lower extent on the NTs surface (Figure 3(d)). Similarly, at D5 adhered bacteria were higher on the nonanodized alloy (Figure 3(e)) when compared to the NTs surface (Figure 3(f)); nevertheless, no apparent increase was found on bacterial density when compared to D3.



(a) (b) (c)

Figure 1: FE-SEM micrographs of the samples. The nonanodized and anodized Ti6Al4V alloy surfaces were characterized and compared. (a) Nonanodized alloy, (b) NTs, and (c) cross section view of NTs.

3.4. Bacterial Topography. The *S. aureus* topography after D1 of culture on anodized and nonanodized alloys is displayed in Figure 4. There were no apparent bacterial topographic changes on nonanodized (Figure 4(a)) and anodized alloys (Figure 4(b)). Thus, the bacterial topography was not altered by the NTs formed on the anodized alloy.

4. Discussion

Infections of dental and orthopedic devices are strongly associated with bacterial adhesion to the material surface [1, 40]. Once bacteria adhere to the material surface the colony proliferates forming a biofilm [14]. There are two stages involved in the mechanism of the biofilm formation. The first stage comprises the bacterial attachment to the surface by physicochemical interactions [3, 14], while in the second stage, there are cellular and molecular interactions between bacteria that provide an adequate environment for bacterial growth [3, 41]. Thus, according to this fact, by inhibiting the bacterial adhesion one could avoid the biofilm development and therefore reduce the probability of BAI. Previous investigations evaluating changes of bacterial adhesion on the surface of modified commercial implants have shown promising results; that is, Cochis et al. suggested decreased bacterial growth for up to 72 h using Ti surfaces grafted with gallium ions [42]; Jin et al. reported increased in vitro antibacterial performance of Zn/Ag nanoparticles immersed by plasma ion implantation on a Ti surface [43]. In this regard, implants with nanostructured surfaces have been widely investigated for their capacity to enhance the biocompatibility of orthopedic and dental materials, which may also have improved their antibacterial properties [44–47].

In the present study, we built self-organized and ordered NTs (80 nm of diameter) using a SOW containing fluoride by anodization on Ti6Al4V alloy surface, requiring just only 5 min of anodization to obtain similar morphology NTs as reported by Wang et al. who anodized Ti6Al4V for 1 h [28] and Narayanan et al. for 2 h [21] using fluoride and deionized water as electrolyte. This trend could be explained by the presence of the oxidized components that with fluoride synergistically may act promoting a faster oxidation which leads to a nanostructured morphology and significantly impacting the adhesion and colonization of *S. aureus* up to 5 days of incubation. As previously mentioned, the NTs were successfully obtained by the anodization process with traces of fluoride and a decrease in Al due to an increment of oxygen as illustrated by the EDX analysis (Table 1), data which are in accordance with previous reports [3, 26, 48].

Hitherto, the eradication of biofilms-associated infections on orthopedic and dental implants has been an elusive goal [49]. Several approaches have been undertaken to treat those infections, such as the prophylactic and prolonged use of antimicrobial therapy, as well as the use of biomaterials loaded with drugs [50, 51]. However, such options individually possess limitations due to antibiotic-resistance, fast delivery of the immobilized drug, and toxicity or failure that ultimately leads to removal of the implanted biomaterial

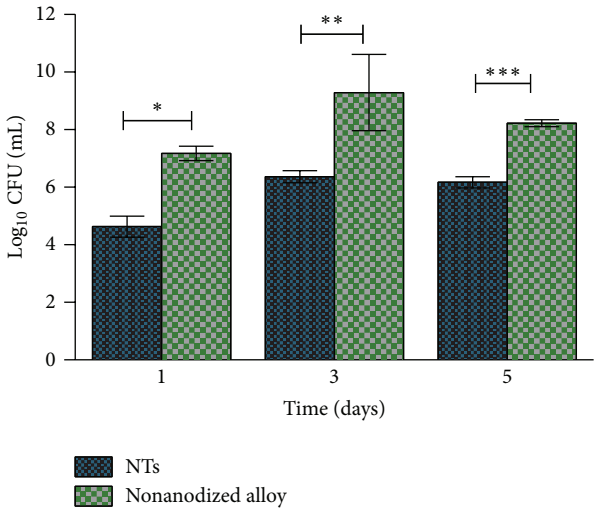


Figure 2: Viability evaluation of *S. aureus* incubated on nonanodized alloy and NTs discs after 1, 3, and 5 days of incubation. The bar graphs show the mean ± SD error bars, $N = 3$, $^{*}P < 0.05$ denotes significance between nonanodized alloy and NTs after 1 day, $^{**}P < 0.05$ indicates significance between nonanodized alloy and NTs after 3 days, and $^{***}P < 0.05$ illustrates significance between nonanodized alloy and NTs after 5 days of incubation.

[11, 52–54]. Therefore, in this study a surface modification on Ti6Al4V alloy was selected to fabricate NTs as an alternative to improve the resistance against bacterial adhesion and on the other hand to promote osteoblast biocompatibility leading to a successful osseointegration process as reported by others [3, 55, 56]. However, these methods require long anodization periods; for instance. Pérez-Jorge et al. described an anodizing method for the fabrication of amorphous NTs that takes a period of 1 h using fluoride as electrolyte in an aqueous solution, showing decreased bacterial adhesion when compared to nonanodized Ti [3]. Similarly, Wang et al. explored an anodization process of 1 h using fluoride dissolved in distilled water, which showed increased osteoblasts-like cells (SaOS2) biocompatibility [56]. Moreover, Portan et al. performed an electrochemical anodization method using distilled water and fluoride and reported enhanced human bone marrow cellular adhesion when compared to nonanodized Ti [55]. Here we report a rapid, simple, and easy anodization process for the synthesis of NTs. This process requires a short period of only 5 min, for fabrication of NTs similar to those obtained in the aforementioned reports. As suggested by the data, the NTs surface denoted a decreased bacterial viability as assessed by CFU counting for up to 5 days of culture as compared to the nonanodized Ti6Al4V alloy. Furthermore, the SEM analysis also suggested a decreased number of adhered cells on the NTs surfaces for the mentioned incubation periods, supporting the viability results. Recently Pérez-Jorge et al. suggested that NTs of 80 nm diameter on Ti limited the bacterial growth of *Staphylococcus epidermidis* (denoted here as *S. epidermidis*) more than Cp-Ti [3]. Moreover, Zhang et al. evaluated *S. aureus* adhesion on NTs and NTs incorporated with vancomycin, showing decreased adhesion after 6 h of culture for both surfaces as compared to Cp-Ti [57]. Possible explanations for such observed effects on the amorphous 80 nm NTs are the increased surface roughness and the decreased water contact angle, where the latter allows the dispersion of bacteria on the surface, thereby limiting its communication, protein deposition, and colonization [3, 13, 26, 30], a property widely observed on amorphous anodized NTs containing fluoride [3, 26, 30].

Previous studies evaluating the NTs surfaces reported an enhanced antibacterial activity after short times: 1 h [26], 4 h [58], and 24 h [30] of incubation with *S. aureus* and *S. epidermidis*. Nonetheless, here we report for the first time a reduction of viable bacteria up to 5 days of culture onto 80 nm NTs compared to nonanodized Ti6AlV4 alloy. The bacterial topography did not account for the observed antibacterial effects, since there were no changes on either bacterial morphology or topography. These results are in agreement with previous reports regarding the *S. aureus* morphology on anodized amorphous NTs [30]. Thus, we hypothesize that the presence of fluoride observed on the NTs may decrease the adhesion forces of *S. aureus*, thereby reducing its attachment without altering its topographical structure as suggested by others [59]. Perhaps, other factors that can contribute to the decrease of the bacterial viability are the contact with electrolyzed components (such as H_2O_2, oxidizing radicals, and chlorine molecules) from the SOW solution which could decrease the bacterial viability [33, 34] or the differences of the surface morphology (between nonanodized Ti6Al4V alloy and NTs) [26, 60]. Furthermore, Pérez-Jorge et al. compared the antibacterial effects of NTs with and without fluoride, suggesting that the presence of fluoride strongly decreased bacterial adhesion [3]. Ercan et al. suggested that anodized amorphous NTs with fluoride could decrease *S. aureus* growth for up to 2 days of bacterial culture when compared to heat-treated anodized NTs without fluoride [30]. In a previous work it was described that 80 nm diameter NTs negatively impact *S. aureus* and *S. epidermidis* viability when compared to nonanodized Ti and smaller diameter NTs (20 or 40 nm) [60]. Similarly, Puckett et al. depicted different bacterial behavior on nanorough, nanotextured, and nanotubular Ti and on nonanodized Ti, reporting an increased number of dead bacteria on anodized nanotubular Ti [26]. The aforementioned evidence clearly indicates that the material surface topography influences bacterial response to a biomaterial, where nanostructured surfaces may offer one of the best options to impede infections, as observed in the current study.

In addition, there are some in vitro reports indicating that NTs fabricated with fluoride could positively impact the biocompatibility, suggesting increased cell proliferation [23, 61], and in vivo osseointegration [62, 63]. Recently, we showed enhanced osteoblast and chondrocyte adhesion and viability on 80 nm NTs when compared to nonanodized alloy [64], thus evidencing that anodized 80 nm NTs fabricated with SOW not only offers excellent antibacterial efficiency but also importantly enhanced biocompatibility in comparison to nonanodized alloy.

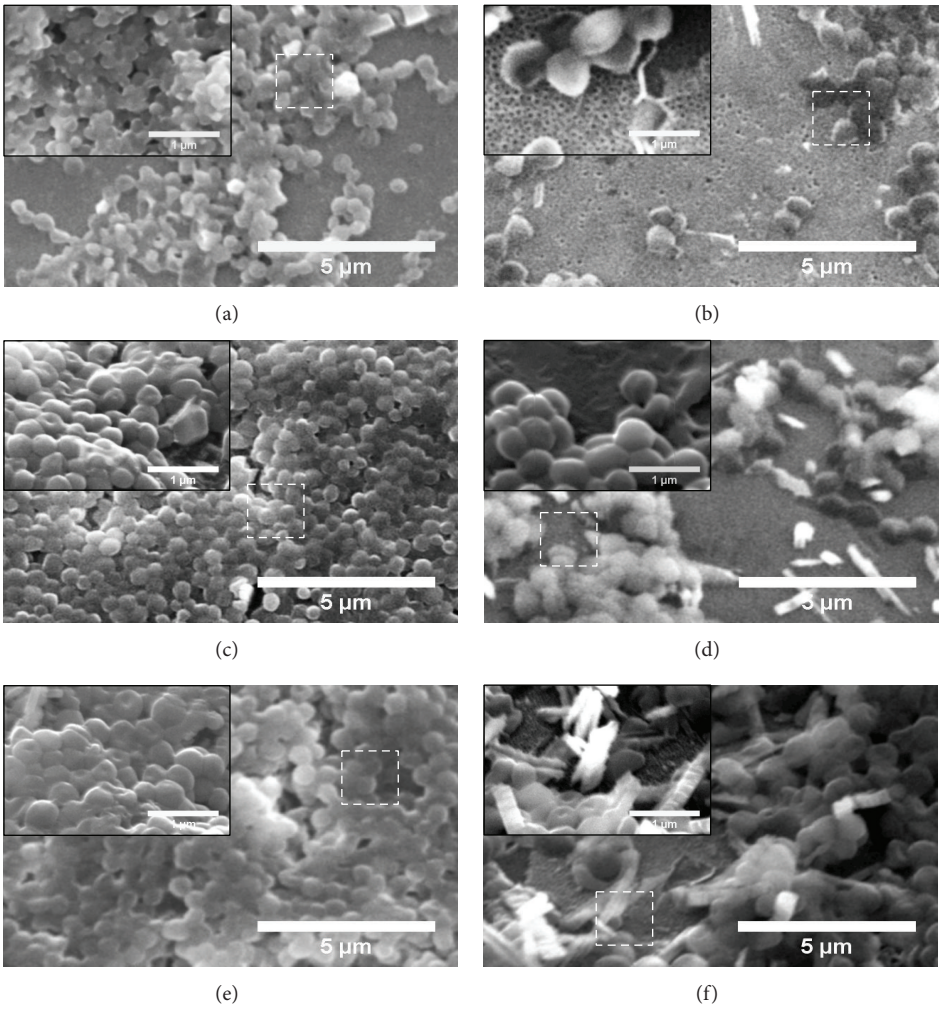


Figure 3: SEM micrographs of *S. aureus* adhered on the experimental substrates. (a) Nonanodized alloy and (b) NTs after D1; (c) nonanodized alloy and (d) NTs after D3; and (e) nonanodized alloy and (f) NTs after D5.

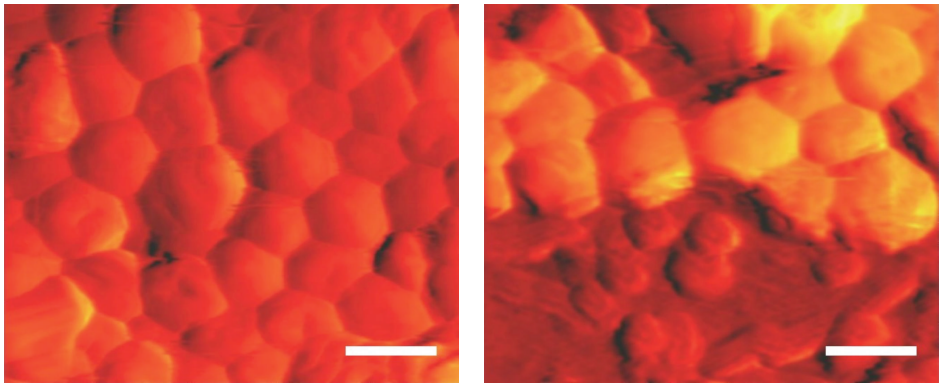


Figure 4: AFM images of *S. aureus* on the surfaces. Differences between bacterial topography were assessed at D1 of culture on the experimental samples. (a) Nonanodized alloy and (b) NTs. Scale bar is 5 μm.

All these results prove that anodization process can be performed using a SOW solution with fluoride as an electrolyte to dramatically reduce the time of anodization and to promote antibacterial properties. Most likely the observed effects are due to the presence of fluoride, the nanostructured surface morphology, and the oxidizing species of the SOW.

5. Conclusions

Surface modification of Ti6Al4V alloy with 80 nm diameter NTs obtained using SOW and fluoride as electrolyte enhances the antibacterial effects of the material against *S. aureus*. We suggest that bacterial inhibition of the NTs can be due to the presence of fluoride derived from the anodization process, modification of the surface morphology, and the oxidized species present in the SOW. The obtained results indicate that NTs fabricated by anodic oxidation using SOW solution enriched with fluoride can be used as a means for the development of biomedical implants with promoted antibacterial properties. However, more investigation regarding the interactions between *S. aureus* and NTs is required in order to corroborate those findings.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Ernesto Beltrán-Partida and Benjamin Valdez-Salas contributed equally to this work.

Acknowledgment

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-CVU 348737, 114359) for a Ph.D. scholarship.

References

[1] M. Riool, L. de Boer, V. Jaspers et al., "*Staphylococcus epidermidis* originating from titanium implants infects surrounding tissue and immune cells," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 12, pp. 5202–5212, 2014.

[2] M.-Y. Lan, C.-P. Liu, H.-H. Huang, and S.-W. Lee, "Both enhanced biocompatibility and antibacterial activity in Ag-decorated TiO_2 nanotubes," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 10, Article ID e75364, 2013.

[3] C. Pérez-Jorge, A. Conde, M. A. Arenas et al., "In vitro assessment of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus adhesion on TiO_2 nanotubes on Ti-6Al-4V alloy," *Journal of Biomedical Materials Research Part: A*, vol. 100, no. 7, pp. 1696–1705, 2012.

[4] K. M. D. Merollini, R. W. Crawford, and N. Graves, "Surgical treatment approaches and reimbursement costs of surgical site infections post hip arthroplasty in Australia: a retrospective analysis," *BMC Health Services Research*, vol. 13, article 91, 2013.

[5] K. J. Bozic, S. M. Kurtz, E. Lau et al., "The epidemiology of revision total knee arthroplasty in the united states," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 468, no. 1, pp. 45–51, 2010.

[6] J. Rivadeneira, A. L. Di Virgilio, M. C. Audisio, A. R. Boccaccini, and A. A. Gorustovich, "Evaluation of antibacterial and cytotoxic effects of nano-sized bioactive glass/collagen composites releasing tetracycline hydrochloride," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 116, no. 6, pp. 1438–1446, 2014.

[7] C. Soundrapandian, S. Datta, and B. Sa, "Drug-eluting implants for osteomyelitis," *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 24, no. 6, pp. 493–545, 2007.

[8] M.-T. Tsai, Y.-Y. Chang, H.-L. Huang, J.-T. Hsu, Y.-C. Chen, and A. Y.-J. Wu, "Characterization and antibacterial performance of bioactive Ti–Zn–O coatings deposited on titanium implants," *Thin Solid Films*, vol. 528, pp. 143–150, 2013.

[9] M. Mattioli-Belmonte, S. Cometa, C. Ferretti et al., "Characterization and cytocompatibility of an antibiotic/chitosan/cyclodextrins nanocoating on titanium implants," *Carbohydrate Polymers*, vol. 110, pp. 173–182, 2014.

[10] J. S. Moskowitz, M. R. Blaisse, R. E. Samuel et al., "The effectiveness of the controlled release of gentamicin from polyelectrolyte multilayers in the treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a rabbit bone model," *Biomaterials*, vol. 31, no. 23, pp. 6019–6030, 2010.

[11] M. Ma, M. Kazemzadeh-Narbat, Y. Hui et al., "Local delivery of antimicrobial peptides using self-organized TiO_2 nanotube arrays for peri-implant infections," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 100, no. 2, pp. 278–285, 2012.

[12] J. Esteban and J. Cordero-Ampuero, "Treatment of prosthetic osteoarticular infections," *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, vol. 12, no. 6, pp. 899–912, 2011.

[13] M. A. Arenas, C. Pérez-Jorge, A. Conde et al., "Doped TiO_2 anodic layers of enhanced antibacterial properties," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 105, pp. 106–112, 2013.

[14] J. D. Bryers, "Medical biofilms," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 100, no. 1, pp. 1–18, 2008.

[15] D. M. Livermore, "Has the era of untreatable infections arrived?" *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 64, no. 1, pp. i29–i36, 2009.

[16] A. M. Gallardo-Moreno, M. A. Pacha-Olivenza, L. Saldaña et al., "In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation," *Acta Biomaterialia*, vol. 5, no. 1, pp. 181–192, 2009.

[17] L. G. Harris, S. Tosatti, M. Wieland, M. Textor, and R. G. Richards, "*Staphylococcus aureus* adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(l-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers," *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4135–4148, 2004.

[18] R. R. Maddikeri, S. Tosatti, M. Schuler et al., "Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modified titanium surfaces: a first step toward cell selective surfaces," *Journal of Biomedical Materials Research Part: A*, vol. 84, no. 2, pp. 425–435, 2008.

[19] S. Ferraris, A. Venturello, M. Miola, A. Cochis, L. Rimondini, and S. Spriano, "Antibacterial and bioactive nanostructured titanium surfaces for bone integration," *Applied Surface Science*, vol. 31, pp. 279–291, 2014.

[20] C. Giordano, E. Saino, L. Rimondini et al., "Electrochemically induced anatase inhibits bacterial colonization on Titanium Grade 2 and Ti6Al4V alloy for dental and orthopedic devices,"

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, vol. 88, no. 2, pp. 648–655, 2011.

[21] R. Narayanan, H.-J. Lee, T.-Y. Kwon, and K.-H. Kim, "Anodic TiO_2 nanotubes from stirred baths: Hydroxyapatite growth & osteoblast responses," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 125, no. 3, pp. 510–517, 2011.

[22] X. Cao, W.-Q. Yu, J. Qiu, Y.-F. Zhao, Y.-L. Zhang, and F.-Q. Zhang, "RGD peptide immobilized on TiO_2 nanotubes for increased bone marrow stromal cells adhesion and osteogenic gene expression," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 23, no. 2, pp. 527–536, 2012.

[23] K. Burns, C. Yao, and T. J. Webster, "Increased chondrocyte adhesion on nanotubular anodized titanium," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 88, no. 3, pp. 561–568, 2009.

[24] R. Narayanan, P. Mukherjee, and S. K. Seshadri, "Synthesis, corrosion and wear of anodic oxide coatings on Ti-6Al-4V," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 18, no. 5, pp. 779–786, 2007.

[25] E. M. Christenson, K. S. Anseth, J. J. J. P. van den Beucken et al., "Nanobiomaterial applications in orthopedics," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 25, no. 1, pp. 11–22, 2007.

[26] S. D. Puckett, E. Taylor, T. Raimondo, and T. J. Webster, "The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment," *Biomaterials*, vol. 31, no. 4, pp. 706–713, 2010.

[27] K. Das, S. Bose, and A. Bandyopadhyay, "TiO_2 nanotubes on Ti: influence of nanoscale morphology on bone cell-materials interaction," *Journal of Biomedical Materials Research Part: A*, vol. 90, no. 1, pp. 225–237, 2009.

[28] L. Wang, T.-T. Zhao, Z. Zhang, and G. Li, "Fabrication of highly ordered TiO_2 nanotube arrays via anodization of Ti-6Al-4V alloy sheet," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 10, no. 12, pp. 8312–8321, 2010.

[29] C. Yao, E. B. Slamovich, and T. J. Webster, "Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures," *Journal of Biomedical Materials Research—Part A*, vol. 85, no. 1, pp. 157–166, 2008.

[30] B. Ercan, K. M. Kummer, K. M. Tarquinio, and T. J. Webster, "Decreased *Staphylococcus aureus* biofilm growth on anodized nanotubular titanium and the effect of electrical stimulation," *Acta Biomaterialia*, vol. 7, no. 7, pp. 3003–3012, 2011.

[31] S. Grigorescu, C. Ungureanu, R. Kirchgeorg, P. Schmuki, and I. Demetrescu, "Various sized nanotubes on TiZr for antibacterial surfaces," *Applied Surface Science*, vol. 270, pp. 190–196, 2013.

[32] G. Colon, B. C. Ward, and T. J. Webster, "Increased osteoblast and decreased Staphylococcus epidermidis functions on nanophase ZnO and TiO_2," *Journal of Biomedical Materials Research Part: A*, vol. 78, no. 3, pp. 595–604, 2006.

[33] C. Landa-Solis, D. González-Espinosa, B. Guzmán-Soriano et al., "Microcyn: a novel super-oxidized water with neutral pH and disinfectant activity," *Journal of Hospital Infection*, vol. 61, no. 4, pp. 291–299, 2005.

[34] M. Gunaydin, S. Esen, A. Karadag et al., "In vitro antimicrobial activity of Medilox super-oxidized water," *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 13, article 29, 2014.

[35] L. Zhao, S. Mei, W. Wang, P. K. Chu, Z. Wu, and Y. Zhang, "The role of sterilization in the cytocompatibility of titania nanotubes," *Biomaterials*, vol. 31, no. 8, pp. 2055–2063, 2010.

[36] I. Yoda, H. Koseki, M. Tomita et al., "Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion," *BMC Microbiology*, vol. 14, article 234, 2014.

[37] G. Bjerkan, E. Witso, and K. Bergh, "Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro," *Acta Orthopaedica*, vol. 80, no. 2, pp. 245–250, 2009.

[38] R. Nicholas, P. Dunton, A. Tatham, and L. Fielding, "The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental Listeria monocytogenes," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 115, no. 2, pp. 555–564, 2013.

[39] Y.-S. Kim, K. S. Kim, I. Han, M.-H. Kim, M. H. Jung, and H.-K. Park, "Quantitative and qualitative analysis of the antifungal activity of allicin alone and in combination with antifungal drugs," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 6, Article ID e38242, 2012.

[40] J. C. M. Souza, P. Ponthiaux, M. Henriques et al., "Corrosion behaviour of titanium in the presence of Streptococcus mutans," *Journal of Dentistry*, vol. 41, no. 6, pp. 528–534, 2013.

[41] Y. H. An and R. J. Friedman, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 43, no. 3, pp. 338–348, 1998.

[42] A. Cochis, B. Azzimonti, C. D. Valle, R. Chiesa, C. R. Arciola, and L. Rimondini, "Biofilm formation on titanium implants counteracted by grafting gallium and silver ions," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 103, no. 3, pp. 1176–1187, 2015.

[43] G. Jin, H. Qin, H. Cao et al., "Synergistic effects of dual Zn/Ag ion implantation in osteogenic activity and antibacterial ability of titanium," *Biomaterials*, vol. 35, no. 27, pp. 7699–7713, 2014.

[44] F. Wang, L. Shi, W.-X. He et al., "Bioinspired micro/nano fabrication on dental implant-bone interface," *Applied Surface Science*, vol. 265, pp. 480–488, 2013.

[45] N. Wang, H. Li, W. Lü et al., "Effects of TiO_2 nanotubes with different diameters on gene expression and osseointegration of implants in minipigs," *Biomaterials*, vol. 32, no. 29, pp. 6900–6911, 2011.

[46] L. M. Bjursten, L. Rasmusson, S. Oh, G. C. Smith, K. S. Brammer, and S. Jin, "Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 92, no. 3, pp. 1218–1224, 2010.

[47] C. von Wilmowsky, S. Bauer, R. Lutz et al., "In vivo evaluation of anodic TiO_2 nanotubes: an experimental study in the pig," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 89, no. 1, pp. 165–171, 2009.

[48] E. Matykina, J. M. Hernandez-López, A. Conde, C. Domingo, J. J. De Damborenea, and M. A. Arenas, "Morphologies of nanostructured TiO_2 doped with F on Ti–6Al–4V alloy," *Electrochimica Acta*, vol. 56, no. 5, pp. 2221–2229, 2011.

[49] Y. Ma, M. Chen, J. E. Jones, A. C. Ritts, Q. Yu, and H. Sun, "Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm by trimethylsilane plasma coating," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, no. 11, pp. 5923–5937, 2012.

[50] W. Zimmerli, "Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection," *Journal of Internal Medicine*, vol. 276, no. 2, pp. 111–119, 2014.

[51] M. D. Taylor and L. M. Napolitano, "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in vascular surgery: increasing prevalence," *Surgical Infections*, vol. 5, no. 2, pp. 180–187, 2004.

[52] L. R. Hoffman, D. A. D'Argenio, M. J. MacCoss, Z. Zhang, R. A. Jones, and S. I. Miller, "Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation," *Nature*, vol. 436, no. 7054, pp. 1171–1175, 2005.

[53] A. Gao, R. Hang, X. Huang et al., "The effects of titania nanotubes with embedded silver oxide nanoparticles on bacteria and osteoblasts," *Biomaterials*, vol. 35, no. 13, pp. 4223–4235, 2014.

[54] S.-Y. Park, Y. P. Chong, H. J. Park et al., "Agr dysfunction and persistent methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia in patients with removed eradicable foci," *Infection*, vol. 41, no. 1, pp. 111–119, 2013.

[55] D. V. Portan, A. A. Kroustalli, D. D. Deligianni, and G. C. Papanicolaou, "On the biocompatibility between TiO_2 nanotubes layer and human osteoblasts," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 100, no. 10, pp. 2546–2553, 2012.

[56] Y. Wang, C. Wen, P. Hodgson, and Y. Li, "Biocompatibility of TiO_2 nanotubes with different topographies," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 102, no. 3, pp. 743–751, 2014.

[57] H. Z. Zhang, Y. Sun, A. Tian et al., "Improved antibacterial activity and biocompatibility on vancomycin-loaded TiO_2 nanotubes: In vivo and in vitro studies," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, pp. 4379–4389, 2013.

[58] Z. Peng, J. Ni, K. Zheng et al., "Dual effects and mechanism of TiO_2 nanotube arrays in reducing bacterial colonization and enhancing C3H10T1/2 cell adhesion," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, pp. 3093–3105, 2013.

[59] P. Loskill, C. Zeitz, S. Grandthyll et al., "Reduced adhesion of oral bacteria on hydroxyapatite by fluoride treatment," *Langmuir*, vol. 29, no. 18, pp. 5528–5533, 2013.

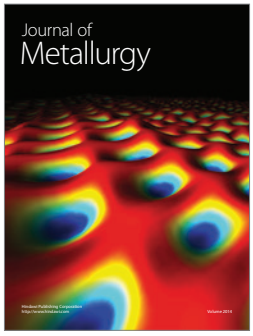
[60] B. Ercan, E. Taylor, E. Alpaslan, and T. J. Webster, "Diameter of titanium nanotubes influences anti-bacterial efficacy," *Nanotechnology*, vol. 22, no. 29, Article ID 295102, 2011.

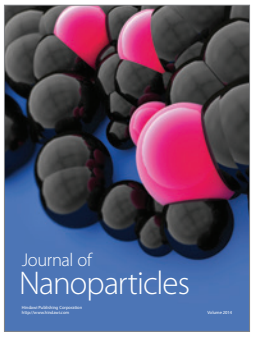
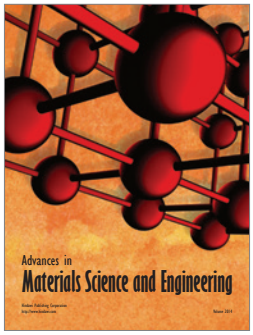
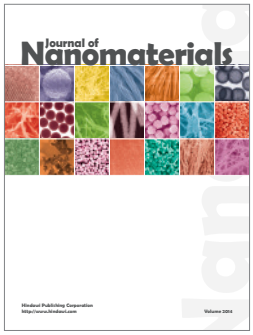
[61] S. F. Lamolle, M. Monjo, M. Rubert, H. J. Haugen, S. P. Lyngstadaas, and J. E. Ellingsen, "The effect of hydrofluoric acid treatment of titanium surface on nanostructural and chemical changes and the growth of MC3T3-E1 cells," *Biomaterials*, vol. 30, no. 5, pp. 736–742, 2009.

[62] M. Monjo, S. F. Lamolle, S. P. Lyngstadaas, H. J. Rønold, and J. E. Ellingsen, "In vivo expression of osteogenic markers and bone mineral density at the surface of fluoride-modified titanium implants," *Biomaterials*, vol. 29, no. 28, pp. 3771–3780, 2008.

[63] S. F. Lamolle, M. Monjo, S. P. Lyngstadaas, J. E. Ellingsen, and H. J. Haugen, "Titanium implant surface modification by cathodic reduction in hydrofluoric acid: surface characterization and in vivo performance," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 88, no. 3, pp. 581–588, 2009.

[64] E. Beltrán-Partida, A. Moreno-Ulloa, B. Valdez-Salas et al., "Improved osteoblast and chondrocyte adhesion and viability by surface-modified Ti6Al4V alloy with anodized TiO_2 nanotubes using a super-oxidative solution," *Materials*, vol. 8, no. 3, pp. 867–883, 2015.



Hindawi

Submit your manuscripts at
http://www.hindawi.com