

Uniwersytet Śląski w Katowicach  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Instytut Inżynierii Materiałowej



Rozprawa doktorska

**Anodowe wytwarzanie i biofunkcjonalność warstw  
nanorurek tlenkowych na stopie  $Ti_{13}Nb_{13}Zr$**

mgr inż. Agnieszka Stróż

Promotor:

dr hab. Bożena Łosiewicz, prof. UŚ

Promotor pomocniczy:

dr hab. Grzegorz Dercz, prof. UŚ

Chorzów 2023

*Dziękuję Pani dr hab. Bożenie Łosiewicz, prof. UŚ za zaangażowanie, wsparcie oraz pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej.*

*Szczególne podziękowania pragnę złożyć Panu dr hab. Grzegorzowi Dercz, prof. UŚ za dostępność, za każdą cenną radę, wskazówki, które pomogły mi dokończyć tę pracę. Ponadto za ogromną życzliwość i oparcie, które zostały mi okazane poza pracą naukową.*

*Pragnę podziękować wszystkim pracownikom Instytutu Inżynierii Materiałowej za życzliwość i okazaną pomoc. Za możliwość rozmowy, uzyskania rady, za każdy wspólnie spędzony dzień pełen uśmiechu i optymizmu.*

*Osobne podziękowania składam na ręce mojego męża, Wojtka, za niezastąpioną cierpliwość, nieustanne wsparcie, motywację i troskę. Dziękuję za to, że był przy mnie w chwilach sukcesów, radości oraz w tych najtrudniejszych życiowych momentach.*

*Słowa podziękowania kieruję także całej mojej Rodzinie.*

Perspektywa regeneracji uszkodzonych lub niefunkcjonalnych tkanek za pomocą gotowego produktu syntetycznego jest motorem napędowym dynamicznie rozwijającej się medycyny regeneracyjnej. Obecnie wrasta zainteresowanie nanomedycyną, ponieważ zastosowanie narzędzi nanotechnologicznych do wytwarzania nanostruktur umożliwia poprawę interakcji między powierzchniami biomateriałów a jednostkami biologicznymi.

W przedstawionym wprowadzeniu teoretycznym niniejszej rozprawy doktorskiej zostały nakreślone problemy wynikające z nieprawidłowego dopasowania między implantem a tkanką kostną. Część teoretyczna dotyczyła tematyki implantów długoterminowych, ze szczególnym uwzględnieniem materiałów na bazie tytanu. Scharakteryzowana została nowa generacja dwufazowych ( $\alpha + \beta$ ) stopów tytanu z uwzględnieniem materiału badań w postaci stopu Ti13Nb13Zr. W części teoretycznej podnoszony jest też temat elektrochemicznej modyfikacji powierzchni, której zadaniem jest wytworzenie na powierzchni tytanowego implantu warstw nanorurek tlenkowych (NT). Omawiane są ponadto główne parametry procesu anodowania oraz ich wpływ na morfologię warstw NT w odniesieniu do badań biologicznych opisywanych w literaturze.

Na podstawie przeprowadzonej analizy literatury przyjęto w niniejszej dysertacji tezę badawczą, że istnieje możliwość poprawy biofunkcjonalności stopu Ti13Nb13Zr poprzez wytworzenie na jego powierzchni warstw nanorurek tlenkowych za pomocą anodowania. Na podstawie tak sformułowanej tezy zostały zaproponowane cele badawcze, które dotyczyły opracowania sposobu anodowego wytwarzania warstw NT pierwszej (1G), drugiej (2G) i trzeciej (3G) generacji na powierzchni biomedycznego stopu Ti13Nb13Zr, charakterystyki właściwości fizyko-chemicznych, biotribologicznych, mikromechanicznych, elektronowych, bioelektrochemicznych, biologicznych oraz chropowatości powierzchni stopu Ti13Nb13Zr przed i po procesie anodowania, kontroli jakości stopu Ti13Nb13Zr przed i po procesie anodowania w przyspieszonych badaniach korozyjnych w komorze solnej oraz zastosowania wytworzonych warstw NT na powierzchni stopu Ti13Nb13Zr jako potencjalny nośnik leków.

Przedstawione wyniki uzyskane licznymi metodami badawczymi dowodzą, iż metoda anodowania pozwala na wytworzenie warstw NT 1G, 2G i 3G. Uzyskane nanorurki charakteryzowały się budową jednościenną i wysokim stopniem uporządkowania oraz były prostopadle ułożone względem podłoża.

Wyniki przyspieszonych badań korozyjnych w środowisku obojętnej mgły solnej potwierdziły wysoką jakość proponowanych implantacyjnych materiałów.

Wykazano wpływ warunków anodowania na poprawę właściwości mikromechanicznych, elektronowych i bioelektrochemicznych oraz wzrost chropowatości powierzchni stopu Ti13Nb13Zr. Wykazana została wysoka odporność korozyjna *in vitro* wytworzonych nanoinżynierskich materiałów oraz ich niska podatność na korozję wżerową w warunkach symulowanych płynów ustrojowych.

W nowatorskich badaniach impedancyjnych w makro- i mikroskali określono mechanizm korozji wżerowej oparty o dwuwarstwową budowę NT. Wykazano wpływ parametrów morfologicznych otrzymanych warstw NT 1G, 2G i 3G na zmniejszenie odporności na zużycie ściernie stopu Ti13Nb13Zr. Zaproponowano mechanizm zużycia biotribologicznego otrzymanych warstw NT w roztworze Ringera'.

Dalsza część badań odnosi się do właściwości biologicznych, które determinują biomateriał pod kątem jego zastosowania. Wyznaczone w teście hemolizy wartości wskaźnika hemolitycznego pozwoliły na określenie otrzymanych materiałów jako hemokompatybilne. Badania kąta zwilżania wykazały poprawę właściwości hydrofilowych powierzchni warstw NT. Metoda anodowania polepszyła hydrofilowość w stosunku do samopasywnej warstewki obecnej na stopie Ti13Nb13Zr. Wysiane mysie fibroblasty na wytworzonych warstwach NT trzech generacji oraz dla stopu Ti13Nb13Zr w stanie wyjściowym wykazały brak cytotoxyczności. Nowatorskie badania oceny trombogenności warstw NT pozwoliły na przyporządkowanie ich do odpowiedniej klasy. Właściwości atrombogeniczne wykazała warstwa NT 2G. Warstwy NT 1G i 3G zaklasyfikowano odpowiednio do 4 i 5 klasy. Materiały te charakteryzują się silnymi właściwościami aktywującymi czynniki krzepnięcia. Wykazana została możliwość zastosowania anodowo wytworzonych warstw NT 1G, 2G i 3G jako nośników leków w systemach kontrolowanego uwalniania leków. Każda z otrzymanych warstw NT może zostać użyta jako nośnik leku przeciwwzapalnego do celowanego działania leczniczego, co pozwoli ograniczyć suplementację doustną.

The perspective of regenerating damaged or non-functional tissues with a finished synthetic product is driving the rapidly developing regenerative medicine. There is currently a growing interest in nanomedicine, as the use of nanotechnology tools to fabricate nanostructures enables improved interactions between biomaterial surfaces and biological entities.

The theoretical introduction of this doctoral dissertation outlines the problems resulting from a mismatch between the implant and bone tissue. The theoretical part deals with the topic of long-term implants, with a special focus on titanium-based materials. The new generation of biphasic ( $\alpha + \beta$ ) titanium alloys was characterized, taking into account the studied material in the form of Ti13Nb13Zr alloy. The theoretical part also raises the topic of electrochemical surface modification - the aim of this task is to produce layers of oxide nanotubes (NT) on the surface of titanium implants. In addition, the main parameters of the anodization process and their influence on the morphology of NT layers are discussed with reference to the biological studies reported in the literature.

Based on the analysis of the literature, this dissertation adopted the research thesis what follows: there is a possibility of improving the biofunctionality of Ti13Nb13Zr alloy by producing oxide nanotube layers on its surface by means of anodization. On basis of the formulated thesis the research objectives were proposed, which concerned the development of a method for the anodic production of NT of first, second and third generation (1G, 2G and 3G, respectively) layers on the surface of biomedical Ti13Nb13Zr alloy, the characterization of the physical-chemical, biotribological, micromechanical, electronic, bioelectrochemical, biological properties and surface roughness of Ti13Nb13Zr alloy before and after the anodization process, quality control of Ti13Nb13Zr alloy before and after the anodization process in accelerated corrosion tests in a salt chamber, and the use of the produced NT layers on the surface of Ti13Nb13Zr alloy as a potential drug carrier.

The presented results obtained by numerous characterization methods prove that the anodization allows the formation of NT 1G, 2G and 3G layers. The obtained nanotubes were characterized by a single-walled structure and a high degree of ordering, and were perpendicular to the substrate. The results of accelerated corrosion tests in an inert salt spray environment confirmed the high quality of the proposed implantable materials.

The effect of anodizing conditions on the improvement of micromechanical, electronic and bioelectrochemical properties and the increase

in the surface roughness of the Ti13Nb13Zr alloy was demonstrated. The high *in vitro* corrosion resistance of the produced nanoengineered materials and their low susceptibility to pitting corrosion under simulated body fluid conditions have been verified. In innovative macro- and microscale impedance studies, the mechanism of pitting corrosion based on the two-layer structure of NT was determined. The effect of the morphological parameters of the obtained NT 1G, 2G and 3G layers on the reduction of wear resistance of the Ti13Nb13Zr alloy was showed. The mechanism of biotribological wear of the obtained NT layers in Ringer's solution was proposed.

The further part of the research relates to the biological properties that determine the biomaterial in terms of its application. The values of the hemolytic index determined in the hemolysis test indicate that the obtained materials belong to the hemocompatible group. Wetting angle studies showed an improvement in the hydrophilic properties of the surface of the NT layers. The anodizing method improved the hydrophilicity in relation to the self-passive layer present on the Ti13Nb13Zr alloy. Mouse fibroblasts seeded on the prepared NT layers of three generations and for the Ti13Nb13Zr alloy in the initial state showed no cytotoxicity. Innovative studies to assess the thrombogenicity of NT layers allowed to assign them to the appropriate class. The NT 2G layer showed athrombogenic properties. The NT layers 1G and 3G were classified into the 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> class, respectively. These materials have strong coagulation factor activating properties. The possibility of using anodically produced NT 1G, 2G and 3G layers as drug carriers in controlled drug release systems has been demonstrated. Each of the obtained NT layers can be used as a carrier of an anti-inflammatory drug for a targeted therapeutic effect, which will limit oral supplementation.

Streszczenie .....	3
Abstract .....	5
<b>I. Wykaz publikacji naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej .....</b>	<b>8</b>
<b>II. Wstęp teoretyczny .....</b>	<b>21</b>
1. Współczesna implantologia i medycyna regeneracyjna.....	22
2. Biokompatybilne stopy tytanu - bezwanadowy stop Ti13Nb13Zr.....	23
3. Modyfikacja powierzchni a osteointegracja implantu.....	25
4. Anodowanie tytanu i jego stopów.....	27
5. Nanorurki tlenkowe i ich biomedyczne zastosowanie.....	34
6. Literatura:.....	37
<b>III. Autoreferat.....</b>	<b>44</b>
1. Cel pracy.....	45
2. Metody badawcze .....	46
3. Omówienie prac wchodzących w cykl publikacyjny oraz przedstawienie osiągniętych wyników.....	47
4. Wnioski.....	81
5. Literatura:.....	83
<b>IV. Wykaz osiągnięć naukowych.....</b>	<b>87</b>
<b>V. Publikacje naukowe stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej.....</b>	<b>93</b>
<b>VI. Oświadczenia współautorów .....</b>	<b>216</b>

---

*I. Wykaz publikacji naukowych będących podstawą  
rozprawy doktorskiej*



Praca doktorska pt. „Anodowe wytwarzanie i biofunkcjonalność warstw nanorurek tlenkowych na stopie Ti13Nb13Zr” została opracowana na podstawie 10 oryginalnych i jednotematycznych publikacji [D1–D10]. Rozprawa doktorska opiera się na wynikach, które częściowo uzyskałam jako stypendystka projektu „Dokto-RIS – program stypendialny na rzecz innowacyjnego Śląska” w latach 2012-2014 oraz programu „Fundament Optymalnego Rozwoju: Staże z Technologii - FORSZT” w latach 2015-2016 realizowanego w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, Program Operacyjny Kapitał Ludzki, Priorytet VIII „Regionalne kadry gospodarki”, Działanie 8.2 „Transfer wiedzy”, Poddziałanie 8.2.1 „Wsparcie dla współpracy sfery nauki i przedsiębiorstw”.

### [D1]

**Stróż A, Dercz G, Chmiela B, Łosiewicz B.** Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy with potential use as bone implant. *AIP Conf. Proc.*, 2019, 2083, 030004-1–030004-5. DOI:10.1063/1.5094314, MNiSW: 20 pkt

Praca dotyczy zastosowania anodowania jako elektrochemicznej metody modyfikacji powierzchni bezwanadowego stopu Ti13Nb13Zr zawierającego biokompatybilne składniki stopowe w celu otrzymania warstw nanorurek tlenkowych (NT) pierwszej generacji (1G). Osiągnięciem tej pracy jest opracowanie sposobu wytwarzania anodowych warstw NT 1G w elektrolicie zawierającym 0,5% roztwór kwasu fluorowodorowego przy napięciu 20 V przez 120 min w temperaturze pokojowej. Właściwości fizyko-chemiczne powierzchni anodowanego stopu Ti13Nb13Zr scharakteryzowano za pomocą metody GIXD, FE-SEM, EDXS oraz AFM. W zaproponowanych warunkach procesu anodowania wytworzono jednorodne i jednościenne NT o średniej średnicy zewnętrznej 87(10) nm, średniej średnicy wewnętrznej 71(7) nm i średniej długości 0,94(9) μm. Charakterystyka strukturalna otrzymanych warstw NT 1G wykazała obecność TiO<sub>2</sub> w odmianie polimorficznej rutylu, TiO i TiO<sub>3</sub> na podłożu dwufazowego (α + β) stopu Ti13Nb13Zr. Wykazany ponad 15-krotny wzrost chropowatości powierzchni anodowanej w porównaniu z nieutlenionym podłożem stopowym sugeruje, że proponowany sposób modyfikacji powierzchni jest obiecujący dla poprawy procesu osteointegracji implantacyjnego stopu Ti13Nb13Zr na granicy żywa tkanka-implant.

Mój udział w powyższym artykule polegał na wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 1G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, interpretacji uzyskanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.

*Mój wkład w powstanie tej publikacji wynosi 75%.*

## [D2]

Łosiewicz B, **Stróż A**, Kubisztal J, Osak P, Zubko M. EIS and LEIS study on in vitro corrosion resistance of anodic oxide nanotubes on Ti-13Zr-13Nb alloy in saline solution. *Coatings*, 2023, 13(5), 875. DOI:10.3390/coatings13050875, IF<sub>2023</sub>: 3,236, MEiN: 100 pkt, Invited Paper

Praca dotyczy charakterystyki właściwości międzyfazowych warstw NT 1G otrzymanych na powierzchni biomedycznego stopu Ti13Nb13Zr. Na podstawie przeprowadzonych badań fizyko-chemicznych metodami TEM i ATR-FTIR potwierdzono, że modyfikacja powierzchni stopu Ti13Nb13Zr poprzez anodowanie w 0,5% wodnym roztworze HF przy napięciu 20 V przez 120 min w temperaturze pokojowej, pozwoliła na wytworzenie warstw NT 1G inspirowanych budową bambusa o strukturze rutylu. Badania odporności korozyjnej *in vitro* stopu Ti13Nb13Zr przed i po anodowaniu przeprowadzono w roztworze soli fizjologicznej w temperaturze 37 °C metodami stało- i zmiennoprądowymi. W badaniach metodą EIS wykazano zachowanie impedancyjne elektrody Ti13Nb13Zr w stanie wyjściowym, które jest typowe dla tytanu i jego stopów pokrytych samopasywną warstwą tlenkową, a w przypadku warstwy NT 1G uzyskano charakterystyki impedancyjne typowe dla elektrod porowatych. Przeprowadzone zostało modelowanie fizyko-chemiczne uzyskanych widm impedancyjnych przy użyciu koncepcji elektrycznych obwodów zastępczych, które pozwoliło określić szczegółowy mechanizm i kinetykę korozji elektrochemicznej badanych elektrod. Nieznaczny spadek odporności korozyjnej anodowanej elektrody Ti13Nb13Zr w porównaniu z elektrodą w stanie wyjściowym wynikał z porowatości powierzchni warstwy NT 1G, co zostało potwierdzone w badaniach lokalnej odporności korozyjnej przeprowadzonych skaningowymi metodami elektrochemicznymi LEIS i SVET. Charakterystyki potencjodynamiczne elektrody Ti13Nb13Zr przed i po

anodowaniu nie wykazały podatności na korozję wżerową aż do wartości potencjału 9,4 V, co świadczy o bardzo wysokiej odporności na działanie agresywnych jonów chlorkowych w środowisku biologicznym.

Mój udział w powyższym artykule polegał na wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 1G, współudziale w przeprowadzeniu badań odporności korozyjnej, analizie i dyskusji wyników oraz przygotowaniu tekstu publikacji.

*Mój wkład w powstanie tej publikacji wynosi 60%.*

### [D3]

**Smółka A**, Rodak K, Dercz G, Dudek K, Łosiewicz B. Electrochemical formation of self-organized nanotubular oxide layers on Ti13Zr13Nb alloy for biomedical applications. *Acta Phys. Pol.*, 2014, 125(4), 932-935. DOI:10.12693/APhysPolA.125.932, IF<sub>2014</sub>: 0,530, MNiSW: 15 pkt

Praca dotyczy zastosowania metody anodowania do elektrochemicznej modyfikacji powierzchni stopu Ti13Nb13Zr w celu otrzymania warstw NT drugiej generacji (2G) do zastosowań w medycynie regeneracyjnej. Osiągnięciem tej pracy jest opracowanie sposobu wytwarzania anodowych warstw NT 2G w elektrolicie zawierającym 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> z dodatkiem 1% wag. NH<sub>4</sub>F przy napięciu 20 V przez 120 min w temperaturze pokojowej. Wyniki badań fizyko-chemicznych uzyskane przy zastosowaniu metody STEM, EDS, GIXD i AFM potwierdziły możliwość elektrochemicznego wytwarzania warstw samoorganizujących się NT 2G na powierzchni stopu Ti13Nb13Zr w proponowanych warunkach anodowania. Charakterystyka właściwości fizyko-chemicznych wykazała, że otrzymane warstwy NT 2G posiadają strukturę rutyłu, a średnia średnica zewnętrzna jednorodnych i jednościennych nanorurek mieści się w zakresie od 10 do 32 nm. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowany został trój etapowy mechanizm tworzenia anodowych warstw NT 2G w elektrolicie na bazie siarczanu amonu z dodatkiem jonów fluorkowych pochodzących od fluorku amonu, które jest wspomagane działaniem pola elektrycznego. Wykazano ponad 20-krotny wzrost chropowatości powierzchni anodowanego stopu Ti13Nb13Zr w porównaniu do podłoża w stanie wyjściowym, co sugeruje, że opracowany sposób

elektrochemicznej modyfikacji powierzchni może zapewnić poprawę procesu osteointegracji badanego stopu implantacyjnego.

Mój udział w powyższym artykule polegał na wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 2G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, analizie i dyskusji wyników oraz przygotowaniu tekstu publikacji.

*Mój wkład w powstanie tej publikacji wynosi 70%.*

[D4]

**Smołka A**, Dercz G, Rodak K, Łosiewicz B. Evaluation of corrosion resistance of nanotubular oxide layers on the Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution. *Arch. Metall. Mater.*, 2015, 60(4), 2681-2686. DOI:10.1515/amm-2015-0432, MNiSW: 30 pkt

Praca dotyczy określenia wpływu obecności warstw NT 2G wytworzonych metodą anodowania na odporność korozyjną *in vitro* implantacyjnego stopu Ti13Nb13Zr w środowisku soli fizjologicznej w temperaturze 37 °C. Obecność anodowych warstw NT 2G o strukturze rutylu otrzymanych w elektrolicie zawierającym 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> z dodatkiem 1% wag. NH<sub>4</sub>F przy napięciu 20 V przez 120 min w temperaturze pokojowej, została potwierdzona w badaniach fizyko-chemicznych wykonanych metodą STEM i SEM. Ocenę porównawczą odporności korozyjnej elektrody Ti13Nb13Zr przed i po procesie anodowania przeprowadzono w oparciu o badania elektrochemiczne przy użyciu metody OCP, krzywych polaryzacji oraz EIS. Do wyznaczenia parametrów odporności korozyjnej badanych elektrod w oparciu o pomiary potencjodynamiczne zastosowano metodę ekstrapolacji prostych Tafela. W badaniach impedancyjnych wykazano pojemnościowe zachowanie badanych elektrod i wysokie wartości modułu impedancji, które są typowe dla elektrod metalicznych pokrytych warstwą tlenkową o właściwościach barierowych. W celu określenia mechanizmu i kinetyki korozji elektrochemicznej badanych elektrod przeprowadzono analizę charakterystyk impedancyjnych przy

zastosowaniu koncepcji elektrycznych obwodów zastępczych. W zaproponowanym mechanizmie korozji wżerowej założono obecność ciągłej warstwy tlenkowej na powierzchni elektrody Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr w stanie wyjściowym oraz porowatej warstwy NT 2G o budowie dwuwarstwowej na powierzchni anodowanej elektrody. Osiągnięciem tej pracy jest potwierdzenie założonej tezy, że elektrochemiczna modyfikacja powierzchni stopu Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr na drodze anodowania pozwala na poprawę jego biofunkcjonalności poprzez otrzymanie warstw NT 2G o wyższej odporności korozyjnej w porównaniu do podłoża stopowego.

Mój udział w powyższym artykule polegał na wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 2G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, wykonaniu pomiarów odporności korozyjnej, opracowaniu uzyskanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.

*Mój wkład w powstanie tej publikacji wynosi 75%.*

[D5]

**Stróż A**, Dercz G, Chmiela B, Stróż D, Łosiewicz B. Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr alloy for biomedical applications. *Acta Phys. Pol.*, 2016, 130(4), 1079-1080. DOI:10.12693/APhysPolA.130.1079, IF<sub>2016</sub>: 0,469, MNiSW: 15 pkt

Praca dotyczy zastosowania wysokiej zawartości jonów fluorkowych w składzie elektrolitu na bazie siarczanu amonu do wytworzenia warstw NT 2G na powierzchni biomedycznego stopu Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr z wykorzystaniem metody anodowania w celu wytworzenia NT o zwiększonych parametrach morfologicznych. Osiągnięciem tej pracy jest opracowanie sposobu wytwarzania anodowych warstw NT 2G w elektrolicie zawierającym 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> z dodatkiem 2% wag. NH<sub>4</sub>F przy napięciu 20 V przez 120 min w temperaturze pokojowej. Charakterystyka właściwości fizyko-chemicznych otrzymanych warstw NT 2G przeprowadzona za pomocą metody FE-SEM i GIXD potwierdziła możliwość anodowego wytwarzania jednorodnych warstw NT 2G na powierzchni stopu Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr w proponowanych warunkach utleniania elektrochemicznego. Wykazano amorficzną strukturę otrzymanych warstw NT 2G. Stwierdzono, że w proponowanych warunkach anodowania można

otrzymać jednościenne NT o średniej średnicy zewnętrznej 103(16) nm, średniej średnicy wewnętrznej 61(11) nm oraz średniej długości 3,9(2)  $\mu\text{m}$ . Uzyskane wyniki świadczą o tym, że opracowany sposób elektrochemicznej modyfikacji powierzchni stopu implantacyjnego Ti13Nb13Zr zapewnia możliwość zwiększenia powierzchni właściwej warstwy NT 2G, co może wpływać na poprawę procesu osteointegracji.

Mój udział w powyższym artykule polegał na wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 2G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, opracowaniu uzyskanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.

*Mój wkład w powstanie tej publikacji wynosi 75%.*

[D6]

**Stróż A**, Luxbacher T, Dudek K, Chmiela B, Osak P, Łosiewicz B. In vitro bioelectrochemical properties of second-generation oxide nanotubes on Ti-13Zr-13Nb biomedical alloy. *Materials*, 2023, 16(4), 1408. DOI:10.3390/ma16041408, IF<sub>2023</sub>: 3,748, MEiN: 140 pkt, Invited Paper

Praca dotyczy charakterystyki właściwości bioelektrochemicznych *in vitro* warstw NT 2G otrzymanych na stopie Ti13Nb13Zr metodą anodowania w elektrolicie zawierającym 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> z dodatkiem 2% wag. NH<sub>4</sub>F przy napięciu 20 V przez 120 min w temperaturze pokojowej. Obecność bambusopodobnych NT 2G o amorficznej strukturze została potwierdzona w badaniach fizyko-chemicznych wykonanych metodą FE-SEM, EDS oraz GIXD. Pomiary potencjału zeta dla stopu Ti13Nb13Zr przed i po procesie anodowania prowadzono w wodnym roztworze KCl, soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) i sztucznej krwi, charakteryzujących się różną siłą jonową i pH w zakresie od ponad 3 do 9. Wykazano wpływ pH elektrolitu i siły jonowej na potencjał zeta badanych powierzchni. Stwierdzono przesunięcie punktu izoelektrycznego w obojętnym roztworze KCl od wartości pH 4,2, która jest typowa dla hydrofobowej powierzchni bez grupy funkcyjnej do pH 5,4 dla amorficznej warstwy NT 2G o właściwościach hydrofilowych. Porównano wpływ rodzaju elektrolitów na potencjał zeta przy pH 7,4 dla stopu Ti13Nb13Zr

przed i po anodowaniu. Wykazano silną reakcję jonów wapnia z powierzchnią warstwy NT 2G. Jony złożone zawarte w sztucznej krwi wykazały silniejsze powinowactwo do hydrofobowej powierzchni stopu w stanie wyjściowym niż hydrofilowej powierzchni NT 2G. W badaniach odporności korozyjnej *in vitro* w roztworze PBS przeprowadzonych metodą OCP i anodowych krzywych polaryzacji wykazano wpływ anodowania na wzrost odporności korozyjnej elektrody Ti13Nb13Zr spowodowany obecnością stabilnej warstwy NT 2G o amorficznej strukturze. W badaniach potencjodynamicznych obu typów elektrod nie stwierdzono podatności na korozję wżerową do wartości potencjału 9,4 V. Przeprowadzone badania zachęcają do dalszych modyfikacji powierzchni stopu Ti13Nb13Zr poprzez anodowanie w nowych warunkach elektrochemicznych.

Mój udział w powyższym artykule polegał na wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 2G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, współudziale w przeprowadzonych badaniach korozyjnych, opracowaniu uzyskanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.

*Mój wkład w powstanie tej publikacji wynosi 75%.*

#### [D7]

Łosiewicz B, Skwarek S, **Stróż A**, Osak P, Dudek K, Kubisztal J, Maszybrocka J. Production and characterization of the third-generation oxide nanotubes on Ti–13Zr–13Nb alloy. *Materials*, 2022, 15(6), 2321. DOI:10.3390/ma15062321, IF<sub>2021</sub>: 3,748, MEiN: 140 pkt, Invited Paper

Praca dotyczy zastosowania elektrochemicznej modyfikacji powierzchni implantacyjnego stopu Ti13Nb13Zr na drodze anodowania do otrzymania warstw NT trzeciej generacji (3G) oraz określenia wpływu anodowania na właściwości fizyko-chemiczne, elektronowe, mikromechaniczne i chropowatość powierzchni podłoża. Osiągnięciem tej pracy jest opracowanie sposobu wytwarzania anodowych warstw NT 3G w elektrolicie na bazie 1M glikolu etylenowego z dodatkiem 4% wag. NH<sub>4</sub>F przy napięciu z zakresu 15–35 V przez 120 min w temperaturze pokojowej. Wyniki badań fizyko-chemicznych

otrzymane przy użyciu metody SEM i EDS potwierdziły wytworzenie warstw NT 3G w nowych warunkach anodowania. Wyznaczono równania liniowe opisujące zmianę średniej średnicy zewnętrznej i średnicy wewnętrznej otrzymanych nanorurek w funkcji napięcia anodowania, które mogą znaleźć zastosowanie do wytwarzania nanorurek o założonych parametrach morfologicznych. Grubość warstw NT 3G wyznaczono metodą skanującej sondy Kelvina (SKP). Kontrolę jakości warstw NT 3D przeprowadzono w przyspieszonych badaniach korozyjnych w komorze solnej w obojętnej mgły solnej. Przeprowadzono pomiary mikrotwardości metodą Vickers'a przed i po badaniach w komorze solnej, które wykazały wysoką jakość otrzymanych warstw NT 3G i zależność mikrotwardości od napięcia anodowania. Wykazano wpływ anodowania na poprawę właściwości elektronowych stopu TNZ określonych w badaniach metodą SKP. Stwierdzono wpływ anodowania na wzrost chropowatości powierzchni stopu TNZ w pomiarach przy użyciu metody profilometrii kontaktowej. W przypadku warstw NT 3G wytworzonych przy napięciach 25-35 V uzyskano wartość  $R_a$  w zakresie 1,07–2,73  $\mu\text{m}$ , która jest optymalna dla materiałów implantacyjnych.

Mój udział w powyższym artykule polegał na wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 3G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, współudziale w przeprowadzonych badaniach chropowatości powierzchni, opracowaniu uzyskanych wyników i współudziale w przygotowaniu tekstu publikacji.

*Mój wkład w powstanie tej publikacji wynosi 70%.*



[D8]

**Stróż A**, Łosiewicz B, Zubko M, Chmiela B, Balin K, Dercz G, Gawlikowski M, Goryczka T. Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr alloy for medical applications. *Mater. Charact.*, 2017, 132, 363-372. DOI:10.1016/j.matchar.2017.09.004, IF<sub>2017</sub>: 2,892, MNIŚW: 45 pkt

Praca dotyczy zastosowania elektrochemicznej modyfikacji powierzchni stopu Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr metodą anodowania do wytworzenia warstw NT 3G i określenia wpływu anodowania na jego właściwości fizyko-chemiczne, hemokompatybilność i odporność korozyjną *in vitro*. Osiągnięciem tej pracy jest opracowanie sposobu wytwarzania anodowych warstw NT 3G w elektrolicie 1M glikolu etylenowego z dodatkiem 4% wag. NH<sub>4</sub>F przy napięciu 50 V przez 80 min w temperaturze pokojowej. Wyniki badań fizyko-chemicznych otrzymane przy użyciu metody FE-SEM, TEM, EDS, GIXD, XRD i XPS, potwierdziły wytworzenie jednościennych nanorurek o strukturze amorficznej i średniej średnicy zewnętrznej 362(44) nm, średniej średnicy wewnętrznej 218(39) nm oraz średniej długości 9,7(6) μm. Wykazano że otrzymane nanorurki składały się z tlenków składników stopowych TiO<sub>2</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, ZrO<sub>2</sub> i ZrO<sub>x</sub>. Istotnym osiągnięciem było wykazanie w biologicznej ocenie biogodności, że stop Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr po anodowaniu nie wykazuje efektów hemolitycznych i spełnia wymagania do zastosowań klinicznych. Badania odporności korozyjnej *in vitro* stopu Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr przed i po anodowaniu przeprowadzono metodą OCP, EIS i anodowych krzywych polaryzacji w roztworze soli fizjologicznej w temperaturze 37 °C. Charakterystykę mechanizmu i kinetyki korozji wżerowej badanych elektrod przeprowadzono w oparciu o pomiary impedancyjne z zastosowaniem modelowania fizyko-chemiczne opartego o koncepcję elektrycznych obwodów zastępczych przy użyciu zmodyfikowanego modelu celki Randles'a. W badaniach potencjodynamicznych wykazano zbliżone wartości potencjału korozyjnego i pasywne zachowanie oraz brak inicjacji korozji wżerowej do potencjału 9,5 V dla obydwu badanych elektrod. Uzyskane wyniki wykazały nieznaczny spadek odporności na korozję wżerową zmodyfikowanej powierzchniowo elektrody Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr w porównaniu z elektrodą w stanie wyjściowym z powodu obecności porowatej warstwy NT 3G. Otrzymane w pracy wyniki mogą stanowić nowy wgląd w poprawę zdolności stopu implantu Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr do osteointegracji w środowisku biologicznym.

Mój udział w tym artykule polegał na wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 3G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, wykonaniu pomiarów odporności korozyjnej, opracowaniu uzyskanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.

*Mój wkład w powstanie tej publikacji wynosi 65%.*

[D9]

**Stróż A**, Maszybrocka J, Goryczka T, Dudek K, Osak P, Łosiewicz B. Influence of anodizing conditions on biotribological and micromechanical properties of Ti-13Zr-13Nb alloy. *Materials*, 2023, 16(3), 1237. DOI:10.3390/ma16031237, IF<sub>2023</sub>: 3,748, MEiN: 140 pkt, Invited Paper

Praca dotyczy określenia wpływu zaproponowanych warunków anodowania stopu Ti13Nb13Zr na jego właściwości fizyko-chemiczne, mikromechaniczne i biotribologiczne w środowisku biologicznym. Mikrostrukturę stopu Ti13Nb13Zr przed i po procesie anodowania scharakteryzowano za pomocą metody SEM. Istotnym osiągnięciem pracy była ocena wpływu warunków anodowania na właściwości mikromechaniczne stopu Ti13Zr13Nb, z której wynika, że mikrotwardość Vickers'a wyznaczona pod zmiennymi obciążeniami zmieniała się w zależności od rodzaju elektrolitu i zastosowanych parametrów napięciowo-czasowych procesu anodowania. Wykazano, że mikrotwardość Vickers'a dla nieanodowanego stopu była niezależna od zastosowanego obciążenia i wynosiła 302(1). Należy podkreślić, że dla warstw NT 1G, 2G i 3G ujawniono zależność mikrotwardości Vickers'a od przyłożonego obciążenia ze względu na różnice w parametrach morfologicznych i długościach NT. Mikrotwardość Vickers'a dla warstw NT 1G, 2G i 3G zmieniała się wraz ze wzrostem obciążenia. Ze wzrostem średnicy NT zmniejszała się liczba NT przenoszących obciążenia w obszarze styku badanych powierzchni z wgłębnikiem diamentowym. Wytworzone warstwy NT 1G, 2G i 3G mogą rekompensować dużą twardość stopu Ti13Nb13Zr stosowanego do produkcji implantów eliminując naprężenia implant-kość. Na podstawie badań biotribologicznych przeprowadzonych w warunkach tarcia ślizgowego w obecności roztworu Ringer'a, który był biologicznym płynem smarującym wykazano, że największą odpornością na zużycie ściernie cechował się stop

z samopasywną warstwą tlenkową na powierzchni. Wykazano mniejszą odporność na zużycie ściernie dla warstw NT 1G, 2G i 3G w porównaniu do podłoża, co wynikało z porowatości ich powierzchni. Do interpretacji zużycia biotribologicznego stopu Ti13Nb13Zr przed i po anodowaniu zaproponowano mechanizm zużycia ściernego trzech ciał.

Mój udział w tym artykule polegał na wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 1G, 2G, 3G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, współudziale w badaniach mikromechanicznych i biotribologicznych, interpretacji otrzymanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.

*Mój wkład w powstanie tej publikacji wynosi 75%.*

[D10]

**Stróż A**, Gawlikowski M, Balin K, Osak P, Kubisztal J, Zubko M, Maszybrocka J, Dudek K, Łosiewicz B. Biological activity and thrombogenic properties of oxide nanotubes on the Ti-13Nb-13Zr biomedical alloy. *J. Funct. Biomater.*, 2023, Invited Paper

Praca dotyczy określenia wpływu przeprowadzonej elektrochemicznej modyfikacji powierzchni stopu Ti13Nb13Zr przy zastosowaniu metody anodowania w wodnych elektrolitach zawierających jony fluorkowe na jego właściwości fizyko-chemiczne, elektronowe, biologiczne, zwilżalność i chropowatość powierzchni. Wyniki uzyskane metodą FE-SEM i TEM potwierdziły obecność warstw NT 1G, 2G i 3G na powierzchni stopu Ti13Nb13Zr. Wyniki badań XPS wykazały, że otrzymane warstwy NT trzech generacji składały się z TiO<sub>2</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, ZrO<sub>2</sub> i ZrO<sub>x</sub>. W badaniach za pomocą metody SKP wykazano wpływ anodowania na poprawę właściwości elektronowych badanego stopu. Wraz ze wzrostem średnic otrzymanych NT wzrastała wartość różnicy potencjałów kontaktowych. Wykazano wpływ anodowania na wzrost chropowatości powierzchni stopu Ti13Nb13Zr. Charakterystyka właściwości biologicznych obejmowała badania cytotoksyczności, adhezji, trombogenności i hemokompatybilności. Istotnym osiągnięciem pracy było wykazanie, że warstwy NT 2G posiadają najlepsze właściwości hydrofilowe, jak również

---

wykazanie, że biologiczna ocena hemokompatybilności warstw NT 1G i 2G nie wykazała efektów hemolitycznych i tym samym spełniła wymagania dla zastosowań klinicznych. Najlepszą adhezję komórek wykazano dla warstwy NT 1G i stopu Ti13Nb13Zr przed modyfikacją powierzchni. Trombogenność warstw NT 2G i stopu w stanie wyjściowym nie różniła się od siebie, ale materiały te wykazały znacznie lepsze właściwości trombogeniczne niż warstwa NT 1G i 3G. Zbadano kinetykę uwalniania ibuprofenu z matrycy Hep-DOPA dla trzech typów generacji warstw NT. Analiza porównawcza profilu uwalniania ibuprofenu dla badanych warstw nanorurek tlenkowych wykazała najszybsze uwalnianie ibuprofenu z warstwy NT 1G. Wykazano możliwość zastosowania warstw NT 1G, 2G i 3G jako nośników leków do aplikacji w systemach kontrolowanego uwalniania leków.

Mój udział w tym artykule polegał na wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 1G, 2G, 3G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, współudziale w przeprowadzonych badaniach, interpretacji otrzymanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.

*Mój wkład w powstanie tej publikacji wynosi 70%.*

---

## *II. Wstęp teoretyczny*

## 1. Współczesna implantologia i medycyna regeneracyjna

Choroby wieku współczesnego stanowią obecnie jedno z największych wyzwań w służbie zdrowia. Wyniki badań wskazują, że w populacji osób w wieku powyżej 50 lat, ponad 30% kobiet i 8% mężczyzn cierpi na zaburzenia narządu ruchu [1]. Najczęściej występują zmiany zwyrodnieniowe oraz dyskopatyczne w kręgosłupie i stawach, głównie biodrowych i kolanowych. Choroby układu kostno-stawowego powodują stany zapalne oraz ból, co w konsekwencji znacząco obniża jakość życia pacjentów. Jak wynika z doniesień literaturowych, dolegliwości zwyrodnieniowe stawów występują coraz częściej wśród młodszych pokoleń, co często jest spowodowane nadwyrężeniem i degeneracją w stawie biodrowym na skutek np. przenoszenia dużych obciążeń statycznych i dynamicznych [1]. Ponadto starzejące się społeczeństwo, choroby cywilizacyjne jak cukrzyca, choroby nowotworowe i sercowo-naczyniowe, czy siedzący tryb życia przyczyniają się do wzrostu popytu na funkcjonalne biomateriały. Medycyna regeneracyjna wykorzystuje więc implanty jako metodę leczenia wyżej wskazanych schorzeń [2–4]. Spośród wszystkich wszczepianych implantów ortopedycznych, w ponad 95% z nich nadal głównym składnikiem jest metal [5]. Wynika to głównie z właściwości grupy biomateriałów metalicznych, a w szczególności z ich dużej odporności na pękanie, korozję w środowisku organizmu ludzkiego i ogólną trwałość.

Postęp cywilizacyjny wymusza wzrost wymagań wobec opieki medycznej, która powinna stać się bardziej efektywna i mniej kosztowna dla pacjenta. W celu spełnienia tych sprzecznych oczekiwań konieczny jest zintegrowany, zwiększony i zorientowany na zdrowie wysiłek badawczy w różnych dyscyplinach naukowych, takich jak inżynieria materiałowa, inżynieria biomedyczna, nauki chemiczne, nauki fizyczne i nauki biologiczne. Oczekuje się, że w spełnieniu tych wymagań znaczną rolę mogą odegrać nanotechnologie. Zastosowanie nanotechnologii w medycynie powinno w zasadniczy sposób pomóc zaspokoić dzisiejsze potrzeby medyczne i rozwiązywać w przyszłości wiele problemów zdrowotnych starzejącego się społeczeństwa. Dalszy rozwój nanomedycyny wymaga w szczególności opracowania innowacyjnych bionanomateriałów, które będą spełniały szereg wymogów determinowanych miejscem ich potencjalnej aplikacji. Do priorytetowych zadań badawczych nanotechnologii w medycynie należy połączenie w biomateriale optymalnych właściwości mechanicznych, wysokiej biogodności, wysokiej odporności korozyjnej oraz bioaktywności. Od nowej generacji materiałów medycznych oczekuje się, aby prowadziły do właściwych

reakcji organizmu lub dostarczały w odpowiednim miejscu i czasie substancje wspomagające leczenie lub gojenie ran [6]. Jednym z celów przy opracowywaniu nowych biomateriałów przeznaczonych na implanty ortopedyczne było i nadal jest uzyskanie optymalnego stosunku ich modułu sprężystości w odniesieniu do kości. Moduł sprężystości jest ważnym zagadnieniem w ortopedycznym zastosowaniu biomateriałów, szczególnie pod względem mechanicznej interakcji między implantem a kością.

Należy wskazać, że naturalna budowa stawu biodrowego, konstrukcja mechaniczna łożyska w endoprotezach stawu biodrowego i panujące w nim naprężenia obciążające oraz szczątkowe, a także dostępne materiały i związana z nimi problematyka zniszczeń korozyjnych, jednoznacznie definiują problemy do rozwiązania w kontekście wytwarzania implantów biomedycznych [6,7]. Wadą biomateriałów metalicznych stosowanych do produkcji implantów jest to, że w odniesieniu do naturalnej kości są materiałami sztucznymi, i co istotne, nie pełnią funkcji biologicznych. Stąd też prowadzone badania naukowe są nakierowane na poprawę właściwości osteokonduktywnych oraz biokompatybilności biomateriałów metalicznych, które może zapewnić odpowiednia modyfikacja powierzchni [8]. Warto zaznaczyć, że w konwencjonalnych procesach technologicznych, takich jak topienie, odlewanie, kucie lub obróbka cieplna nie można kształtować takich właściwości biomateriałów, które w ortopedii wymagane są do poprawnego wiązania kości w trzpieniu i panewce sztucznych stawów biodrowych. W przypadku implantów dentystycznych wymagana jest kompatybilność zarówno tkanek twardych do tworzenia kości i jej wiązania jak i tkanek miękkich do adhezji nabłonka dziąseł oraz odpowiednie właściwości antybakteryjne do hamowania inwazji bakteryjnej. W celu zapewnienia powyższych właściwości proponowane są różne techniki obróbki powierzchni biomateriałów metalicznych, a niektóre z nich zostały już skomercjalizowane [9,10].

## 2. Biokompatybilne stopy tytanu - bezwanadowy stop Ti13Nb13Zr

W grupie biomateriałów metalicznych można wyróżnić stale austenityczne, wśród których największym zastosowaniem cieszy się stal chromowo-niklowo-molibdenowa typu AISI 316L [11]. Stale austenityczne są biomateriałami metalicznymi o najniższej odporności na korozję elektrochemiczną w środowisku biologicznym. Drugą grupę biomateriałów metalicznych stanowią stopy z pamięcią kształtu będące materiałami inteligentnymi [11]. Najpowszechniej stosowanymi biomateriałami w tej grupie są stopy NiTi, które zawierają kancerogeny nikiel jako składnik stopowy i z tego

względu przeznaczone są na implanty krótkoterminowe. Do trzeciej grupy biomateriałów metalicznych zaliczane są stopy kobaltu wykazujące znacznie wyższą odporność na korozję elektrochemiczną w płynach ustrojowych niż stale austenityczne i stopy z pamięcią kształtu, dzięki czemu znajdują zastosowanie na implanty długoterminowe [12]. Najbardziej obiecującą grupę biomateriałów metalicznych wykorzystywanych na implanty długoterminowe stanowi tytan i dwufazowe  $\alpha + \beta$  stopy tytanu, wśród których stopy Ti6Al4V oraz Ti6Al7Nb znalazły najszerze zastosowanie w ortopedii [8,13]. Jednak w długoterminowych badaniach klinicznych stwierdzony został szkodliwy wpływ aluminium i wanadu na organizm ludzki [13–17]. Wykazano, że jony wanadu jako produkty korozji elektrochemicznej powodują reakcje cytotoksyczne i zaburzenia neurogenne, a jony glinu przyczyniają się do rozmiękania kości oraz chorób neurologicznych mózgu i naczyń krwionośnych. Ponadto właściwości tribologiczne tych stopów są niezadowalające, ponieważ wykazują one niewystarczającą odporność na ścieranie oraz korozję w środowisku biologicznym, co prowadzi do poluzowania elementów nośnych endoprotez [12]. Niedostateczna odporność biomateriałów na korozję i w rezultacie przebieg procesów korozyjnych może stać się źródłem pierwiastków wpływających toksycznie na tkanki lub wywołujących reakcje nowotworowe organizmu. Dlatego podjęto próby opracowania nowej generacji stopów tytanu, w tym bezwanadowego stopu Ti13Nb13Zr, w którym toksyczne metale jak Al i V zastąpiono biokompatybilnymi metalami w postaci cyrkonu i niobu [18]. Zastosowanie jako dodatków stopowych Nb oraz Zr umożliwiło otrzymanie dwufazowego  $\alpha + \beta$  stopu tytanu Ti13Nb13Zr, który charakteryzuje się wysoką odpornością korozyjną w środowisku fizjologicznym oraz wysoką biogodnością [1].

O wyborze rodzaju stopu tytanu na implanty krótko- czy długoterminowe decyduje kombinacja najkorzystniejszych cech, takich jak wysoka odporność na korozję elektrochemiczną w środowisku płynów ustrojowych, wysoka biokompatybilność, mała gęstość, wysoki stosunek wytrzymałości do masy oraz zdolność do osteointegracji [19,20]. Stopy tytanu wykazują wyższą odporność na korozję wżerową wywoływaną przez agresywne jony chlorkowe obecne w otaczających płynach ustrojowych w porównaniu do medycznych stali nierdzewnych np. REX734 czy AISI 316L, stopów z pamięcią kształtu i stopów kobaltu [6]. Wynika to z faktu, że tytan i jego stopy charakteryzują się wysokim powinowactwem do tlenu, w wyniku czego na ich powierzchni tworzy się ultracienka i samopasywna warstewka tlenkowa, która jest stabilna i ściśle



przylega do podłoża, zapewniając jego ochronę przed szkodliwym działaniem środowiska ludzkiego ciała [17,21]. Obok wskazanych wyżej problemów materiałowych, należy podkreślić, że główną barierą w zastosowaniu stopów tytanu na implanty jest niestabilność mechaniczna pomiędzy kością a wszczepem. Związane jest to z różnicą w wartości modułu Young'a. Przykładowo dla stopu Ti6Al4V moduł Young'a wynosi 110 GPa, podczas gdy dla kości jego wartość mieści się w przedziale 10 - 40 GPa [12]. Stop Ti13Nb13Zr zaliczany jest do najnowszej generacji stopów tytanu i cechuje się wysoką biokompatybilnością, wysoką wytrzymałością, bardzo dobrą obrabialnością na gorąco jak i na zimno oraz jednym z najniższych spośród aplikacyjnych biomateriałów metalicznych modułem Young'a, wynoszącym 77-79 GPa [18]. Tak niska wartość modułu Young'a jest istotną zaletą w kontekście aplikacji medycznej, ponieważ pozwala zapobiegać ekranowaniu naprężeń w płytkach kostnych i trzpieniach sztucznych stawów biodrowych [6,19,22,23]. Ekranowanie naprężeń pojawiające się w stabilizatorach kości i sztucznych stawach biodrowych może powodować osteolizę kości. Obciążenie jest więc przykładane głównie do metalowej płytki i trzpienia. Do kości korowej przykładana jest mniejsze obciążenie ze względu na różnicę w module Young'a między metalem a kością korową. Jeśli moduł Young'a płytki metalowej jest podobny do modułu Young'a kości korowej, obciążenie jest równomiernie przykładane zarówno do metalu jak i do kości [1,6]. W przypadku niedopasowania implantu dochodzi do uwalniania z jego powierzchni cząstek o różnych rozmiarach, morfologii i składzie chemicznym, które są fagocytowane przez lokalne komórki odpornościowe, takie jak makrofagi. Wyzwalany jest cykl śmierci komórek i lokalnych reakcji tkankowych, w których pośredniczą monocyty, makrofagi i limfocyty, gdzie nagromadzenie cząstek powoduje stresujące środowisko, które jest ostateczną przyczyną przewlekłego stanu zapalnego. Przewlekłe wydzielanie cytokin prozapalnych, chemokin, czynników wzrostu i enzymów przez makrofagi po fagocytozie cząstek powoduje rozregulowanie aktywności osteoblastów i osteoklastów, prowadząc do resorpcji kości i w konsekwencji uszkodzenia implantu [24].

### 3. *Modyfikacja powierzchni a osteointegracja implantu*

Istotnym parametrem w zakresie odpowiedniego doboru biomateriału do aplikacji medycznej jest biokompatybilność, którą definiuje się jako „*zdolność materiału do działania z odpowiednią odpowiedzią gospodarza w określonym zastosowaniu*” [8,25]. Bardzo ważnym aspektem jest wpływ powierzchni implantu na różne składniki biologiczne, które wchodzi w kontakt

z powierzchnią, gdy tylko implant zostaje wprowadzony do chirurgicznie przygotowanego ubytku. Po wprowadzeniu implantu tkanka kostna, która sama w sobie jest produktem długiej, strukturalnej i funkcjonalnej adaptacji do wszelkiego rodzaju wewnętrznych efektów biologicznych, zostaje skonfrontowana ze zdarzeniem fizycznym, do którego nie ma wcześniejszego przygotowania. W optymalnych warunkach sam materiał implantu szybko zajmuje większą część chirurgicznie usuniętej kości, minimalizując w ten sposób szerokość szczeliny między uszkodzonymi powierzchniami kości i przyczyniając się do pierwotnej stabilności kość-implant. Niemniej jednak wprowadzenie obcej powierzchni stanowi nowy element dla środowiska kości, a właściwości tej powierzchni odgrywają główną rolę w zachowaniu komórek, które wchodzi z nią w kontakt [26]. Badania *in vitro* potwierdzają kluczową rolę powierzchni implantu w oddziaływaniu na sekwencję adsorpcji białek, adhezji płytek krwi i hemostazy, stanu zapalnego i odpowiedzi komórek osteogennych [26,27].

Tytan i jego stopy wykazują wyjątkową zdolność do osteointegracji, którą definiuje się jako „*utworzenie bezpośredniego połączenia między implantem a kością, bez ingerencji w tkankę miękką*” [28]. Osteointegracja implantu tytanowego odbywa się poprzez naturalną warstwę  $TiO_2$  [29]. Tlen występujący w tkance kostnej umożliwia tworzenie warstwy ditlenku tytanu na powierzchni tytanowego implantu, na której odkłada się nowa, mineralizująca się tkanka kostna, która tworzy właściwe mocowanie wszczepu. Utrzymanie równowagi między ciągłym procesem resorpcji i absorpcji tkanki kostnej zapewniają siły biomechaniczne, które powstają w wyniku pracy wszczepu. Pomiedzy kością a powierzchnią implantu nie występuje tkanka bliznowata, chrząstki ani włókna więzadeł. Powodzenie bezpośredniego, strukturalnego i czynnościowego połączenia pomiędzy uporządkowaną, żywą kością a powierzchnią implantu jest silnie zależne od składu chemicznego warstwy tlenkowej na powierzchni wszczepu oraz jej grubości. Fundamentalne znaczenie dla prawidłowego przebiegu osteointegracji posiada więc odpowiednie przygotowanie powierzchni wszczepu. Na szybkość procesu gojenia wywiera wpływ wielkość, kształt oraz chropowatość powierzchni implantu.

Wysoka bioaktywność implantów tytanowych z tkankami twardymi była potwierdzona w badaniach nad ich zdolnością do tworzenia fosforanów wapnia w symulowanych płynach ustrojowych w warunkach *in vitro* [30]. Badania te ujawniły że, po wszczepieniu implantów tytanowych do kości, otaczająca je tkanka stykała się z powierzchnią metalicznego wszczepu na wczesnym etapie,

a siła wiązania kości była duża [30]. Istotnymi czynnikami regulującymi kompatybilność tkanek twardych są adhezja i proliferacja komórek osteogennych, które są silnie zależne od topografii, chropowatości oraz zwilżalności powierzchni implantu [27,31]. Wykazano, że osteogeneza zachodzi w okresie odpowiedzi zapalnej, indukcji osteoblastów i tworzenia kości. Ważne jest również wiązanie między metalami a tkanką miękką w filarach implantów dentystycznych, kotwicach implantów ortodontycznych oraz w śrubach stabilizatorów zewnętrznych [26]. W tych elementach jony metali przenikają z powierzchni biomateriałów w kierunku od wewnątrz na zewnątrz tkanek, dlatego niewystarczające wiązanie tkanek miękkich umożliwia inwazję bakterii wywołujących stan zapalny, a następnie obłuzowanie, ruch i wypadnięcie implantu. W przypadku implantów dentystycznych zdarzenia te znane są jako *peri-implantitis*. Inne wyroby medyczne całkowicie wszczepione w tkanki mogą być pokryte tkanką włóknistą, chyba że wykazano wystarczającą kompatybilność z tkankami miękkimi [30–33]. Udowodniono również, iż chropowatość i/lub porowatość powierzchni biomateriałów odgrywa kluczową rolę w procesie osteointegracji na granicy implant-żywa tkanka. Wykazano, iż zakres optymalnej wielkości porów, które sprzyjają osteointegracji wynosi 50-450  $\mu\text{m}$  [34,35]. W celu poprawy bioaktywności wszczepów osteointegracyjnych i zwiększenia szybkość wzrostu kości oraz ograniczenia przenikania jonów metali do środowiska biologicznego, stosowane są modyfikacje powierzchni tytanu i stopów tytanu przy użyciu różnych metod, w tym mechanicznych, fizycznych, biochemicznych, chemicznych i elektrochemicznych [36]. Metody elektrochemiczne posiadają duży potencjał rozwojowy, gdyż umożliwiają szeroką modyfikację składu chemicznego, morfologii powierzchni oraz są tanie i łatwe do wdrożenia do produkcji na skalę przemysłową.

#### 4. Anodowanie tytanu i jego stopów

Na przełomie ostatnich lat szczególnym zainteresowaniem w dynamicznie rozwijającej się medycynie regeneracyjnej, inżynierii tkanki i implantologii cieszą się nanotechnologie. Ten obszar nauki pozwala na otrzymywanie bionanomateriałów o unikatowych właściwościach i cechach użytkowych [2]. Postęp w dziedzinie nanotechnologii umożliwia obecnie precyzyjne projektowanie w nanoskali powierzchni biomateriałów wykorzystywanych do różnych zastosowań w medycynie, oferując tym samym nowe perspektywy lecznicze dla pacjenta [3]. Nanoinżynierijne powierzchnie posiadają wyjątkową zdolność bezpośredniego oddziaływania komórkowego na ogólną biologiczną odpowiedź wszczepionego biomateriału, dlatego rozwijane

są różne metody modyfikacji powierzchni, aby wytworzyć nanoskalowe powierzchnie na istniejących biokompatybilnych materiałach implantacyjnych [37]. Tytan i jego stopy reprezentują znane w implantologii biomateriały na wszczepy osteointegracyjne. Dodatkowa możliwość wytworzenia na ich powierzchni nanotubularnych warstw tlenkowych czyni je jeszcze bardziej pożądanymi materiałami chirurgicznymi do implantacji. Nanorurki tlenkowe zaliczane są do jednowymiarowych (1D) materiałów, które posiadają co najmniej jeden wymiar w zakresie od 1 do 100 nm i bardzo duży współczynnik proporcji, czyli stosunek długości do średnicy (ang. *high aspect ratio*) zapewniający rozwinięcie powierzchni właściwej [38]. Jednowymiarowe nanorurki tlenkowe mogą być otrzymywane z wykorzystaniem twardej matrycy [38,39], hydro/solwotermalnie [40] na drodze elektroprzędzenia [41] i metodą anodowania [42]. Metoda z wykorzystaniem twardej matrycy pozwala otrzymywać warstwy nanorurek tlenkowych przy użyciu matrycy wykonanej z aluminium, zawierającej pory o określonych rozmiarach, w których przebiega proces wzrostu jednościennych nanorurek  $\text{TiO}_2$  [43]. Do osadzania  $\text{TiO}_2$  w matrycy stosowana jest metoda zol-żel, elektroosadzania i osadzania warstw atomowych [44]. Po zakończonym procesie formowania nanorurek  $\text{TiO}_2$  w formie proszku lub cienkiej warstwy wymagane jest usunięcie matrycy przy zastosowaniu selektywnego rozpuszczania lub odparowania [39]. Negatywną stroną metody z wykorzystaniem twardej matrycy jest uzyskiwanie dużego rozkładu wielkości wytwarzanych nanorurek. Metoda hydro/solwotermalna pozwala otrzymywać wielościennie nanorurki  $\text{TiO}_2$  w formie proszkowej [40]. W procesie syntezy mogą być stosowane nanocząstki  $\text{TiO}_2$  o różnych odmianach polimorficznych (anataz, rutil, brukit), które poddawane są działaniu roztworów alkalicznych wodorotlenku potasu lub sodu w temperaturze z zakresu 100-200 °C przez 1-2 dni. Regulację pH roztworu z utworzonym osadem poniżej 7 przeprowadza się przy użyciu roztworu kwasu solnego. Metodą hydro/solwotermalną można otrzymać rozproszone i nieregularne nanorurki  $\text{TiO}_2$  o wewnętrznej średnicy 2-20 nm i długości do kilku mikrometrów, które występują pojedynczo lub w postaci skupisk. Metoda elektroprzędzenia wymaga do wytworzenia nanorurek  $\text{TiO}_2$  zastosowania stopionych polimerów lub roztworów polimerów oraz prekursora  $\text{TiO}_2$ , które po wyjściu z dyszy przędzalniczej są wyciągane do postaci naładowanych nici przy wykorzystaniu ładunku elektrycznego [41,45]. Po przyłożeniu wysokiego napięcia rzędu kilkudziesięciu kV w roztworze przędzalniczym indukowane są ładunki elektryczne, które przyciąga kolektor o przeciwnej polaryzacji. Ciągłe

nanowłókno prekursorowe jest zbierane na uziemionym kolektorze. Elektroprzędzenie jest metodą wytwarzania jednorodnych włókien o kontrolowanej morfologii i średnicy włókna od dziesiątek nanometrów do setek nanometrów. Wadą elektroprzędzenia jest niedokładne pokrywanie krawędzi elementów o skomplikowanych kształtach, konieczność stosowania wysokich napięć oraz obróbki termicznej wytworzonych włókien w celu usunięcia związków organicznych. Przykładowo, stosując poli(winylopirolidon) rozpuszczony w mieszaninie etanolu i kwasu octowego w obecności prekursora  $\text{TiO}_2$  w postaci tytanianu tetrabutylu możliwe jest otrzymanie nanorurek  $\text{TiO}_2$  o średnicy z zakresu 3-10 nm i strukturze anatazu na drodze elektroprzędzenia przy napięciu 10 kV w temperaturze pokojowej [45]. Tak otrzymane nanowłókna prekursorowe wymagają dodatkowo dwuetapowej obróbki termicznej w powietrzu w temperaturze 200 °C przez 2h, a następnie w 550 °C przez 6 h. Opisanie metody wytwarzania jednowymiarowych nanorurek  $\text{TiO}_2$  są złożone, wieloetapowe, kosztowne i nie zapewniają wysokiej wydajności wytwarzania nanorurek ze względu na ograniczenie do skali laboratoryjnej.

Z aplikacyjnego punktu widzenia jedną z najbardziej obiecujących metod elektrochemicznej modyfikacji samopasywnych warstw tlenkowych na powierzchni biomateriałów tytanowych, która umożliwia kontrolowane wytwarzanie samoorganizujących się nanotubularnych struktur tlenkowych o szerokim wachlarzu parametrów morfologicznych jest anodowanie. Jednowymiarowe warstwy tlenkowe w postaci matrycy uporządkowanych, ustawionych pionowo nanorurek tlenkowych otrzymane metodą anodowania wykazują liczne, unikatowe właściwości w porównaniu do konwencjonalnych, ultracienkich i ciągłych warstw tlenkowych [46,47]. Doniesienia literaturowe wskazują, że obecność anodowych warstw nanorurek tlenkowych na powierzchni implantów tytanowych zwiększa adhezję i proliferację osteoblastów oraz poprawia odporność korozyjną i bioaktywność [38,44,47–50]. Ponadto anodowe warstwy nanorurek tlenkowych dzięki swojej unikatowej budowie mogą stanowić systemy kontrolowanego uwalniania substancji przeciwzapalnych, antybakteryjnych, tkankotwórczych, bądź przeciwzakrzepowych [38,44,47–50].

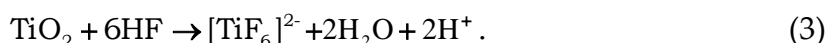
Istotną zaletą anodowania w stosunku do pozostałych metod wytwarzania warstw nanorurek tlenkowych jest możliwość precyzyjnej kontroli kształtu, struktury i morfologii otrzymywanych nanorurek poprzez kontrolowanie parametrów procesu utleniania elektrochemicznego [51–53]. Na przykład napięcie anodowania można zastosować do kontrolowania średniej

średnicy wewnętrznej i zewnętrznej nanorurek, podczas gdy za pomocą czasu anodowania można sterować średnią długością nanorurek. Z kolei lepkość, pH i stężenie jonów fluorkowych w roztworze wpływa na rozpuszczanie tlenku i szybkość reakcji chemicznej. Parametry te mają bezpośredni wpływ na szybkość tworzenia nanorurek, maksymalną osiągalną długość nanorurek i gładkość ścian nanorurek. Natomiast zawartość wody w roztworze pozwala kontrolować siłę przyczepności między matrycami nanorurek a utlenianym podłożem tytanowym.

Nanotubularne struktury tlenkowe można wytworzyć metodą anodowania na powierzchni metali wykazujących zdolność do samopasywacji, do których należy tytan, niob i cyrkon oraz na powierzchni ich stopów [50,54]. Roztwór elektrolitu do anodowania zazwyczaj zawiera jony fluorkowe pochodzące od HF lub NH<sub>4</sub>F [44,48]. Crawford i in. [55] zaproponowali mechanizm anodowania tytanu w elektrolitach zawierających jony F<sup>-</sup>, w którym zachodzą trzy kolejne etapy. W pierwszym etapie po przyłożeniu odpowiedniego napięcia lub gęstości prądowej do anody zachodzi utlenianie tytanu (reakcja 1). W wyniku reakcji jonów Ti<sup>4+</sup> z jonami OH<sup>-</sup> i O<sup>2-</sup> tworzy się cienka i ciągła warstwa TiO<sub>2</sub> na powierzchni anody (reakcja 2):



Wzrost warstwy TiO<sub>2</sub> jest wspomagany działaniem pola elektrycznego i zachodzi w wyniku migracji jonów Ti<sup>4+</sup> przez powstającą warstwę tlenkową w kierunku elektrolitu oraz transportu jonów O<sup>2-</sup> w kierunku powierzchni anody. Pierwszy etap trwa zaledwie od kilku do kilkudziesięciu sekund i charakteryzuje się wykładniczym spadkiem gęstości prądu anodowania, który jest spowodowany wzrostem grubości barierowej warstwy TiO<sub>2</sub> [56]. W drugim etapie jony F<sup>-</sup> zaadsorbowane na powierzchni warstwy tlenkowej migrują w jej głąb, co powoduje lokalne roztwarzanie warstwy TiO<sub>2</sub> i w konsekwencji powstanie nieregularnych porów. Wynikiem drugiego etapu jest utworzenie nierozpuszczalnych kompleksów [TiF<sub>6</sub>]<sup>2-</sup> (reakcja 3):



W roztworach bezfluorkowych zarówno grubość warstwy barierowej jak i mierzona gęstość prądu osiągają stan ustalony. W elektrolitach zawierających jony fluorkowe zaczyna się tworzyć nanoporowata struktura w wyniku

chemicznego rozpuszczania barierowej warstwy tlenkowej (reakcja 3). W drugim etapie obserwuje się niewielki wzrost wartości gęstości prądu anodowania w obecności jonów  $F^-$ , który wynika ze zmniejszenia grubości warstwy  $TiO_2$ . Utworzone pory zaczynają się rozgałęziać, nachodzić na siebie oraz konkurować o dostępny prąd. W trzecim etapie po ustabilizowaniu wartości gęstości prądu anodowania matryca nanorurek kształtuje się w optymalnych warunkach prądowo-napięciowych, w których prąd rozdzielany jest równomiernie pomiędzy porami prowadząc do samoczynnego porządkowania porowatej warstwy. Dalsze anodowanie zwiększa długość nanorurek, a gęstość prądu anodowego nie wpływa znacząco na strukturę otrzymywanych warstw nanorurek  $TiO_2$  [42,44,53,55]. Tworzenie nanorurek  $TiO_2$  w elektrolitach zawierających jony  $F^-$  jest więc wynikiem dwóch konkurujących procesów wspomaganych polem elektrycznym, a mianowicie hydrolizy  $Ti$  z utworzeniem  $TiO_2$  (reakcja 2) i chemicznego rozpuszczania  $TiO_2$  na granicy międzyfazowej tlenek/elektrolit (reakcja 3), co skutkuje utworzeniem  $[TiF_6]^{2-}$  (reakcja 3). Proces wzrostu nanorurek  $TiO_2$  przebiega poprzez tworzenie początkowej warstwy barierowej, tworzenie równomiernie rozmieszczonych porów oraz rozdzielanie połączonych ze sobą porów na nanorurki. Szczegółowe zrozumienie dokładnych mechanizmów powstawania uporządkowanych nanorurek tlenkowych wciąż nie jest jasne [55].

Wybór elektrolitu, w którym przeprowadza się proces anodowania wywiera największy wpływ na mikrostrukturę i właściwości uzyskiwanych warstw nanorurek tlenkowych [57]. Na przestrzeni ostatniej dekady wyodrębniono cztery generacje nanorurek tlenkowych otrzymywanych na powierzchni tytanu i jego stopów [34]. Po raz pierwszy warstwa nanorurek tlenkowych na powierzchni tytanu została otrzymana metodą anodowania w 1999 roku przez Zwillinga i in. [58], którzy wytworzyli nanotubularne struktury przy użyciu wodnego elektrolitu zawierającego kwas fluorowodorowy oraz kwas chromowy. Otrzymane w tych warunkach warstwy  $TiO_2$  były niejednorodne i charakteryzowały się niewielką długością około 500-600 nm ze względu na dużą szybkość chemicznego rozpuszczania ditlenku tytanu w roztworze HF. Gong i in. [59] wykazali, że elektroda tytanowa anodowana w 0,5% roztworze HF pod napięciem 20 V przez 6 godzin posiada taką samą grubość jak elektroda anodowana tylko przez 20 minut w identycznych warunkach. Obecnie warstwy nanorurek tlenkowych pierwszej generacji otrzymuje się z wodnych elektrolitów, które zawierają w swoim składzie kwas fluorowodorowy lub jego sól w ilości od 0,1 do 1% wag. lub przy

zastosowaniu mieszanin HF z innymi kwasami, takich jak  $\text{HNO}_2 + \text{HF}$ ,  $\text{HNO}_3 + \text{HF}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HF}$ ,  $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{HF}$  czy  $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{HF}$  o stężeniu nie większym niż 1M [60]. Nanotubularne struktury tlenkowe należące do pierwszej generacji mogą być również otrzymywane z elektrolitu na bazie kwasu octowego z dodatkiem 0,2%  $\text{H}_2\text{O}$  i 0,5%  $\text{NH}_4\text{F}$  [61]. Warstwy nanorurek tlenkowych otrzymywane w takich elektrolitach mają ograniczoną grubość rzędu kilkuset nanometrów i wykazują niski stopień uporządkowania powierzchni.

Wysoce uporządkowane warstwy nanorurek tlenkowych drugiej generacji o długości nanorurek do 2-3  $\mu\text{m}$  można wytworzyć z wodnych roztworów buforowych o zmiennej wartości pH, które zawierają w swoim składzie dodatek soli fluoru w postaci NaF, KF lub  $\text{NH}_4\text{F}$  zamiast HF w ilości około 0,5% wag [62]. Zastosowanie tak dobranych elektrolitów ma na celu spowolnienie szybkości chemicznego rozpuszczania warstw tlenkowych, które zachodzi szybko w roztworach kwasów, przez co wzrost nanorurek jest ograniczony. Stężenie jonów fluorkowych określa szybkość rozpuszczania i musi być utrzymywane na jak najniższym poziomie, ale wystarczająco wysokim, aby zapewnić wzrost nanorurek, gdyż stężenie jonów  $\text{F}^-$  wpływa również na pH roztworu. Najczęściej stosowane elektrolity do otrzymywania nanorurek tlenkowych drugiej generacji to mieszaniny 1M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  z dodatkiem 0,5% wag. NaF oraz 1M  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$  z dodatkiem 0,5% wag.  $\text{NH}_4\text{F}$  [61,63]. Optymalna wartość pH takich roztworów wynosi 3-5. Przy wartościach pH powyżej 5 podczas anodowania tytanu i jego stopów zachodzi zwiększona hydroliza jonów tytanu oraz obserwuje się osadzanie mieszaniny wodorotlenków tytanu na powierzchni warstw nanorurek tlenkowych, która jest trudna do usunięcia nawet przy zastosowaniu myjki ultradźwiękowej.

Warstwy nanorurek tlenkowych trzeciej generacji otrzymuje się z elektrolitów zawierających w swoim składzie organiczne rozpuszczalniki polarne, takie jak formamid, N-metyloformamid, glikol etylenowy, glikol dietylenowy, dimetylosulfotlenek, metanol i glicerol wraz z dodatkiem źródła jonów fluoru w postaci 1-6% wag. HF, 0,6% wag.  $\text{NH}_4\text{F}$  lub czwartorzędowych soli amoniowych fluoru oraz niewielkiej ilości  $\text{H}_2\text{O}$  (1-5%) [52]. Zawartość wody w wodnych elektrolitach odpowiada za szybkość rozpuszczania górnej powierzchni nanorurek tlenkowych, dlatego zmniejszenie ilości wody w tych elektrolitach powoduje wzrost długości uzyskiwanych nanorurek nawet do 1000  $\mu\text{m}$ . W przypadku niektórych elektrolitów zawierających glicerol lub metanol stosuje się większe ilości  $\text{H}_2\text{O}$  (25-50%). Elektrolity na bazie glicerolu zawierające różne ilości  $\text{H}_2\text{O}$  charakteryzują się zróżnicowaną lepkością, co



pozwała kształtować morfologię i właściwości otrzymywanych nanotubularnych warstw tlenkowych. Wykazano, że nanorurki tlenkowe trzeciej generacji o bardzo gładkich ściankach można otrzymać z elektrolitów zawierających glikol etylenowy [52].

Nanorurki tlenkowe czwartej generacji otrzymywane są przy zastosowaniu rozwijanej ostatnio techniki RBA (ang. *rapid breakdown anodization*) z elektrolitów, które nie zawierają jonów fluorkowych, głównie z wodnego roztworu HCl o stężeniu 0,15M lub mieszaniny 0,5M HCl i 0,1-0,4 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [64,65]. Długość nanorurek tlenkowych czwartej generacji dochodzi zazwyczaj do kilkuset nanometrów i wytwarza się je w bardzo krótkim czasie rzędu kilku minut [66]. Przeprowadzono również anodowanie tytanu w elektrolitach, które były mieszaniną 0,4M NH<sub>4</sub>Cl i 0,5M HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CCl<sub>3</sub>COOH lub C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub> [67]. Długość wytworzonych cienkich nanorurek tlenkowych o niewystarczającej adhezji do podłoża osiągała do 60 μm, podobnie jak w przypadku zastosowania elektrolitu zawierającego 0,1M HClO<sub>4</sub> [65,68].

Warstwy nanorurek tlenkowych na biomedycznym stopie Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr wytwarzano dotychczas w procesie anodowania stosując elektrolit stanowiący mieszaninę 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> oraz 0,3% wag. HF przy napięciu 20 V w czasie 0,5 h w dwuetapowym utlenianiu [69,70]. Przed procesem anodowania stosowano gazowe utlenianie w warunkach od 700-1100 °C przez 5 h. W takich warunkach otrzymano struktury nanorurkowe o średnicy 40-120 nm i długości 1-2 μm.

Do uzyskania nanotubularnych struktur na stopie Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr stosowano również elektrolit będący mieszaniną 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 34.5mM HF przy napięciu 20 V oraz czasie anodowania 5 i 60 min [71]. W trakcie anodowania przez 5 min otrzymano nanorurki o grubości 71 nm i średnicy około 25 nm. Zwiększając 12-krotnie czas utleniania anodowego uzyskano długość nanorurek dochodzącą do 900 nm i średnicę nanorurek w zakresie od 75 do 100 nm.

Warto zaznaczyć, że geometria nanotubularnych warstw tlenkowych podczas procesu anodowania może być różnie modyfikowana poprzez zmianę napięcia. Możliwe jest otrzymanie geometrii, takich jak stopy nanorurek, nanorurki bambusowe, nano-koronki, nanorurki z rozgałęzieniami, czy dwuścienne nanorurki [44]. Natomiast zastosowanie obróbki termicznej w atmosferze powietrza, tlenu lub azotu w temperaturze 300–500 °C z powolną szybkością ogrzewania i chłodzenia 1–5 °C/min pozwala kształtować strukturę warstw tlenkowych na tytanie i jego stopach [44]. Anodowe warstewki TiO<sub>2</sub> są zazwyczaj rentgenowsko amorficzne, a w wyniku procesu wyżarzania możliwe jest uzyskanie struktury anatazu. Ponadto anodowanie jest jedną z najtańszych

i najprostszych metod uzyskiwania wysoce uporządkowanych nanorurek tlenkowych. Metoda ta zapewnia równomierne pokrywanie warstwą tlenkową całej powierzchni implantów o złożonym kształcie, takich jak śruby implantów dentystycznych lub implanty biodrowe. Anodowe wytwarzanie jednorodnych warstw nanorurek tlenkowych nie wymaga prowadzenia procesu w atmosferze ochronnej ani w wysokich temperaturach, które mogą prowadzić do zmian strukturalnych w materiale podłoża. Cechuje się też niskim kosztem odczynników oraz aparatury, łagodnym środowiskiem reakcyjnym, krótkim czasem procesu anodowania oraz wyeliminowaniem etapu osadzania, ponieważ warstwy nanorurek tlenkowych wyrastają bezpośrednio na podłożu tytanowym. Anodowanie jest prostą, opłacalną, łatwo skalowalną metodą, która pozwala otrzymywać wysoce uporządkowane matryce nanorurek wyrównanych pionowo i staje się standardową metodą syntezy nanorurek tlenkowych.

#### 5. Nanorurki tlenkowe i ich biomedyczne zastosowanie

Żywotność funkcjonalna obecnie stosowanych tytanowych implantów ortopedycznych wynosi zaledwie 10–15 lat, co wynika z różnych przyczyn, w tym aseptycznego obłuzowania powodowanego słabą osteointegracją lub braku długotrwałego wiązania implantu z sąsiadującą kością, infekcji i osteolizy [20]. W celu poprawy poimplantacyjnej integracji wszczepów z otaczającymi tkankami, możliwe jest zastosowanie anodowych warstw nanorurek tlenkowych, które mogą dodatkowo pełnić rolę nośnika leków w systemach kontrolowanego dostarczania leków, zmniejszających infekcje (np. penicylina/streptomycyna) lub wygaszających stany zapalne (np. deksametazon) z czasem elucji leku do 3 dni. W badaniach *in vitro* wykazano, iż topografia warstw nanorurek tlenowych obecnych na powierzchni implantu tytanowego poprawiła proliferację i adhezję osteoblastów w porównaniu z powierzchnią wszczepu tytanowego, który nie był poddany anodowaniu [72]. Zwiększona aktywność komórkowa *in vitro* wykazana dla nanorurek  $\text{TiO}_2$  przełożyła się również na wiązanie kości *in vivo*. Powierzchnie warstw nanorurek tlenkowych poprawiły aż dziewięciokrotnie siłę wiązania kości w porównaniu z powierzchniami poddanymi obróbce strumieniowości [73]. Wyniki badań *in vitro* anodowych warstw nanorurek tlenkowych, które były otrzymane na różnych stopach tytanu sugerują możliwość ich zastosowania w ortopedycznej terapii komórkowej [74]. Wykazano też, że modyfikacja powierzchni tytanowych stentów pęcherza moczowego metodą anodowania pozwoliła otrzymać warstwę nanorurek tlenkowych o średnicy

20 nm, której topografia powierzchni wpływa na zwiększenie adhezji i wzrostu ludzkich komórek nabłonka dróg moczowych do 3 dni w przeprowadzonej hodowli [47]. Uzyskane wyniki wskazują, że badania w zakresie elektrochemicznej modyfikacji powierzchni tytanu i jego stopów w celu wytwarzania nanotubularnych struktur tlenkowych są obiecujące i konieczne do dalszego rozwoju bionanomateriałów. Warstwy nanorurek  $\text{TiO}_2$  wydają się być również obiecującym materiałem stykowym, zapewniającym długotrwały sukces implantów mających kontakt z krwią. Badania nad interakcjami komórkowymi zależnymi od wielkości nanorurek tlenkowych wykazały, że mezenchymalne komórki macierzyste reagują w bardzo wyraźny sposób na średnicę nanorurek [75]. Nanorurki  $\text{TiO}_2$  o średnicy wynoszącej około 15 nm silnie promowały adhezję komórek, proliferację i różnicowanie, natomiast nanorurki tlenkowe o średnicy około 100 nm okazały się szkodliwe, ponieważ indukowały zaprogramowaną śmierć komórkową (apoptozę) [47,76]. Wynikiem tych prac były dalsze badania, które przyniosły częściowo sprzeczne wyniki i w związku z tym postawiono szereg pytań dotyczących roli struktury krystalicznej  $\text{TiO}_2$ , stężenia jonów  $\text{F}^-$  czy typu i rodzaju komórek oraz obróbki wstępnej [47,77]. Jednak późniejsze prace wykazały wyraźnie, że efekt wielkości, czyli wpływ stymulujący komórki w przypadku warstw nanorurek tlenkowych o średnicy 15 nm, posiada charakter praktycznie uniwersalny [78]. Nie tylko mezenchymalne komórki macierzyste, ale także hematopoetyczne komórki macierzyste, komórki śródbłonka, a także osteoblasty i osteoklasty wykazują tę selektywną pod względem wielkości odpowiedź. W rzeczywistości efekt rozmiaru nanorurek tlenkowych dominuje nad strukturą krystaliczną  $\text{TiO}_2$  (amorficzna/anataz/rutyl). Podobne efekty obserwowano dla nanorurek  $\text{ZrO}_2$  otrzymanych metodą anodowania na powierzchni cyrkonu. Ze względu na szybką integrację biomedycznych implantów z kością, kluczowym czynnikiem jest szybka kinetyka tworzenia się na powierzchni implantów hydroksyapatytu (HAp) w płynach ustrojowych [79,80]. Szereg badań potwierdziło, że tworzenie HAp może być znacznie przyspieszone na powierzchniach nanorurek tlenkowych w porównaniu z samopasywną warstwą  $\text{TiO}_2$  na powierzchni implantów tytanowych, i także w tym przypadku obserwuje się silny efekt zależności od wielkości średnicy [81–84]. Ponadto geometria nanorurek tlenkowych jest optymalna do osadzania prekursorów HAp, które dodatkowo promują zarodkowanie HAp [82]. W badaniach *in vivo* z dorosłymi świnią domowymi wykazano też, że powierzchnie warstw nanorurek tlenkowych mogą zwiększać ekspresję kolagenu typu I i BMP-2 oraz że można uzyskać większą

powierzchnię kontaktu implantu z kością, jeśli powierzchnia implantów jest pokryta warstwą nanorurek  $\text{TiO}_2$  [44]. Shrestha i in. [85] wykazali, że nanorurki  $\text{TiO}_2$  mogą być wypełniane cząstkami  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  i dzięki temu mogą być magnetycznie kierowane w wybrane miejsca organizmu. Takie próbki można następnie łatwo powlekać lekami, które są przyłączane przez odpowiednie cząsteczki łącznikowe. Uwalnianie leku nie ogranicza się do reakcji UV, ale może być również wyzwalone elektrycznie (kataliza indukowana napięciem) lub co ważniejsze, za pomocą promieni rentgenowskich, co umożliwia leczenie *in vivo* przez żywą tkankę. Takie magnetyczne nanorurki  $\text{TiO}_2$  można stosować bezpośrednio do reakcji fotokatalitycznych z komórkami lub tkankami, na przykład do selektywnego zabijania komórek nowotworowych [85]. Najnowsze prace pokazują, że w celu osiągnięcia powolnego uwalniania substancji leczniczej, wymagane jest zamknięcie wypełnionych lekiem układów nanorurkowych lub porowatych biopolimerem jak np. poli(kwas mlekowy) [86]. Zmodyfikowane w ten sposób cylindryczne lub jeszcze lepiej mezoporowate warstwy anodowe na powierzchni tytanowych implantach lub stentach mogą stanowić wydajne i obiecujące systemy uwalniania leku. W przypadku zastosowań nanorurek tlenkowych dotyczących stentów istotną wadą jest nieco ograniczona elastyczność mechaniczna warstw nanorurek w porównaniu z innymi mezoporowatymi warstwami tlenkowymi [44]. Doniesienia literaturowe wskazują też, że nanorurki tlenkowe o kontrolowanej średnicy (amorficzne lub krystaliczne) wykazują znacząco zmienione reakcje zarówno dla *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) jak i *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) – patogenów istotnych dla infekcji ortopedycznych [87]. Podobna tendencja obserwowana była w przypadku bakterii, ponieważ nanorurki tlenkowe o średnicy większej niż 20 nm zmniejszały liczbę żywych bakterii (*S. aureus* i *S. epidermidis*). Dalsze badania wykazały, że niezależnie od zastosowanej techniki sterylizacji, warstwy nanorurek tlenkowych o mniejszej średnicy (20 nm) silniej ograniczały wzrost bakterii w porównaniu z warstwami nanorurek o większej średnicy (80 nm). W przypadku stosowania stopów tytanu zawierających pierwiastki mogące hamować rozwój bakterii (np. cyrkon), nanorurki tlenkowe o mniejszej średnicy wykazywały zwiększone działanie przeciwbakteryjne wobec *E. coli* [87].

Wychodząc na przeciw współczesnym wyzwaniom dynamicznie rozwijającej się medycyny regeneracyjnej i implantologii w poniższej pracy doktorskiej podjęta została próba opracowania innowacyjnego biomateriału na

bazie biomedycznego stopu Ti13Nb13Zr do zastosowań na implanty osteointegracyjne o zwiększonej biofunkcjonalności.

6. *Literatura:*

1. Piotrowska K, Madej M, Ozimina D. Assessment of tribological properties of Ti13Nb13Zr titanium alloy used in medicine. *Tribologia*, 2019, 285(3), 97-106. DOI:10.5604/01.3001.0013.5440.
2. Garimella R, Eltorai AEM. Nanotechnology in orthopedics. *J. Orthop.*, 2017, 14(1), 30–33. DOI:10.1016/j.jor.2016.10.026.
3. Jafari S, Mahyad B, Hashemzadeh H, Janfaza S, Gholikhani T, Tayebi L. Biomedical applications of TiO<sub>2</sub> nanostructures: Recent advances. *Int. J. Nanomedicine*, 2020, 15, 3447–3470. DOI:10.2147/ijn.s249441.
4. Jha RK, Jha PK, Chaudhury K, Rana SVS, Guha SK. An emerging interface between life science and nanotechnology: Present status and prospects of reproductive healthcare aided by nano-biotechnology. *Nano Rev.*, 2014, 5(1), 22762. DOI:10.3402/nano.v5.22762.
5. Hanawa T. Titanium – tissue interface reaction and its control with surface treatment. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2019, 7, DOI:10.3389/fbioe.2019.00170.
6. Choroszyński M, Choroszyński MR, Skrzypek SJ. Biomaterials for hip implants – important considerations relating to the choice of materials. *Bio-Algorithms and Med-Systems*, 2017, 13(3), 133–145. DOI:10.1515/bams-2017-0017.
7. Aherwar A, Singh AK, Patnaik A. Current and future biocompatibility aspects of biomaterials for hip prosthesis. *AIMS Bioengineering*, 2016, 3(1), 23–43. DOI:10.3934/bioeng.2016.1.23.
8. Verma RP. Titanium based biomaterial for bone implants: A mini review. *Mater. Today Proc.*, 2020, 26(1). DOI:10.1016/j.matpr.2020.02.649.
9. Prasad S, Ehrensberger M, Prasad M, Kim H. Biomaterial properties of titanium in dentistry. *J. Oral Biosci.*, 2015, 57(4), 192–199. DOI:10.1016/j.job.2015.08.001.
10. Prasad K, Bazaka O, Chua M, Rochforf M, Fedrik L, Spoor J, Symes R, Tieppo M, Collins C, Cao A, Markwel D, Bazaka K. Metallic biomaterials : current challenges and opportunities. *Materials.*, 2017, 10, 884. DOI:10.3390/ma10080884.
11. Asri RIM, Harun WSW, Samykano M. Corrosion and surface modification on biocompatible metals: A review. *Mater. Sci. Eng. C*. 2017. 77, 1261–1274. DOI: 10.1016/j.msec.2017.04.102.
12. Chen Q, Thouas GA. Metallic implant biomaterials. *Mater. Sci. Eng. R*. 2015, 87, 1–57. DOI:10.1016/j.mser.2014.10.001.

13. Urbańczyk E, Krząkała A, Kazek-Kęsik A, Michalska J, Stolarczyk A, Dercz G, Simka W. Electrochemical modification of Ti–13Nb–13Zr alloy surface in phosphate based solutions. *Surf. Coat. Technol.*, 2016, 291, 79–88. DOI:10.1016/j.surfcoat.2016.02.025.
14. Exley C. The toxicity of aluminium in humans. *Morphologie*, 2016, 100(329), 51–55. DOI:10.1016/j.morpho.2015.12.003.
15. Chen Q, Thouas GA. Metallic implant biomaterials. *Mater. Sci. Eng. R.* 2015, 87, 1–57 DOI:10.1016/j.mser.2014.10.001.
16. Rhoads LS, Silkworth WT, Roppolo ML, Whittingham MS. Cytotoxicity of nanostructured vanadium oxide on human cells in vitro. *Toxicol. Vitro.*, 2010, 24(1), 292–296. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.08.010.
17. Szklarska M, Dercz G, Simka W, Łosiewicz B. A.c. impedance study on the interfacial properties of passivated Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution. *Surf. Interface Anal.*, 2014, 46(10-11), 698–701. DOI:10.1002/sia.5383.
18. Dąbrowski R. *Mikrostruktura i własności stopu Ti13Nb13Zr do zastosowań biomedycznych*. W: 12 *Mechanika w Medycynie*, red. Leniowska L, Korzyński M, Cwanek J, Wydawnictwo: Uniwersytet Rzeszowski, 2014, Rzeszów, str. 54–63, ISBN: 978-83-63151-21-8.
19. Zasińska K, Piątkowska A. Ocena zużycia ściernego stopu Ti13Nb13Zr implantowanego jonami azotu, przeznaczonego na elementy trące w endoprotezach ortopedycznych. *Tribologia*, 2015, 264(6), 175–186.
20. Gepreel MA, Niinomi M. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2013, 20, 407–415. DOI:10.1016/j.jmbbm.2012.11.014.
21. Eliaz N. Corrosion of Metallic Biomaterials : A Review. *Materials.*, 2019, 12, 407. DOI: 10.3390/ma12030407.
22. Handzlik P, Gutkowski K. Synthesis of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy by the electrochemical method. *J. Porous Mater.*, 2019, 26(6), 1631–1637. DOI:10.1007/s10934-019-00759-1.
23. Niinomi M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2008, 1(1), 30–42. DOI:10.1016/j.jmbbm.2007.07.001.
24. Souza W De, Grenho L, Rocha LA. Titanium dioxide nanoparticles affect osteoblast-derived exosome cargos and impair osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biomater. Sci.*, 2023, 11, 2427–2444. DOI: 10.1039/d2bm01854c.
25. Williams D, Zhang X, editors. *Definitions of biomaterials for the twenty-first century*. Elsevier Inc., Amsterdam, 2019, ISBN: 978-0-12-818291-8. DOI:10.1016/C2018-0-02529-3.

26. Shah FA, Thomsen P, Palmquist A. A Review of the impact of implant biomaterials on osteocytes. *J. Dent. Res.*, 2018, 97(9), 977–986. DOI:10.1177/0022034518778033.
27. Shah FA, Thomsen P, Palmquist A. Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface. *Acta Biomater.*, 2019, 84, 1–15. DOI:10.1016/j.actbio.2018.11.018.
28. Brånemark PI, Chien S, Gröndahl HG, Robinson K, editors. *The osseointegration book: From calvarium to calcaneus*. Quintessence Publishing Co. Ltd., Hanover Park, IL, 2005, ISBN 978-1-85097-090-3.
29. Albrektsson T, Brånemark P, Hansson H, Lindström J. Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop. Scand.*, 2009, 6470, 155–170. DOI: 10.3109/17453678108991776.
30. Rupp F, Liang L, Geis-Gerstorfer J, Scheideler L, Hüttig F. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dent. Mater.*, 2017, 34(1), 40–57. DOI:10.1016/j.dental.2017.09.007.
31. Civantos A, Martínez-Campos E, Ramos V, Elvira C, Gallardo A, Abarrategi A. Titanium coatings and surface modifications: Toward clinically useful bioactive implants. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2017, 3(7), 1245–1261. DOI:10.1021/acsbiomaterials.6b00604.
32. Hanawa T. Titanium – tissue interface reaction and its control with surface treatment. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2019, 7, DOI:10.3389/fbioe.2019.00170.
33. Williams D, Zhang X, editors. *Definitions of biomaterials for the twenty-first century*. Elsevier Inc., Amsterdam, 2019, ISBN: 978-0-12-818291-8. DOI:10.1016/C2018-0-02529-3.
34. Ainouche L, Hamadou L, Kadri A, Benbrahim N, Bradai D. Interfacial barrier layer properties of three generations of TiO<sub>2</sub> nanotube arrays. *Electrochim. Acta*, 2014, 133, 597–609. DOI:10.1016/j.electacta.2014.04.086.
35. Simka W, Krzakała A, Masełbas M, Dercz G, Szade J, Winiarski A, Michalska J. Formation of bioactive coatings on Ti–13Nb–13Zr alloy for hard tissue implants. *RSC Adv.*, 2013, 3(28), 11195. DOI:10.1039/c3ra23256e.
36. Wei G, Tan M, Attarilar S. An overview of surface modification , a way toward fabrication of nascent biomedical Ti6Al4V alloys. *J. Mater. Res. Technol.*, 2023, 24, 5896–5921. DOI: 10.1016/j.jmrt.2023.04.046.
37. Mundra RV, Wu X, Sauer J, Dordick JS, Kane RS. Nanotubes in biological applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2014, 28, 25–32. DOI:10.1016/j.copbio.2013.10.012.
38. Lee K, Mazare A, Schmuki P. One-dimensional titanium dioxide nanomaterials: Nanotubes. *Chem. Rev.*, 2014, 114(19), 9385–9454. DOI:10.1021/cr500061m.

39. Ge M, Li Q, Cao C. One-dimensional TiO<sub>2</sub> Nanotube photocatalysts for solar water splitting. *Adv. Sci. news.*, 2017, 4, 1–3. DOI: 10.1002/advs.201600152.
40. Liu N, Chen X, Zhang J, Schwank JW. A review on TiO<sub>2</sub>-based nanotubes synthesized via hydrothermal method: Formation mechanism, structure modification, and photocatalytic applications. *Catal. Today.*, 2014, 225, 34–51. DOI:10.1016/j.cattod.2013.10.090.
41. Wan T, Ramakrishna S, Liu Y. Recent progress in electrospinning TiO<sub>2</sub> nanostructured photo-anode of dye-sensitized solar cells. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2018, 45649, 1–10. DOI: 10.1002/app.45649.
42. Macak JM, Tsuchiya H, Ghicov A, Yasuda K, Hahn R, Bauer S, Schmuki P. TiO<sub>2</sub> nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 2007, 11(1–2), 3–18. DOI: 10.1016/j.cossms.2007.08.004.
43. Aher SS, Songire PR, Saudagar RB. Formulation and evaluation of controlled release matrix tablet of a model antibiotic drug. 2016, 6(4), 223–229. DOI: 10.5958/2231-5659.2016.00031.X.
44. Roy P, Berger S, Schmuki P. TiO<sub>2</sub> nanotubes: Synthesis and applications. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, 50(13), 2904–2939. DOI: 10.1002/anie.201001374.
45. Qian X, Yang X, Jin L, Rao D, Yao S, Shen X, Xiao K, Qin S XJ. High rate lithium-sulfur batteries enabled by mesoporous TiO<sub>2</sub> nanotubes prepared by electrospinning. *Mater. Res. Bull.*, 2017, 95, 402–408. DOI: 10.1016/j.materresbull.2017.07.009.
46. Wu B, Tang Y, Wang K, Zhou X, Xiang L. Nanostructured titanium implant surface facilitating osseointegration from protein adsorption to osteogenesis : the example of TiO<sub>2</sub> NTAs. *Int. J. of Nanomedicine.*, 2022, 1865–1879.
47. Kulkarni M, Mazare A, Gongadze E, Perutkova Š, Kralj-iglič V, Milošev I, Schmuki P, Iglič A, Mozetič, M. Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology.*, 2015, 26(6), 062002. DOI:10.1088/0957-4484/26/6/062002.
48. Sobieszczyk S. Self-organized nanotubular oxide layers on Ti and Ti alloys. *Adv. Mater. Sci.*, 2009, 9(2), 25–41. DOI:10.2478/v10077-009-0008-y.
49. Yan X, Chen X. Titanium dioxide nanomaterials. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 2015, 1–38. DOI:10.1002/9781119951438.eibc2335.
50. Huo K, Gao B, Fu J, Zhao L, Chu PK. Fabrication, modification, and biomedical applications of anodized TiO<sub>2</sub> nanotube arrays. *RSC Adv.*, 2014, 4(33), 17300.
51. Lorenzetti M, Gongadze E, Kulkarni M, Junkar I, Iglič A. Electrokinetic properties of TiO<sub>2</sub> nanotubular surfaces. *Nanoscale Res. Lett.*, 2016, 11(1), 378. DOI:10.1186/s11671-016-1594-3.



52. Kulkarni M, Mazare A, Schmuki P, Iglíč A. Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. *Nanomedicine.*, 111–136.
53. Awad NK, Edwards SL, Morsi YS. A review of TiO<sub>2</sub> NTs on Ti metal: Electrochemical synthesis, functionalization and potential use as bone implants. *Mater. Sci. Eng. C.*, 2017, 76, 1401–1412. DOI: 10.1016/j.msec.2017.02.150.
54. Cipriano AF, Miller C, Liu H. Anodic growth and biomedical applications of TiO<sub>2</sub> nanotubes. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2014, 10(10), 2977–3003. DOI:10.1166/jbn.2014.1927.
55. Crawford GA, Chawla N, Das K, Bose S, Bandyopadhyay A. Microstructure and deformation behavior of biocompatible TiO<sub>2</sub> nanotubes on titanium substrate. *Acta Biomater.*, 2007, 3(3), 359–367. DOI:10.1016/j.actbio.2006.08.004.
56. Sobieszczyk S. Self-organized nanotubular oxide layers on Ti and Ti alloys. *Adv. Mater. Sci.*, 2009, 9(2), 25–41. DOI:10.2478/v10077-009-0008-y.
57. Roy P, Berger S, Schmuki P. TiO<sub>2</sub> nanotubes: Synthesis and applications. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, 50(13), 2904–2939. DOI: 10.1002/anie.201001374.
58. Zwillig V, Aucouturier M, Darque-Ceretti E. Anodic oxidation of titanium and TA6V alloy in chromic media. An electrochemical approach. *Electrochim. Acta.*, 1999, 45(6), 921–929. DOI:10.1016/S0013-4686(99)00283-2.
59. Gong D, Grimes CA, Varghese OK, Hu W, Singh RS, Chen Z, Dickey EC. Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. *J. Mater. Res.*, 2001, 16, 3331–3334. DOI:10.1557/JMR.2001.0457.
60. Jakubowicz J, Jurczyk K, Jurczyk M. Electrochemical formation and corrosion properties of porous TiO<sub>x</sub> biomaterials. *Mater. Sci. Forum.*, 2010, 636–637, 15–21. DOI: 10.4028/www.scientific.net/MSF.636-637.15.
61. Sreekantan S, Lockman Z, Hazan R, Tasbihi M, Tong LK, Mohamed AR. Influence of electrolyte pH on TiO<sub>2</sub> nanotube formation by Ti anodization. *J. Alloys Compd.*, 2009, 485(1–2), 478–483. DOI: 10.1016/j.jallcom.2009.05.152.
62. Macak JM, Sirotna K, Schmuki P. Self-organized porous titanium oxide prepared in Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/NaF electrolytes. *Electrochim. Acta.*, 2005, 50(18), 3679–3684. DOI: 10.1016/j.electacta.2005.01.014.
63. Balakrishnan M, Narayanan R. Synthesis of anodic titania nanotubes in Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/NaF electrolyte: A comparison between anodization time and specimens with biomaterial based approaches. *Thin Solid Films.*, 2013, 540, 23–30. DOI:10.1016/j.tsf.2013.05.122.
64. Regonini D, Bowen CR, Jaroenworarluck A, Stevens R. A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Mater. Sci. Eng. R Reports.*, 2013, 74(12), 377–406 (2013). DOI:10.1016/j.mser.2013.10.001.

65. Rani S, Roy SC, Paulose M. Synthesis and applications of electrochemically self-assembled titania nanotube arrays. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, 12(12), 2780–800. DOI: 10.1039/b924125f.
66. Hahn R, Stark M, Killian MS, Schmuki P. Photocatalytic properties of in situ doped TiO<sub>2</sub>-nanotubes grown by rapid breakdown anodization. *Catal. Sci. Technol.*, 2013, 3(7), 1765–1770. DOI: 10.1039/c3cy00021d.
67. Prakasam HE, Shankar K, Paulose M, Varghese OK, Grimes CA. A new benchmark for TiO<sub>2</sub> nanotube array growth by anodization. *J. Phys. Chem. C.*, 2007, 111(20), 7235–7241. DOI:10.1021/jp070273h.
68. Oliveira NTC, Ferreira EA, Duarte LT, Biaggio SR, Rocha-Filho RC, Bocchi N. Corrosion resistance of anodic oxides on the Ti-50Zr and Ti-13Nb-13Zr alloys. *Electrochim. Acta.*, 2006, 51(10), 2068–2075. DOI: 10.1016/j.electacta.2005.07.015.
69. Ossowska A, Beutner R, Scharnweber D, Zieliński A. Properties of composite oxide layers on the Ti13Nb13Zr alloy. *Surf. Eng.*, 2017, 33(11), 841–848. DOI:10.1080/02670844.2017.1305657.
70. Ossowska A, Zieliński A, Supernak M. Formation of high corrosion resistant nanotubular layers on titanium alloy Ti13Nb13Zr. *Solid State Phenom.*, 2011, 183, 137–142. DOI:10.4028/www.scientific.net/ssp.183.137.
71. Hernández-López JM, Conde A, de Damborenea J, Arenas MA. Correlation of the nanostructure of the anodic layers fabricated on Ti13Nb13Zr with the electrochemical impedance response. *Corros. Sci.*, 2015, 94, 61–69. DOI: 10.1016/j.corsci.2015.01.041.
72. Lossdorfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 2004, 4–6. DOI: 10.1002/jbm.a.30025.
73. Boyan BD, Dean DD, Lohmann CH. The titanium-bone cell interface in vitro: the role of the surface in promoting. *Titanium in Medicine*. Springer-Verlag, 2001.
74. Gulati K, Maher S, Losic D. Titania nanotubes for orchestrating osteogenesis at the bone – implant interface. *Nanomedicine.*, 2016, 14, 1847–64. DOI: 10.2217/nnm-2016-0169.
75. Levin M, Spiro RC, Himanshu J, Falk M. Effects of titanium implant surface topology on bone cell attachment and proliferation in vitro. *Med. Devices Evid. Res.*, 2022, 15, 103–119. DOI: 10.2147/MDER.S360297.
76. Park J, Bauer S, von der Mark K, Schmuki P. Nanosize and vitality: TiO<sub>2</sub> nanotube diameter directs cell fate. *Nano Lett.*, 2007, 7(6), 1686–1691. DOI:10.1021/nl070678d.
77. Oh S, Brammer KS, Li YSJ, Teng D, Engler AJ, Chien S, Jin S. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106(7), 2130–2135. DOI: 10.1073/pnas.0813200106.

78. Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol. Adv.*, 2011, 29(6), 739–767. DOI:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004.
79. Bauer S, Park J, von der Mark K, Schmuki P. Improved attachment of mesenchymal stem cells on super-hydrophobic TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Acta Biomater.*, 2008, 4(5), 1576–1582. DOI:10.1016/j.actbio.2008.04.004.
80. Bauer S, Park J, Faltenbacher J, Berger S, von der Mark K, Schmuki P. Size selective behavior of mesenchymal stem cells on ZrO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanotube arrays. *Integr. Biol.*, 2009, 1(8-9), 525–532. DOI:10.1039/b908196h.
81. Tsuchiya H, Macak JM, Müller L, Kunze J, Müller F, Greil P, Virtanen S, Schmuki P. Hydroxyapatite growth on anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, 77A(3), 534–541. DOI:10.1002/jbm.a.30677.
82. Kodama A, Bauer S, Komatsu A, Asoh H, Ono S, Schmuki P. Bioactivation of titanium surfaces using coatings of TiO<sub>2</sub> nanotubes rapidly pre-loaded with synthetic hydroxyapatite. *Acta Biomater.*, 2009, 5(6), 2322–2330. DOI:10.1016/j.actbio.2009.02.032.
83. Kunze J, Müller L, Macak JM, Greil P, Schmuki P, Müller FA. Time-dependent growth of biomimetic apatite on anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Electrochim. Acta.*, 2008, 53(23), 6995–7003. DOI: DOI:10.1016/j.electacta.2008.01.02.
84. Raja KS, Misra M, Paramguru K. Deposition of calcium phosphate coating on nanotubular anodized titanium. *Mater. Lett.*, 2005, 59(17), 2137–2141. DOI: 10.1016/j.matlet.2005.01.084.
85. Shrestha NK, Macak JM, Schmidt-Stein F. Magnetically guided titania nanotubes for site-selective photocatalysis and drug release. *Photoinduced Drug Release.*, 2009, 49, 969–972. DOI: 10.1002/anie.200804429.
86. Ali H, Kalashnikova I, White MA, Sherman M, Rytting E. Preparation, characterization, and transport of dexamethasone-loaded polymeric nanoparticles across a human placental in vitro model. *Int. J. Pharm.*, 2013. 454(1), 149–57. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.010.
87. Ercan B, Taylor E, Alpaslan E. Diameter of titanium nanotubes influences anti-bacterial efficacy. *Nanotechnology.*, 2011, 22. DOI:10.1088/0957-4484/22/29/295102.

---

### ***III. Autoreferat***

## 1. *Cel pracy*

Wychodząc na przeciw współczesnym wyzwaniom dynamicznie rozwijającej się medycyny regeneracyjnej i implantologii w poniższej pracy doktorskiej podjęta została próba opracowania innowacyjnego biomateriału na bazie biomedycznego stopu TNZ do zastosowań na implanty osteointegracyjne o zwiększonej biofunkcjonalności. Na podstawie przeprowadzonej analizy literatury przyjęto *w niniejszej dysertacji* następującą tezę badawczą: **istnieje możliwość poprawy biofunkcjonalności stopu TNZ poprzez wytworzenie na jego powierzchni warstw nanorurek tlenkowych za pomocą anodowania.**

Na podstawie tak sformułowanej tezy zostały zaproponowane następujące cele badawcze:

- opracowanie sposobu anodowego wytwarzania warstw nanorurek tlenkowych pierwszej, drugiej i trzeciej generacji na powierzchni biomedycznego stopu TNZ,
- charakterystyka właściwości fizyko-chemicznych, biotribologicznych, mikromechanicznych, elektronowych, bioelektrochemicznych, biologicznych oraz chropowatości powierzchni stopu TNZ przed i po procesie anodowania,
- kontrola jakości stopu TNZ przed i po procesie anodowania w przyspieszonych badaniach korozyjnych w komorze solnej,
- zastosowanie wytworzonych warstw nanorurek tlenkowych na powierzchni stopu TNZ jako potencjalny nośnik leków.

## 2. Metody badawcze

Materiał badań w stanie wyjściowym jak i po elektrochemicznej modyfikacji powierzchni został scharakteryzowany za pomocą licznych metod badawczych, które pozwoliły na określenie między innymi składu fazowego, chemicznego, mikrostruktury oraz wpływu przeprowadzonej modyfikacji powierzchni na biofunkcjonalność stopu TNZ. Zastosowano poniższe metody badawcze:

- Skaningowa transmisyjna mikroskopia elektronowa (STEM)
- Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)
- Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)
- Spektroskopia dyspersji energii (EDS)
- Mikroskopia sił atomowych (AFM)
- Dyfrakcja rentgenowska w geometrii Bragga- Brentano (XRD)
- Metoda stałego kąta padania wiązki pierwotnej (GIXRD)
- Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (XPS)
- Fourierowska spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-FTIR)
- Badania biotribologiczne w roztworze Ringer'a
- Badania mikrotwardości metodą Vickers'a
- Metoda potencjału obwodu otwartego (OCP)
- Metoda krzywych polaryzacji
- Elektrochemiczna spektroskopia impedancji (EIS)
- Zlokalizowana elektrochemiczna spektroskopia impedancji (LEIS)
- Skanująca sonda Kelvina (SKP)
- Wibrująca elektroda skanująca (SVET)
- Przyspieszone badania korozyjne w sztucznej atmosferze obojętnej mgły solnej (test NSS)
- Profilometria kontaktowa
- Badania kąta zwilżania metodą siedzącej kropli
- Badania właściwości hemolitycznych
- Badania adhezji komórek do podłoża
- Badania cytotoksyczności (test MTT)
- Badania trombogenności
- Badania kinetyki uwalniania leków

### 3. Omówienie prac wchodzących w cykl publikacyjny oraz przedstawienie osiągniętych wyników

Przeanalizowana literatura dotycząca stopów tytanu stosowanych obecnie w medycynie skupia się na wyeliminowaniu toksycznych dodatków stopowych, takich jak wanad oraz aluminium. Uwalnianie jonów tych pierwiastków do organizmu człowieka może prowadzić do wzrostu ilości zachorowań, min. na chorobę Alzheimera, neuropatię, metalozę czy alergię. W celu ograniczenia powyższych problemów zdrowotnych w ostatnich latach rozpoczęto badania nad trzecią generacją stopów tytanu, które posiadają w swoim składzie bardziej biokompatybilne pierwiastki, takie jak tantal, niob czy cyrkon [1–3]. Stop TNZ należy do stopów tytanu najnowszej generacji i jest innowacyjnym biomateriałem o niskiej toksyczności dla tkanek ludzkich. Ponadto, zaletami tego stopu są dobre właściwości mechaniczne przy stosunkowo małej gęstości (tab. 1), wysoka biokompatybilność, bardzo dobra odporność na ścieranie oraz wysoka odporność na korozję elektrochemiczną w środowisku biologicznym. Stop TNZ charakteryzuje się też jednym z najniższych modułów Young'a [1,4].

Tabela 1. Właściwości mechaniczne stopu TNZ [5].

Materiał	Moduł Young'a E [GPa]	Wytrzymałość na rozciąganie R <sub>m</sub> [MPa]	Granica plastyczności R <sub>e</sub> [MPa]	Wydłużenie A [%]	Współczynnik Poissona
TNZ	79	1030	900	10-16	0,36

W oparciu o szerokie studia literaturowe jako materiał badań w niniejszej dysertacji wybrano implantacyjny stop TNZ, który jest stosowany zarówno w medycynie regeneracyjnej jak i spersonalizowanej. Analizując stan dotychczasowych badań nad doborem składu chemicznego i fazowego implantów wykonanych z tytanu lub jego stopów widocznym jest, że osiągnięto pewien pułap możliwości wpływania na właściwości użytkowe wyrobów medycznych produkowanych z pierwiastków metalicznych. Rozwiązaniem tego problemu może być modyfikacja powierzchni bezwanadowych i bezalumiowych stopów tytanu, która zapewnia możliwość poprawy ich biofunkcjonalności, a zwłaszcza właściwości mechanicznych oraz osteokonduktywnych. Mając na uwadze, że biomateriały tytanowe są stosowane

głównie jako implanty kostne, istotne znaczenie ma poprawa przebiegu procesów łączenia ich powierzchni z kością. Na podstawie przeprowadzonej analizy literatury dotyczącej wielu metod modyfikacji powierzchni biomateriałów tytanowych w niniejszej rozprawie zastosowano anodowanie. Metoda anodowania jako jedna z nielicznych zapewnia możliwość wytwarzania jednorodnych nanotubularnych struktur tlenkowych o zróżnicowanych parametrach morfologicznych w zależności od zastosowanych warunków utleniania elektrochemicznego. Nowe, dodatkowo wytworzone porowate warstwy NT mogą wpływać na przyspieszenie procesu osteointegracji, ograniczenie ryzyka uwalniania szkodliwych jonów metali z powierzchni implantu do organizmu i wystąpienia stanu zapalnego. Zgodnie z najnowszymi trendami w implantologii, warstwy NT wytworzone na powierzchni wszczepów osteointegracyjnych mogą wspomagać proces regeneracji poprzez stymulowanie odbudowy tkanek otaczających wszczep oraz stanowić nośnik substancji leczniczych w inteligentnych systemach dostarczania leków. Wybór tej elektrochemicznej metody modyfikacji powierzchni opierał się też na szeregu zalet, takich jak szybkość i prostota prowadzenia procesu, możliwość pracy w temperaturze pokojowej, niski koszt, niewielkie wymagania aparaturowe oraz równomierna modyfikacja powierzchni implantu posiadającego dowolny kształt. Wadą metody anodowania biomateriałów tytanowych jest praca z często stosowanym do otrzymywania warstw NT roztworem zawierającym kwas fluorowodorowy, który jest jednym z najbardziej żrących i toksycznych kwasów nieorganicznych.

Wyniki badań dotyczących opracowania nowatorskiego sposobu wytwarzania warstw NT 1G, 2G i 3G na powierzchni samopasywnego stopu TNZ przy użyciu metody anodowania oraz ich szerokiej charakterystyki zostały opublikowane w jednotematycznym cyklu publikacji pt. „*Anodowe wytwarzanie i biofunkcjonalność warstw nanorurek tlenkowych na stopie Ti13Nb13Zr*” [D1-D10].

Artykuł na temat „*Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy with potential use as bone implant*” [D1] dotyczył opracowania sposobu otrzymywania warstw NT 1G na podłożu stopu TNZ. Proces elektrochemicznej modyfikacji powierzchni przy zastosowaniu metody anodowania był prowadzony w elektrolicie zawierającym 0,5% roztwór kwasu fluorowodorowego w temperaturze pokojowej. Anodowanie odbywało się przy napięciu 20 V w czasie 120 min. Otrzymanie warstw NT 1G potwierdziły charakterystyki przedstawiające zależność gęstości prądu anodowania od czasu, na których widoczna była typowa niecka tworząca się w pierwszych sekundach



procesu anodowania ([D1] rys. 1b). Dobór warunków procesu anodowania pozwolił na uzyskanie jednorodnych i prostopadłych do podłoża NT 1G o średniej średnicy zewnętrznej 87(10) nm oraz średniej średnicy wewnętrznej 71(7) nm. Średnie wartości średnicy zewnętrznej i średnicy wewnętrznej wyznaczono w oparciu o histogramy rozkładu empirycznego ([D1] rys. 3a i b). Średnia długość uzyskanych NT wynosiła 0,94(9)  $\mu\text{m}$ , podczas gdy dostępna w literaturze przedmiotu długość nanorurek pierwszej generacji na tytanie wynosiła maksymalnie około 500 nm [6,7]. Morfologię powierzchni uzyskanych warstw NT 1G na powierzchni stopu TNZ przedstawia zdjęcie mikroskopowe otrzymane metodą FE-SEM ([D1] rys. 2a) w ogólnym widoku "z góry". Zdjęcie mikroskopowe ([D1] rys. 2b) uwidacznia długość anodowych warstw NT 1G. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi anodowanie folii tytanowej w roztworze 0,5% HF przy napięciach poniżej 20 V umożliwiało otrzymanie NT o średnicy od 15 do 30 nm. Anodowanie prowadzone przy 20 V zapewniało otrzymanie NT o średnicy wewnętrznej około 76 nm [6].

Anodowe warstwy NT 1G otrzymane w zaproponowanych warunkach elektrochemicznego utleniania poddano analizie powierzchniowego składu chemicznego metodą EDS. Widmo EDS ([D1] rys. 1a) wykazało obecność pików pochodzących od składników stopowych w postaci Ti, Nb i Zr. Dodatkowo stwierdzono obecność pików pochodzącego od tlenu, który potwierdził wytworzenie warstewki tlenkowej na powierzchni stopu TNZ. Charakterystyka strukturalna otrzymanych warstw NT 1G przeprowadzona metodą GIXD wykazała obecność  $\text{TiO}_2$  (rutyl),  $\text{TiO}_3$  i  $\text{TiO}$  na podłożu dwufazowego ( $\alpha + \beta$ ) stopu TNZ ([D1] rys. 4b). W badaniach chropowatości powierzchni zrealizowanych metodą AFM wyznaczono wartość parametru  $R_a$  oznaczającego średnią arytmetyczną rzędnych profilu chropowatości, która w przypadku warstwy NT 1G wynosiła  $R_a = 64,8 \text{ nm}$  ([D1] rys. 4a). Uzyskany wynik wskazuje na ponad 15-krotne zwiększenie chropowatości powierzchni w porównaniu ze stopem TNZ przed anodowaniem. Zastosowany do otrzymywania warstw NT 1G kwas fluorowodorowy jest agresywny, w związku z czym trawił i rozpuszczał większość rosnącego tlenku, zapobiegając tworzeniu się długich nanorurek podczas utleniania elektrochemicznego. Należy podkreślić, że pomimo to w niniejszych badaniach w proponowanych nowych warunkach anodowania można uzyskać dwukrotny wzrost długości NT na stopie TNZ w porównaniu z badaniami opisywanymi w literaturze [6]. Otrzymane parametry morfologiczne warstw NT 1G zapewniają dobre rokowania

w badaniach *in vitro* tworzenia kości i ekspresji genów związanych z tworzeniem i przebudową kości w okresie osteointegracji [8,9].

**Głównym osiągnięciem w przedstawionym artykule [D1] było opracowanie nowatorskiego sposobu otrzymywania warstw NT 1G na powierzchni stopu TNZ przy zastosowaniu metody anodowania, który zapewnia wytwarzanie anodowych warstw charakteryzują się długością NT ponad 2-krotnie większą w porównaniu do NT 1G opisanych w literaturze i ponad 15-krotnie większą chropowatością powierzchni w odniesieniu do stopu TNZ w stanie wyjściowym.**

Nowatorskie zastosowanie metody EIS i LEIS do charakterystyki impedancyjnej odporności korozyjnej *in vitro* anodowo wytworzonych warstw NT 1G na powierzchni stopu TNZ stanowiło podstawę opracowania publikacji nt. "EIS and LEIS study on *in vitro* corrosion resistance of anodic oxide nanotubes on Ti-13Zr-13Nb alloy in saline solution" [D2].

Warstwy NT 1G zostały wytworzone zgodnie ze sposobem zaproponowanym w [D1]. Morfologię powierzchni uzyskanych warstw NT scharakteryzowano za pomocą metody TEM ([D2] rys. 2 a i b), co pozwoliło wykazać równomierny rozkład gęsto upakowanych NT o pojedynczych i bardzo gładkich ściankach oraz ich wysoki stopień samoorganizacji. Obraz TEM uzyskany dla pojedynczej nanorurki tlenkowej uwidoczniał jej regularny kształt, bez widocznego strzępienia w górnej części ([D2] rys. 2c). Dodatkowo wykazano, że przekrój poprzeczny pojedynczej nanorurki tlenkowej posiadał kształt cylindryczny.

Do charakterystyki fizyko-chemicznej stopu TNZ przed i po modyfikacji elektrochemicznej zastosowano również metodę ATR-FTIR. Uzyskane wyniki pozwoliły na przypisanie poszczególnych grup funkcyjnych do konkretnych obszarów o charakterystycznych pasmach absorpcji w przypadku nieanodowanego podłoża oraz stopu TNZ wraz z warstwą NT 1G. Rejestrację widm ATR-FTIR przeprowadzono w zakresie  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  ([D2] rys. 3). Uzyskano charakterystyczne pasma dla  $\text{TiO}_2$ , które były widoczne dla obydwu badanych materiałów. Pik w zakresie  $873-558\text{ cm}^{-1}$  dla warstwy NT 1G wskazywał na obecność anodowego tlenku  $\text{TiO}_2$  [10]. Pasma w zakresie  $495-453\text{ cm}^{-1}$  odpowiadały częstotliwości  $\text{TiO}_2$  w fazie rutyłowej, co zostało potwierdzone w ([D1] rys. 4b) za pomocą badań metodą GIXD.

Wpływ przeprowadzonego procesu anodowania na odporność korozyjną *in vitro* stopu TNZ w środowisku soli fizjologicznej w temperaturze  $37\text{ }^\circ\text{C}$  określono w badaniach elektrochemicznych. W pierwszym etapie badań

wyznaczono wartość potencjału obwodu otwartego ( $E_{oc}$ ), która dla elektrody TNZ wynosiła  $-42 \text{ mV}(8) \text{ V}$  a dla NT 1G  $-486 \text{ mV}(24) \text{ V}$  ([D2] rys. 4). Uzyskane wyniki wskazują, że inicjacja korozji elektrochemicznej dla anodowanej elektrody TNZ będzie zachodziła szybciej ze względu na porowatość powierzchni. Następnie zarejestrowane zostały krzywe polaryzacji w wąskim zakresie potencjałów  $\pm 50 \text{ mV}$  względem  $E_{oc}$ , które były podstawą analizy przy zastosowaniu metody ekstrapolacji prostych Tafela ([D2] rys. 5). W oparciu o wyznaczone parametry odporności korozyjnej takie, jak potencjał korozyjny ( $E_{cor}$ ), gęstość prądu korozyjnego ( $j_{cor}$ ), katodowy współczynnik nachylenia prostej Tafela ( $b_c$ ), anodowy współczynnik nachylenia prostej Tafela ( $b_a$ ), opór polaryzacji ( $R_p$ ) oraz szybkość korozji (CR) w potencjale  $E_{cor}$ , przeprowadzono ocenę porównawczą badanych elektrod ([D2] tab. 1). Dla wytworzonych bambusopodobnych NT 1G  $E_{cor}$  wynosił  $-0,497(26) \text{ V}$ , natomiast elektroda TNZ w stanie wyjściowym charakteryzowała się wartością  $E_{cor}$  równą  $0,038(8) \text{ V}$ , co zostało wyznaczone w [D4]. Takie zachowanie elektrochemiczne badanych elektrod wskazuje na wyższą odporność korozyjną elektrody nieanodowanej, której powierzchnia jest pokryta samopasywną i ciągłą warstwą tlenkową o silniejszych właściwościach barierowych niż porowata warstwa NT 1G [11,12]. Wartość  $j_{cor}$  dla elektrody z warstwą NT 1G na powierzchni jest około 15 razy większa w porównaniu do  $j_{cor}$  określonego dla nieanodowanego podłoża ([D2] tab. 1). Wskazuje to na szybsze tempo rozpuszczania anodowej warstwy NT 1G w porównaniu do natywnej warstwy tlenku utworzonej spontanicznie. Należy jednak podkreślić, że wyznaczona wartość parametru CR dla obu badanych elektrod jest na tym samym poziomie rzędu  $10^{-3} \text{ mm/rok}^{-1}$ . Wartości parametru  $b_c$  i  $b_a$  wyznaczone odpowiednio na podstawie równań (4) i (5). Elektroda NT 1G charakteryzuje się szybszym procesem anodowym w porównaniu do elektrody TNZ ([D2] tab. 1). Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowany został mechanizm korozji elektrochemicznej elektrody TNZ przed i po procesie anodowania, który jest zgodny z pasywnym rozpuszczaniem warstwy tlenkowej w warunkach beztlenowych [13].

Szczegółowy mechanizm i kinetyka korozji elektrochemicznej wraz z pojemnościową charakterystyką badanej elektrody TNZ przed i po wytworzeniu warstwy NT 1G był charakteryzowany za pomocą komplementarnej metody EIS. Na doświadczalnych widmach EIS zarejestrowanych przy  $E_{oc}$  w zakresie częstotliwości od  $50 \text{ kHz}$  do  $1 \text{ mHz}$  obserwowano jedną stałą czasową w obwodzie elektrycznym dla elektrody TNZ, co jest charakterystyczne dla tytanu i jego stopów pokrytych samopasywną

warstwą tlenkową ([D2] rys. 6a), ([D2] rys. 7a). W przypadku elektrody NT 1G na widmach EIS stwierdzono pojawienie się dwóch stałych czasowych w obwodzie elektrycznym wskazujące na porowatą powierzchnię materiału ([D2] rys. 6b), ([D2] rys. 7b). Dla obydwu rodzajów elektrod uzyskano wysokie wartości modułu impedancji  $|Z|_{f \rightarrow 0}$ , które są typowe dla materiałów wykazujących pojemnościowe zachowanie i wysoką odporność na korozję [14]. Modelowanie fizyko-chemiczne otrzymanych charakterystyk impedancyjnych przeprowadzono przy zastosowaniu koncepcji elektrycznych obwodów zastępczych. Symulację odpowiedzi elektrycznych obwodów zastępczych i dopasowanie parametrów obwodów do zarejestrowanych danych impedancyjnych zrealizowano przy pomocy metody złożonej nieliniowej metody najmniejszych kwadratów (ang. *complex non-linear least squares*, CNLS). W procedurze dopasowania w miejsce kondensatora stosowano element stało-fazowy (ang. *constant phase element*, CPE), którego impedancję opisano w równaniu (9). W przypadku elektrody TNZ zastosowano model elektrycznego obwodu zastępczego dla korozji wżerowej samopasywnych metali i ich stopów zawierający jeden element stało-fazowy, dla którego na diagramie Nyquista obserwuje się pojedyncze półkole ([D2] rys. 6a). Jako wynik dopasowania uzyskano wartości parametrów elektrycznego obwodu zastępczego, takich jak:  $R_1$  oznaczający opór elektrolitu,  $CPE_{1-T}$  stanowiący parametr pojemnościowy,  $CPE_{1-\phi}$  będący eksponentem  $CPE_1$  związanego z pojemnością warstwy podwójnej oraz  $R_2$  odpowiadający oporowi przeniesienia ładunku przez granicę międzyfazową elektroda TNZ | samopasywna warstwa tlenkowa | elektrolit ([D2] tab. 2). W procedurze dopasowania dla elektrody NT 1G zastosowano model elektrycznego obwodu zastępczego dla korozji wżerowej elektrod metalicznych pokrytych porowatą warstwą tlenkową o budowie dwuwarstwowej, w którym uwzględnione zostały dwa elementy stało-fazowe, a na diagramie Nyquista występują dwa półkole ([D2] rys. 6b). Wynikiem dopasowania tego modelu do danych eksperymentalnych EIS były wartości parametrów elektrycznego obwodu zastępczego ([D2] tab. 3). Parametry  $R_1$ ,  $CPE_{1-T}$ ,  $CPE_{1-\phi}$  i  $R_2$  opisują półkole wysokoczęstotliwościowe i są związane z obecnością zewnętrznej warstwy NT 1G o porowatej strukturze, natomiast parametry  $CPE_{2-T}$ ,  $CPE_{2-\phi}$  i  $R_3$  opisują półkole niskoczęstotliwościowe, które przypisane jest wewnętrznej warstwie tlenkowej o właściwościach barierowych, bezpośrednio przylegającej do podłoża elektrody TZN. W przypadku elektrody TNZ z warstwą NT 1G na powierzchni opór przeniesienia ładunku związany z wewnętrzną warstwą tlenku wynosi  $R_3 = 916(12) \Omega \text{ cm}^2$  i jest ponad 627 razy

większy w porównaniu z wartością  $R_2$  przypisaną oporowi przeniesienia ładunku przez zewnętrzną warstwę tlenku ([D2] tab. 3). Zjawisko to może wynikać z faktu, że lokalne stężenie elektrolitu wewnątrz nanorurek tlenkowych silnie wzrasta w porównaniu z pH elektrolitu, co nasila się procesy korozyjne na dnie nanorurek tlenkowych. Nieznaczne obniżenie odporności korozyjnej elektrody TNZ po anodowaniu w odniesieniu do elektrody, która nie była poddana utlenianiu elektrochemicznemu wynika z porowatości powierzchni warstwy NT 1G, co potwierdziły wyniki badań lokalnej odporności korozyjnej przeprowadzone za pomocą skaningowych metod elektrochemicznych, takich jak LEIS i SVET. Wyniki otrzymane metodą LEIS w postaci map rozkładu modułu impedancji i kąta przesunięcia fazowego ( $\varphi$ ) rejestrowanych przy  $E_{oc}$  w roztworze soli fizjologicznej wykazały niejednorodny rozkład wartości mierzonych parametrów dla elektrody NTZ w porównaniu do elektrody NT 1G ([D2] rys. 8). Przyczyną lokalnych fluktuacji wartości  $|Z|$  i  $\varphi$  była prawdopodobnie nierównomierna grubość naturalnej warstwy samopasywnej na powierzchni biomedycznego stopu TNZ. Średnia wartość  $|Z|$  wyznaczona dla nieanodowanej elektrody była ponad 8 razy większa w porównaniu do elektrody po modyfikacji elektrochemicznej. Dla elektrody TNZ w stanie wyjściowym średnia wartość  $|Z|$  wynosiła  $20,3 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ , a dla elektrody NT 1G była równa  $2,5 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ . Efekt ten był związany z tworzeniem się porowatej warstwy NT 1G jako zewnętrznej części warstwy pasywnej.

Do pomiaru lokalnego przepływu prądu nad powierzchnią badanych materiałów w roztworze soli fizjologicznej zastosowano metodę SVET. Wyniki uzyskane w postaci map rozkładu gęstości prądu jonowego wykazały, iż średnia wartość gęstości prądu jonowego ( $j$ ) określona dla stopu TNZ w stanie wyjściowym wynosiła  $81 \mu\text{A cm}^{-2}$  i była około 2 razy większa w porównaniu z wartością  $j$  dla warstwy NT 1G ([D2] rys. 9). Zaobserwowana różnica w wartościach gęstości prądu anodowego wskazywała, że proces elektrochemicznego utleniania był szybszy/łatwiejszy na nieanodowanej powierzchni stopu TNZ w porównaniu do materiału, na którym warstwa tlenku została już utworzona. Dowodziło to, że łatwiej jest utlenić samopasywną powierzchnię stopu TNZ niż pogrubić już wytworzoną anodową warstwę tlenku. Średnia wartość nieregularności gęstości prądu określona dla stopu TNZ przed i po anodowaniu wynosiła odpowiednio około  $10 \mu\text{A cm}^{-2}$  i  $9 \mu\text{A cm}^{-2}$ , co sugerowało, że zarówno badany stop w stanie wyjściowym jak i po utlenianiu elektrochemicznym, charakteryzował się jednorodnym rozkładem wartości gęstości prądu jonowego. W badaniach potencjodynamicznych zarówno dla

samopasywnej elektrody TNT jak i z uformowanymi jednościnnymi NT 1G nie stwierdzono ich podatności na korozję wżerową aż do potencjału 9,4 V, potwierdzając tym samym wysoką odporność na korozję w roztworze 0,9% NaCl ([D2] [rys. 10](#)).

**Osiągnięcie w przedstawionym artykule [D2] stanowi nowatorskie zastosowanie metody EIS, LEIS i SVET do określenia mechanizmu i kinetyki korozji wżerowej stopu TNT oraz nowoopracowanych warstw NT 1G otrzymanych na jego powierzchni w środowisku biologicznym oraz wykazanie braku podatności na korozję wżerową badanych biomateriałów do potencjału 9,4 V w roztworze soli fizjologicznej, co pozwala rekomendować je do zastosowań na implanty długoterminowe.**

Uzyskane wstępne wyniki dotyczące wytwarzania warstw 1G NT na powierzchni stopu TNT przyczyniły się do podjęcia dalszych prac nad otrzymaniem warstw NT 2G, które były przedmiotem badań w artykule *"Electrochemical formation of self-organized nanotubular oxide layers on Ti13Zr13Nb alloy for biomedical applications"* [D3].

Celem badań podjętych w powyższej publikacji była próba wytworzenia warstw NT 2G na powierzchni stopu TNT w nowych warunkach anodowania. Na podstawie doniesień literaturowych został wytypowany elektrolit oraz zawartość jonów fluorkowych. Proces anodowania był prowadzony w roztworze 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  z dodatkiem 1% wag.  $\text{NH}_4\text{F}$  w temperaturze pokojowej. Napięcie procesu utleniania elektrochemicznego wynosiło 20 V a czas 120 min. Zmiana elektrolitu z roztworu kwasu fluorowodorowego na roztwór soli nieorganicznej z dodatkiem jonów fluorkowych skutkowała uzyskaniem jednorodnych i jednościnnych NT 2G o innych parametrach morfologicznych w porównaniu do NT 1G. Zaproponowane nowe warunki anodowania pozwoliły na wytworzenie jednościnnych NT o średnicy wewnętrznej mieszczącej się w zakresie od 12 - 32 nm jak określono w badaniach mikroskopowych przy zastosowaniu metody STEM ([D3] [rys. 1](#)).

Powierzchniowy skład chemiczny wytworzonych warstw NT 2G analizowano metodą EDS. Widoczna na widmie EDS obecność pików pochodzącego od tlenu wskazuje na obecność warstwy tlenkowej na powierzchni stopu TNT ([D3] [rys. 2](#)). Analiza otrzymanego widma EDS wykazała również obecność pików pochodzących od składników stopu (Ti, Nb, Zr). Zastosowanie mniej agresywnego elektrolitu w porównaniu do 0,5% HF pozwoliło na uzyskanie warstw NT 2G, których charakterystyka strukturalna przeprowadzona metodą GIXD wykazała obecność  $\text{TiO}_2$  o strukturze rutylu

([D3] rys. 3). W badaniach porównawczych chropowatości powierzchni stopu TNT przed i po anodowaniu przy zastosowaniu metody AFM wykazano, że wartość parametru  $R_a$  dla nieanodowanego podłoża wynosiła 4,3 nm ([D3] rys. 4), co świadczyło o bardzo gładkiej morfologii powierzchni. W przypadku badanego stopu po procesie anodowania w proponowanych warunkach stwierdzono ponad 20-krotny wzrost chropowatości powierzchni w porównaniu do stopu TNZ przed utworzeniem warstwy NT 2G ([D3] rys. 5). Wyznaczony współczynnik  $R_a$  dla anodowanego stopu TNT wynosił 92,9 nm. Uzyskane wyniki pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu formowania NT 2G w zastosowanym elektrolicie zawierającym jony fluorkowe ([D3] rys. 6). Dyskutowany mechanizm jest zgodny z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi wytwarzania NT na powierzchni tytanu [15]. Proces wytwarzania nanotubularnych struktur tlenkowych 2G na stopie TNZ metodą anodowania wymaga obecności samopasywnej warstwy tlenkowej, która po przyłożeniu odpowiednio wysokiego napięcia do anody wskutek procesu utleniania elektrochemicznego początkowo jest pogrubiana, a następnie w wyniku rozpuszczania ulega pęknięciom, które wraz z wydłużaniem czasu anodowania pogłębiają się aż do powstania nanoporów. W kolejnym etapie następuje wzrost porów i granic między nimi, a następnie formowanie całkowicie rozwiniętej warstwy nanorurek na powierzchni stopu TNZ. Istotą powstawania struktur nanorurkowych jest odpowiednie stężenie jonów fluorkowych w elektrolicie, które łatwo się adsorbują w zagłębieniach powierzchni i powodują jej trawienie a w konsekwencji pojawiają się wyodrębnione granice między nanorurkami [16]. W obecności jonów fluorkowych ([D3] rys. 7b) zgodnie z reakcją (2) powstają rozpuszczalne w wodzie kompleksy  $TiF_6^{2-}$  [D3]. Ze względu na mały promień jonowy, jony fluorkowe przechodzą przez warstewkę tlenkową w wyniku przyłożonego pola elektrycznego.

**Głównym osiągnięciem w przedstawionym artykule [D3] było opracowanie nowatorskiego sposobu otrzymywania warstw NT 2G na powierzchni implantacyjnego stopu TNZ metodą anodowania w zaproponowanych warunkach, które zapewniają ponad 20-krotny wzrost chropowatości powierzchni w porównaniu do samopasywnego stopu TNZ, co może odgrywać kluczową rolę w poprawie procesu osteointegracji.**

Charakterystyka odporności korozyjnej *in vitro* otrzymanych warstw NT 2G na powierzchni biomedycznego stopu TNZ była przedmiotem badań w kolejnym artykule pt. "Evaluation of corrosion resistance of nanotubular oxide layers on the Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution" [D4]. Anodowe

warstwy NT 2G o strukturze rutylu zostały wytworzone w procesie utleniania elektrochemicznego zgodnie ze sposobem opisanym w publikacji [D3]. Obecność otrzymanych warstw tlenkowych potwierdzona została w obserwacjach mikroskopowych wykonanych metodą STEM i SEM. Ocena wpływu zastosowanej modyfikacji powierzchni na odporność korozyjną stopu TNZ w roztworze soli fizjologicznej w temperaturze 37 °C przeprowadzono w oparciu o badania elektrochemiczne przy użyciu metody OCP i krzywych polaryzacji oraz zmiennoprądowej metody EIS. Parametry odporności korozyjnej w postaci  $E_{cor}$ ,  $j_{cor}$ ,  $R_p$ ,  $b_c$ ,  $b_a$  i CR w  $E_{cor}$  wyznaczone zostały na podstawie krzywych polaryzacji zarejestrowanych w oknie potencjału  $\pm 50$  mV względem  $E_{oc}$  przy zastosowaniu metody ekstrapolacji prostych Tafela ([D4] rys. 2). Widocznym było, że dla elektrody TNZ po procesie anodowania  $E_{cor}$  był nieznacznie przesunięty w kierunku potencjałów anodowych i zaobserwowano wzrost wartości  $j_{cor}$  w porównaniu z odpowiednimi parametrami wyznaczonymi dla elektrody niemodyfikowanej ([D4] tab. 1). Oznacza to, iż proces korozji elektrochemicznej na elektrodzie z obecną warstwą NT 2G na powierzchni będzie rozpoczynać się później. Mniejszą wartość  $R_p$  i większe zużycie materiału w skali roku wyrażone parametrem CR w przypadku anodowanej elektrody można wytłumaczyć obecnością porowatej, nanotubularnej struktury tlenkowej. Proces korozji wewnątrz nanorurek będzie przebiegał szybciej ze względu na lokalną zmianę pH elektrolitu. Jednak obecność barierowej warstwy tlenkowej ściśle przylegającej do podłoża zapewnia wysoką odporność korozyjną anodowanej elektrody. Wyniki uzyskane przy zastosowaniu pomiarów stałoprądowych potwierdzają, że stop TNZ w stanie wyjściowym charakteryzuje się niższą odpornością na korozję elektrochemiczną w porównaniu do stopu z wytworzoną warstwą NT 2G na powierzchni, co jest spójne z danymi literaturowymi, według których obecność nanotubularnych struktur tlenkowych na tytanie i jego stopach zwiększa odporność korozyjną w środowisku biologicznym [16,17].

Wyniki badań EIS wykazały pojemnościowe zachowanie elektrody TNZ zarówno przed jak i po procesie anodowania oraz wysokie wartości modułu impedancji, co jest typowym zachowaniem dla metalicznych elektrod z obecną warstwą tlenkową na powierzchni w roztworach zawierających chlorki [11]. Na wykresie Nyquista dla elektrody TNZ przed anodowaniem zaobserwowano jedno półkole w całym zakresie badanych częstotliwości, a w przypadku elektrody poddanej modyfikacji powierzchni widoczne były dwa półkole, gdzie średnica pierwszego półkola zarejestrowana przy wysokich częstotliwościach



była znacznie większa niż średnica drugiego półkola obecnego przy niskich częstotliwościach. ([D4] rys. 3). Uzyskane zależności logarytmu modułu impedancji w funkcji logarytmu częstotliwości dla badanych elektrod wykazały obniżenie wartości  $|Z|$  przy niskich częstotliwościach w przypadku elektrody TNZ przed anodowaniem, co świadczyło o jej niższej odporności korozyjnej w porównaniu do elektrody po anodowaniu ([D4] rys. 5). Na diagramach Bode ilustrujących zależność kąta przesunięcia fazowego w funkcji logarytmu częstotliwości wykazano obecność jednej stałej czasowej w obwodzie elektrycznym dla elektrody TNZ w stanie wyjściowym, podczas gdy dla anodowanej elektrody widoczne były dwie stałe czasowe ([D4] rys. 6). Kształt otrzymanych widm EIS wskazywał na typowe zachowanie impedancyjne samopasywnej elektrody metalicznej w przypadku niemodyfikowanego stopu TNZ oraz elektrody porowatej dla stopu z wytworzoną warstwą NT 2G. Szczegółowy mechanizm i kinetykę korozji elektrochemicznej badanych elektrod określono przy zastosowaniu modelowania fizyko-chemicznego opartego na koncepcji elektrycznych obwodów zastępczych. Do interpretacji uzyskanych charakterystyk impedancyjnych zaproponowano model dla korozji wżerowej stopu tytanu pokrytego warstwą tlenkową w roztworze zawierającym agresywne jony chlorkowe. W zastosowanym modelu założono obecność warstwy tlenkowej utworzonej na powierzchni elektrody TNZ w procesie spontanicznej pasywacji oraz warstwy NT 2G zbudowanej z porowatej warstwy zewnętrznej oraz ciągłej warstwy wewnętrznej przylegającej bezpośrednio do powierzchni elektrody TNZ poddanej utlenianiu elektrochemicznemu. Do symulacji elektrycznych obwodów zastępczych i dopasowania parametrów obwodów do eksperymentalnych widm EIS zastosowano metodę CNLS oraz CPE, którego impedancja została opisana równaniem (2). Wynikiem dopasowania elektrycznego obwodu zastępczego do widm EIS otrzymanych dla elektrody TNZ przed anodowaniem był parametr  $R_s$  przypisany do oporu elektrolitu,  $R_{ox}$  związany z oporem przeniesienia ładunku przez granicę międzyfazową samopasywna warstwa tlenkowa | elektrolit oraz parametry  $CPE-T_{dl}$  i  $CPE-\phi_{dl}$  będące odpowiednio parametrem pojemnościowym i eksponentem CPE związanym z pojemnością warstwy podwójnej ([D4] tab. 2). Wynikiem dopasowania elektrycznego obwodu zastępczego do eksperymentalnych widm EIS uzyskanych dla anodowanej elektrody TNZ były parametry w postaci  $R_1$ ,  $CPE-T_t$ ,  $CPE-\phi_t$  i  $R_t$ , które opisywały półkole przy wysokich częstotliwościach i były przypisane do zewnętrznej części warstwy NT 2G oraz parametry, takie jak  $CPE-T_b$ ,  $CPE-\phi_b$  i  $R_b$ , które opisywały półkole przy

niskich częstotliwościach i były przypisane do barierowej warstwy tlenkowej w wewnętrznej części warstwy NT 2G ([D4] [tab. 3](#)). Uzyskane wyniki wskazały, że wartość parametru kinetycznego  $R_{ox}$  wyniosła  $1,01 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$  i była nieznacznie mniejsza w odniesieniu do wartości  $R_t$  wynoszącej  $1,03 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$  oraz znacząco wyższa w porównaniu do wartości  $R_b$  równej  $0,707 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ . Oznacza to, że kinetyka korozji elektrochemicznej warstwy barierowej stanowiącej wewnętrzną część warstwy NT 2G była wolniejsza w porównaniu do kinetyki korozji samopasywnej warstwy tlenkowej. Warto zaznaczyć, że wyniki uzyskane metodą EIS były zgodne z wynikami uzyskanymi metodą ekstrapolacji prostych Tafela ([D4] [tab. 1](#)).

**Głównym osiągnięciem naukowym w przedstawionym artykule [D4] było wykazanie wpływu zastosowanej modyfikacji powierzchni przy wykorzystaniu metody anodowania na poprawę odporności korozyjnej biomedycznego stopu TNZ w symulowanym środowisku ciała ludzkiego.**

Kolejne badania podjęte w dysertacji dotyczyły określenia wpływu wzrostu stężenia jonów fluorkowych w elektrolicie stosowanym w procesie anodowania na morfologię warstw NT 2G otrzymanych na powierzchni biomedycznego stopu TNZ, co zostało przedstawione w artykule pt. *"Electrochemical formation of second generation  $\text{TiO}_2$  nanotubes on  $\text{Ti}_{13}\text{Nb}_{13}\text{Zr}$  alloy for biomedical applications"* [D5]. Na podstawie dokonanego przeglądu literatury oraz wstępnych badań własnych zaproponowano w powyższej pracy nowy skład elektrolitu o podwyższonej zawartości jonów fluorkowych. Utlenianie elektrochemiczne przeprowadzono w roztworze  $1\text{M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  z dodatkiem 2% wag.  $\text{NH}_4\text{F}$ . Napięcie procesu anodowania wynosiło  $20 \text{ V}$  a czas  $120 \text{ min}$ . Dodatek jonów fluorkowych, których źródłem był fluorek amonu odpowiadał za wytwarzanie bardziej jednorodnych nanorurek o podobnej średnicy w porównaniu z niejednorodnymi nanorurkami otrzymywanymi dotychczas z innych elektrolitów o mniejszej zawartości jonów fluorkowych ([D5] [rys. 2](#)). W badaniach za pomocą metody FE-SEM wykazano, że zaproponowane nowe warunki anodowania pozwoliły na uzyskanie jednościennych nanorurek o średniej średnicy zewnętrznej równej  $103(16) \text{ nm}$  oraz średniej średnicy wewnętrznej wynoszącej  $61(11) \text{ nm}$ . Średnie wartości średnic otrzymanych nanorurek były wyznaczone na podstawie histogramów rozkładu empirycznego ([D5] [rys. 3](#)). Stwierdzono, że zwiększona zawartość jonów fluorkowych w elektrolicie na bazie siarczanu amonu przy zastosowaniu takich samych warunków napięciowo-czasowych spowodowała blisko dwukrotny wzrost średniej średnicy wewnętrznej NT 2G w porównaniu do średniej średnicy

wewnętrznej NT 2G otrzymanej na powierzchni stopu TNZ w publikacji [D3]. Średnia długość NT otrzymanych w elektrolicie o zwiększonej zawartości jonów fluorkowych została oszacowana na poziomie 3,9(2)  $\mu\text{m}$  ([D5] rys. 2).

Wytworzone anodowe warstwy NT 2G scharakteryzowano w badaniach strukturalnych przeprowadzonych metodą GIXD, a uwidocznione halo amorficzne na dyfraktogramie wskazało na rentgenowsko amorficzny charakter otrzymanych NT ([D5] rys. 1). Co istotne, zwiększenie zawartości jonów fluorkowych w elektrolicie spowodowało zmianę struktury uzyskanych warstw NT 2G. Warstwy NT 2G otrzymane z elektrolitu zawierającego dodatek tylko 1% wag.  $\text{NH}_4\text{F}$  wykazały obecność  $\text{TiO}_2$  o strukturze rutylu ([D3] rys. 3).

**Głównym osiągnięciem naukowym w publikacji [D5] było wykazanie wpływu zwiększenia stężenia jonów fluorkowych w elektrolicie na bazie siarczanu amonu na wzrost parametrów morfologicznych warstw NT 2G otrzymanych metodą anodowania na powierzchni stopu TNZ. Opracowany sposób elektrochemicznej modyfikacji powierzchni implantacyjnego stopu TNZ zapewnia możliwość zwiększenia powierzchni właściwej oraz kształtowania struktury warstw NT 2G, co może wpływać na poprawę procesu osteointegracji.**

Charakterystyka wpływu anodowania na właściwości bioelektrochemiczne *in vitro* implantacyjnego stopu TNZ została przedstawiona w pracy pt. "*In vitro bioelectrochemical properties of second-generation oxide nanotubes on Ti-13Zr-13Nb biomedical alloy*" [D6].

Proces anodowania był prowadzony zgodnie ze sposobem opisanym w pracy [D4]. Lokalny skład chemiczny uzyskanej warstwy NT 2G scharakteryzowano przy użyciu metody EDS. Na widmie EDS zaobserwowano obecność pików pochodzących od Ti, Nb i Zr jako składników stopowych ([D6] rys. 5a). Zidentyfikowano również pik o wysokiej intensywności pochodzący od tlenu, którego obecność świadczyła o wytworzeniu warstwy tlenkowej. Analiza uzyskanego widma EDS ujawniła też śladowe ilości pierwiastków zawartych w elektrolicie stosowanym do anodowania (F, Cl), ultracienkiej warstwie zastosowanej w celu poprawy przewodności testowanej próbki (Cr) i zanieczyszczeń (C). Otrzymane mapy EDS rozkładu pierwiastków potwierdziły równomierne rozmieszczone zidentyfikowanych pierwiastków na powierzchni warstwy NT 2G w badanym mikroobszarze ([D6] rys. 5b).

Pomiary potencjału zeta ( $\zeta$ ) były prowadzone dla stopu TZN przed i po anodowaniu naprzemiennie w obu kierunkach przepływu elektrolitu. Stosowano wodne roztwory KCl, soli fizjologicznej buforowanej fosforanem

(PBS) i sztucznej krwi, które charakteryzowały się różną siłą jonową i pH w zakresie 3-9. Wykazano doświadczalnie liniową zależność prądu strumieniowego od zastosowanej różnicy ciśnień o współczynniku regresji liniowej  $R^2$  równym 0,99 ([D6] rys. 6). Stwierdzono również zależność liniową pomiędzy szybkością przepływu elektrolitu i ciśnieniem, która wskazywała na przepływ laminarny ([D6] rys. 7). Potencjał zeta dla stopu zarówno przed jak i po wytworzeniu warstw NT 2G był wyznaczony w obecności roztworu KCl. Dla nieanodowanego stopu TNZ wyznaczono punkt izoelektryczny (IEP) na poziomie 4,2. Wartość ta jest typowa dla hydrofobowej powierzchni, nie wykazującej w ogóle obecności grup funkcyjnych lub charakteryzującej się obecnością tylko nielicznych grup funkcyjnych [18]. Wytworzenie amorficznych warstw NT 2G na powierzchni stopu TNZ spowodowało przesunięcie IEP do wartości 5,4, która jest obserwowana dla powierzchni o właściwościach hydrofilowych ([D6] rys. 8). Dodatkowo porównano wpływ różnych roztworów buforowych o pH 7,4 na potencjał zeta stopu TNZ przed i po anodowaniu ([D6] rys. 9). Uzyskane wyniki wykazały wzrost  $\zeta$  dla stopu TNZ z warstwą NT 2G na powierzchni, co mogło być związane z silnym oddziaływaniem jonów fosforanowych z powierzchnią amorficznego tlenku. Dla stopu w stanie wyjściowym nie zaobserwowano zmian w wartości  $\zeta$ . Inne zachowanie zaobserwowano w roztworze sztucznej krwi, w którym stwierdzono zmniejszenie wartości ujemnego potencjału zeta dla wszystkich badanych próbek. Stwierdzono, że jony złożone zawarte w sztucznej krwi wykazują większe powinowactwo do powierzchni hydrofobowych niż hydrofilowych [18]. Wykazano też, że jony zawarte w symulowanym płynie ustrojowym adsorbowały się na powierzchni stopu TNZ zarówno przed jak i po anodowaniu ([D6] rys. 10). Warto jednak zauważyć, że wpływ symulowanego płynu ustrojowego był mniejszy w przypadku nieutlenionego stopu TNZ. Znajomość  $\zeta$  związanego z ładunkiem powierzchniowym na granicy faz biomateriał | elektrolit pozwalać będzie na przewidywanie biologicznej odpowiedzi organizmu na wszczepiony implant i ułatwi projektowanie nowych biomateriałów.

W dalszych badaniach scharakteryzowano wpływ anodowania na odporność korozyjną *in vitro* stopu TNZ w symulowanym płynie ustrojowym. Metodą OCP określono wstępną odporność elektrody TNZ przed i po anodowaniu na korozję elektrochemiczną w warunkach bardzo zbliżonych do warunków *in vivo*, które panują w ludzkim ciele. Wartości  $E_{oc}$  wyznaczono w roztworze PBS o fizjologicznym pH 7,4 oraz pH 5,5 w temperaturze 37 °C.

Kwaśny roztwór PBS symulował w pomiarach elektrochemicznych stan zapalny pojawiający się w organizmie po zabiegu implantacji. Wszystkie wyznaczone wartości  $E_{oc}$  dla obydwu badanych elektrod były ujemne. Nieanodowana elektroda TNZ wykazała mniejszą odporność na korozję w PBS w porównaniu z elektrodą po anodowaniu, zarówno w obojętnym jak i kwaśnym elektrolicie. Taki charakter zmian w wartości  $E_{oc}$  wskazywał na zmniejszenie tendencji termodynamicznej do korozji elektrochemicznej elektrody TNZ z wytworzoną warstwą NT 2G. Najmniejszą odporność korozyjną wykazano dla nieanodowanej elektrody TNZ w roztworze PBS o pH 5,5, dla której średnia wartość  $E_{oc}$  wynosiła  $-0,513(30)$  V. Oznaczało to, że wzrost zawartości agresywnych jonów chlorkowych w elektrolicie przyspieszył proces korozji. Największa średnia wartość  $E_{oc}$  wynosząca  $-0,397(19)$  V została wyznaczona dla elektrody TNZ po anodowaniu w roztworze PBS o pH 7,4, co świadczyło o tym, że otrzymana anodowa warstwa NT 2G wykazała silniejsze właściwości barierowe w porównaniu do natywnej warstwy tlenkowej ([D6] rys. 11).

Wpływ anodowania na podatność na korozję wżerową stopu TNZ określony został w pomiarach potencjodynamicznych. Otrzymane anodowe krzywe polaryzacji przedstawione w postaci półlogarytmicznej wykazały podobny przebieg dla obydwu rodzajów badanych elektrod z widocznym pasywnym zachowaniem ([D6] rys. 12a). Obserwowano przesunięcie anodowych krzywych polaryzacji otrzymanych zarówno dla nieanodowanej, jak i anodowanej elektrody TNZ w kierunku potencjałów katodowych w kwaśnym roztworze PBS, co świadczyło o zmniejszeniu odporności badanych elektrod w porównaniu do wyników uzyskanych w roztworze PBS o fizjologicznym pH. Przyczyną takiego anodowego zachowania badanych elektrod był wzrost agresywności środowiska korozyjnego. Z drugiej strony można było zauważyć, że wytworzenie warstwy NT 2G o amorficznej strukturze spowodowało pożądane przesunięcie anodowych krzywych polaryzacji w kierunku potencjałów anodowych zarówno w fizjologicznym, jak i kwaśnym roztworze PBS w porównaniu z nieanodowaną elektrodą TNZ ([D6] rys. 12b). Wykazano, że w badanym zakresie potencjałów z limitem potencjału anodowego wynoszącym 9,4 V nie nastąpiło przebicie warstw tlenkowych do podłoża w roztworze PBS o pH 7,4 i 5,5, co świadczyło o braku podatności na korozję wżerową elektrody TNZ zarówno przed, jak i po anodowaniu. Uzyskane wyniki świadczą o wysokiej odporności korozyjnej badanych biomateriałów w środowisku biologicznym zawierającym jony chlorkowe, które mogą być proponowane do produkcji długoterminowych implantów.

Głównym osiągnięciem naukowym w publikacji [D6] było wykazanie wpływu zastosowanego procesu anodowania na poprawę właściwości bioelektrochemicznych *in vitro* stopu TNZ. Wykazany został wpływ anodowania na potencjał zeta stopu TNZ oraz możliwość otrzymania hydrofilowej powierzchni warstw NT 2G. Wykazano również wpływ anodowania na poprawę odporności stopu TNZ na korozję wżerową w środowisku biologicznym w wyniku wytworzenia amorficznych warstw NT 2G.

Uzyskane perspektywiczne wyniki badań dotyczących wytwarzania warstw NT 1G i 2G na powierzchni stopu TNZ metodą anodowania przyczyniły się do podjęcia prac nad otrzymaniem warstw NT 3G, które były przedmiotem badań w publikacji pt. *"Production and characterization of the third-generation oxide nanotubes on Ti-13Zr-13Nb alloy"* [D7]. Artykuł ten dotyczył opracowania sposobu otrzymywania warstw NT 3G na powierzchni stopu TNZ na drodze anodowania w nowych warunkach elektrochemicznych. Z szeregu elektrolitów stosowanych do wytwarzania warstw NT 3G na tytanie i jego stopach wybrano elektrolit na bazie 1M glikolu etylenowego, który charakteryzował się większą gęstością w porównaniu do elektrolitów używanych do otrzymywania warstw NT 1G oraz 2G. Jako źródło jonów fluorkowych zastosowano dodatek w postaci 4% wag.  $\text{NH}_4\text{F}$ . Anodowanie było prowadzone przy napięciu 5-35 V przy stałym czasie procesu wynoszącym 120 min. Charakterystyki prądowe zarejestrowane w procesie anodowania stopu TNZ w funkcji czasu w elektrolicie 1M  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$  + 4% wag.  $\text{NH}_4\text{F}$  wykazały, że wzrost napięcia anodowania w zakresie od 5 do 35 V powodował wzrost gęstości prądu anodowego ([D7] rys. 2a). Kształt uzyskanych krzywych nie był podobny do charakterystyk prądowych obserwowanych w procesie anodowego wytwarzania nanotubularnych struktur tlenkowych na tytanie w elektrolicie glikolu etylenowego bez i z dodatkiem 0,13–1% wag. wody w obecności jonów fluorkowych [19]. Przebieg gęstości prądu anodowego jako funkcji czasu wykazał podobieństwo do charakterystyk prądowych zaobserwowanych w procesie anodowania elektrody TNZ w elektrolicie 0,5% wag. HF (D1 rys. 1b). Zaobserwowano początkowe zmniejszenie gęstości prądu anodowego a następnie jej wzrost przed osiągnięciem wartości odpowiadającej quasi-ustalonemu stanowi. Na podstawie uzyskanych wyników dla pierwszych 80 s anodowania stwierdzono, że warunki quasi-ustalone były osiągnięte szybciej wraz ze wzrostem napięcia anodowania ([D7] rys. 2b). Taki kształt charakterystyk prądowych był związany z różnymi stadiami procesu tworzenia porów na powierzchni stopu TNZ. W pierwszym

etapie anodowania powstała warstwa tlenkowa o silnych właściwościach barierowych, której obecność była potwierdzona przez spadek gęstości prądu anodowego. W następnym etapie powierzchnia tlenku była lokalnie rozpuszczana z powodu aktywności jonów fluorkowych, a utworzone losowo pory zwiększały swoją wielkość. W wyniku wzrostu porów powierzchnia aktywna była zwiększana, co powodowało wzrost gęstości prądu anodowego. W ostatnim etapie powstałe pory dzieliły dostępny prąd równomiernie między sobą i następował proces samoorganizacji w warunkach stanu quasi-ustalonego. Mechanizm otrzymywania NT 3G na dwufazowym stopie TNZ szczegółowo opisano za pomocą reakcji elektrochemicznych (1-5). W mechanizmie tym jony fluorkowe obecne w elektrolicie tworzą z Ti, Nb oraz Zr rozpuszczalne w wodzie kompleksy zgodnie z reakcjami (1-3). Przyłożone napięcie do anody powoduje migrację jonów F<sup>-</sup> w głąb utworzonej warstwy tlenkowej, co opisuje reakcja (4). Proces, który kończy ciąg reakcji zachodzących w elektrolicie stanowi reakcja uwalniania tlenu z wody zgodnie z reakcją (5).

W badaniach SEM mikrostruktury stopu TNZ poddanego trawieniu w roztworze Kroll'a zaobserwowano charakterystyczne "igły" martenzytyczne pochodzące od fazy  $\alpha$  – Ti, które były ułożone w różnych kierunkach i osadzone w matrycy stanowiącej fazę  $\beta$  – Ti ([D7] rys. 3a). Obserwacje mikrostruktury stopu TNZ anodowanego przy napięciu 5 V ujawniły obecność warstwy tlenkowej o słabo rozwiniętej morfologii powierzchni, która charakteryzowała się brakiem nanorurkowej struktury ([D7] rys. 3b). Stwierdzono, że zwiększenie napięcia anodowania do 10 V spowodowało uzyskanie porowatej powierzchni warstwy tlenkowej, która uległa intensywnemu pękaniu i zwiększyła grubość, jednak obecność nanorurek tlenkowych nadal nie była widoczna ([D7] rys. 3c). Obrazy SEM mikrostruktury stopu TNZ anodowanego w zakresie napięć od 15 do 35 V potwierdziły obecność warstw NT 3G ([D7] rys. 4). Otrzymano jednościenne NT o eliptycznym kształcie przekroju i gładkich ściankach, które były równomiernie rozmieszczone na powierzchni warstw tlenkowych. Średnica uzyskanych NT i ich uporządkowanie rosło wraz z napięciem anodowania. Na podstawie obrazów SEM mikrostruktury wykazano, że średnia średnica zewnętrzna NT 3G wahała się od 104(13) nm dla stopu TNZ anodowanego przy 15 V do 230(30) nm dla próbki utlenionej przy 35 V ([D7] rys. 4). W przypadku średniej średnicy wewnętrznej obserwowano odpowiednio wzrost od 39(5) nm do 93(13) nm. Wykazano liniowość wzrostu średniej średnicy wewnętrznej i średniej średnicy zewnętrznej NT 3G wraz ze wzrostem napięć anodowania ([D7] rys. 5). Dwukrotnie większą szybkość wzrostu obserwowano dla średniej

średnicy zewnętrznej NT 3G. Co istotne, wyznaczone zostały równania liniowe opisujące zmianę średniej średnicy zewnętrznej NT 3G w funkcji napięcia anodowania ([D7] rys. 5a) oraz średniej średnicy wewnętrznej w zależności od napięcia anodowania ([D7] rys. 5b). Porównując wyznaczone równania z równaniami określonymi dla NT 2G otrzymanych na stopie TNZ [19] i NT 2G na stopie Ti6Al7Nb [20] wytworzonych w elektrolicie 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0,5% wag. NH<sub>4</sub>F stwierdzono najszybszy wzrost średniej średnicy zewnętrznej w przypadku NT 3G wytworzonych na stopie TNZ w zaproponowanym elektrolicie 1M C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> + 4% wag. NH<sub>4</sub>F, podczas gdy wzrost średniej średnicy wewnętrznej był najwolniejszy. Uzyskane wyniki wskazują, że najgrubsze ścianki nanorurek posiadały NT 3G na stopie TNZ. Wyprowadzone równania liniowe mogą być stosowane w przyszłości do wytwarzania warstw NT 3G na stopie TNZ o założonych parametrach morfologicznych. Grubość otrzymanych warstw NT 3G na stopie TNZ wyznaczono w nowatorski sposób stosując metodę skanującej sondy Kelvina ([D7] rys. 6). Wykazano, że długość nanorurek zmieniała się od 15,64(71) μm dla próbki anodowanej przy napięciu 5 V do 167,52(60) μm dla próbki utlenionej przy 35 V. Uzyskane wyniki wskazują, że NT 3G otrzymane w proponowanych warunkach anodowania są znacznie dłuższe niż NT 1G [D1] i 2G [D3] ([D7]). Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zastosowane napięcie anodowania i elektrolit odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu parametrów morfologicznych i długości NT 3G na powierzchni stopu TNZ.

Całkowita powierzchnia ( $A_{total}$ ) uzyskanych NT 3G została wyznaczona w oparciu o równanie (6).  $A_{total}$  przyjmowała wartości od  $3,78(19) \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup> dla warstwy NT 3G otrzymanej przy 15 V do  $3,39(17) \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup> dla próbki utlenionej przy 35 V, co świadczyło o 9-krotnym wzroście wartości tego parametru w badanym zakresie napięcia ([D7] rys. 7). Uzyskane wyniki sugerują, że wzrost  $A_{total}$  zapewniać będzie wzrost powierzchni kontaktu między warstwą NT 3G a tkanką, znacznie przyspieszając proces osseointegracji. Uzyskane wyniki mogą mieć szczególne znaczenie dla medycyny spersonalizowanej. Zgodnie z najnowszymi trendami w implantologii, warstwa NT może być nośnikiem leków dostarczanych do określonego miejsca i umożliwić ich kontrolowane uwalnianie do organizmu z określoną szybkością, w zależności od parametrów morfologicznych. Nanorurki tlenkowe mogą być również nośnikiem bakterycydów lub substancji tworzących tkanki.

Analizę kontrolną składu chemicznego komercyjnego stopu TNZ przed i po anodowaniu w proponowanych warunkach elektrochemicznych



wyznaczono metodą EDS. Otrzymane widma EDS w wybranych mikroobszarach na powierzchni obydwu badanych materiałów potwierdziły obecność pików pochodzących od Ti, Nb i Zr, które stanowiły składniki stopowe ([D7] rys. 8). W przypadku widma EDS uzyskanego dla anodowanego stopu TNZ dodatkowo zidentyfikowano pik pochodzący od tlenu, potwierdzający obecność warstewki tlenkowej wytworzonej na powierzchni badanego stopu przy napięciu 35 V. Analiza ilościowa widma EDS dla powierzchni nieanodowanego stopu wykazała zawartość 74,3(6) %wag. Ti, 12,9(6) %wag. Zr i 12,8(7) %wag. Nb. Uzyskane wyniki były zgodne ze składem chemicznym określonym przez producenta stopu. Zakładany skład chemiczny stopu TNZ zapewnia optymalne właściwości biokompatybilne i długoterminową odporność na korozję w środowisku biologicznym, co jest niezbędne w zastosowaniach medycznych.

W kolejnym etapie badań określono właściwości elektronowe powierzchni stopu TNZ przed i po modyfikacji elektrochemicznej przy napięciu 5-35 V za pomocą metody SKP ([D7] rys. 9). Stwierdzono, że wzrost lokalnej różnicy potencjałów kontaktowych (ang. *contact potential difference*, CPD) korelował ze wzrostem grubości warstwy tlenkowej utworzonej na powierzchni stopu TNZ i przyjmował najniższą wartość dla nieanodowanego stopu, co dowodziło najniższej stabilności wśród testowanych materiałów ([D7] rys. 9a). Analiza statystyczna otrzymanych map CPD pozwoliła wyznaczyć m.in. zależność średniej arytmetycznej CPD (ang. *arithmetic average*,  $CPD_{av}$ ) i odchylenia od średniej kwadratowej (ang. *root mean square deviation*,  $CPD_{rms}$ ) jako funkcje napięcia anodowania (D7] rys. 10). Parametr  $CPD_{rms}$  określał odchylenie wysokości CPD w stosunku do średniej arytmetycznej.  $CPD_{av}$  i  $CPD_{rms}$  pozwoliły opisać ilościowo właściwości elektryczne badanych powierzchni. Stop TNZ w stanie wyjściowym charakteryzował się najmniejszymi wartościami  $CPD_{av}$  i  $CPD_{rms}$ . Anodowanie powierzchni stopu przy napięciu od 5 do 35 V powodowało wzrost  $CPD_{av}$  w zakresie od -0,729 do -0,543 V i  $CPD_{rms}$  od 21,49 do 28,47 mV. Stwierdzono, że do wartości 10 V wartość parametru  $CPD_{av}$  wzrosła o około 40%, podczas gdy dla napięcia anodowania od 15 do 35 V, zmiana  $CPD_{av}$  wynosiła około 2%. Wykazano, że wzrost CPD korelował ze wzrostem grubości warstwy tlenkowej utworzonej na stopie TNZ. Anodowanie stopu TNZ przy napięciach powyżej 10 V powodowało niewielki wzrost parametru  $CPD_{rms}$  około 1,2 razy, co świadczyło o jedynie niewielkim wzroście wysokości pików i dolin CPD. Uzyskane wyniki wykazały, że powierzchnie warstw tlenkowych utworzonych przy napięciach anodowania od

5 do 35 V charakteryzowały się podobnymi nieregularnościami wysokości wokół średniej.

Ocenę wpływu anodowania na chropowatość powierzchni stopu TNZ przeprowadzono przy zastosowaniu metody profilometrii kontaktowej. Otrzymane profile 2D dla badanego stopu przed i po anodowaniu przy napięciu 15, 25 i 35 V były podstawą do wyznaczenia parametrów amplitudowych, takich jak średnia arytmetyczna rzędnych profilu chropowatości ( $R_a$ ), najwyższa wysokość profilu chropowatości ( $R_z$ ), wysokość najwyższego wzniesienia profilu chropowatości ( $R_p$ ) i *maksymalna głębokość wgłębienia profilu chropowatości* ( $R_v$ ) (D7] rys. 11). Wykazano, że podstawowe parametry tekstury powierzchni  $R_a$ ,  $R_z$ ,  $R_p$  i  $R_v$  były funkcjami wykładniczymi napięcia anodowania (D7] rys. 12). Najniższą wartość  $R_a$  równą  $0,10 \mu\text{m}$  zaobserwowano dla stopu TNZ przed utlenianiem, który posiadał gładką powierzchnię. W przypadku warstw NT 3G otrzymanych przy napięciach 25-35 V uzyskano wartość  $R_a$  w zakresie  $1.07\text{--}2.73 \mu\text{m}$ , co wykazało mikrochropowatość powierzchni. Najwyższa wartość  $R_a$  uzyskana dla stopu TNZ anodowanego przy 35 V świadczyła o najbardziej chropowatej powierzchni z licznymi porami o głębokości  $10 \mu\text{m}$ . Zgodnie z doniesieniami literaturowymi optymalna wartość  $R_a$  powierzchni, która może zapewnić stabilność implantu, wspomagać osteointegrację oraz zmniejszać ryzyko uwalniania jonów metali w wyniku procesów korozyjnych powinna mieścić się w zakresie  $1\text{--}3 \mu\text{m}$  [20,21].

Kontrola jakości wytworzonych warstw NT 3D przeprowadzona została w przyspieszonych badaniach korozyjnych w komorze solnej w sztucznej atmosferze obojętnej mgły solnej. Akredytowane badania przeprowadzono zgodnie z normą PN-EN ISO 9227-06 (test NSS) (D7] rys. 1). Czas ekspozycji badanych próbek na działanie obojętnej mgły solnej wynosił 168 h (D7] tab. 1). Metodą oceny wizualnej wykazano nieznaczne zmiany w makroskopowym wyglądzie próbek po teście NSS ((D7] rys. 13). W przypadku stopu TNZ w stanie wyjściowym stwierdzono pojawienie się przebarwień, które mogły mieć związek ze sposobem przygotowania powierzchni i/lub lokalnymi niejednorodnościami chemicznymi ((D7] rys. 13a). Zaobserwowano też zmniejszenie intensywności niebieskiej barwy powierzchni próbek po anodowaniu przy napięciu 15 V ((D7] rys. 13b), 25 V ((D7] rys. 13c) i 35 V ((D7] rys. 13d), co mogło być spowodowane rozpuszczaniem nanorurek. Obserwacje makroskopowe ujawniły również miejscowe przebarwienia i odpryski warstw tlenkowych na krawędziach podłoża, co mogło wynikać z kruchości NT 3G wytworzonych zwłaszcza przy wyższych napięciach

anodowania. Najwyższą jakość wykazano dla warstwy NT 3G uzyskanej w wyniku anodowania stopu TNZ przy napięciu 35 V. Ilościową ocenę wpływu obojętnej mgły solnej na jakość wytworzonych warstw NT 3G oparto o badania właściwości mikromechanicznych w pomiarach mikrotwardości metodą Vickers'a przed i po przyspieszonych badaniach w komorze solnej. Wykazano, że średnia mikrotwardość Vickers'a silnie zależała od napięcia anodowania ([D7] [rys. 14](#)). Przed testem NSS średnia mikrotwardość Vickers'a malała wraz ze wzrostem napięcia anodowania z 271 dla nieutlenionego podłoża do 65 dla stopu TNZ anodowanego przy 35 V, co mogło być spowodowane wzrostem średnicy nanorurek. Tylko nieznacznie niższe wartości  $HV_{0.1}$  określono po teście NSS, co potwierdziło wysoką odporność na korozję badanych warstw NT 3G w atmosferze obojętnej mgły solnej.

**Głównym osiągnięciem naukowym w publikacji [D7] było opracowanie sposobu otrzymywania warstw NT 3G na powierzchni stopu TZN metodą anodowania w nowych warunkach elektrochemicznych, który zapewnia wytwarzanie warstw tlenkowych charakteryzujących się wysoką jakością. Wyznaczono równania liniowe opisujące zmianę średniej średnicy zewnętrznej oraz średniej średnicy wewnętrznej NT 3G w funkcji napięcia anodowania, które mogą być stosowane do otrzymywania warstw NT 3G na stopie TNZ o założonych parametrach morfologicznych. Wykazano wpływ anodowania w zaproponowanych warunkach na poprawę właściwości elektronowych i wzrost chropowatości powierzchni implantacyjnego stopu TNZ.**

Artykułem wnoszącym istotny wkład w proces optymalizacji warunków anodowego wytwarzania warstw NT 3G na biomedycznym stopie TNZ była publikacja pt. *"Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications"* [D8]. Powyższy artykuł dotyczył opracowania sposobu otrzymywania warstw NT 3G na powierzchni stopu TNZ metodą anodowania w nowych warunkach elektrochemicznych. Podobnie jak w artykule [D7] zastosowano elektrolit 1M  $C_2H_6O_2$  + 4% wag.  $NH_4F$ , lecz proces anodowania przeprowadzono przy napięciu 50 V przez 80 min w temperaturze pokojowej. Na podstawie wyników uzyskanych metodą FE-SEM ([D8] [rys. 3](#)) wykazano, że zastosowane nowe warunki anodowania stopu TNZ pozwoliły na otrzymanie NT 3G charakteryzujących się średnią średnicą zewnętrzną 362(44) nm oraz średnią średnicą wewnętrzną 218(39) nm. Średnie wartości średnic NT 3G wyznaczono na podstawie histogramów rozkładu empirycznego ([D8] [rys. 5](#)). Średnia długość wytworzonych NT 3G wyniosła 9,7(6)  $\mu m$ .

Uwidoczniona morfologia powierzchni warstw NT 3G wykazała obecność jednościennych, prostopadle ukierunkowanych do podłoża nanorurek tlenkowych. Skład chemiczny otrzymanej warstwy NT 3G został określony za pomocą metody EDS ([D8] rys. 1b). Uzyskane widmo EDS ujawniło obecność pików pochodzących od Ti, Nb i Zr wchodzących w skład podłoża, podobnie jak w przypadku stopu TNZ przed anodowaniem ([D8] rys. 1a). Ponadto pik pochodzący od tlenu potwierdził obecność warstewki tlenkowej na powierzchni anodowanego stopu. Analiza strukturalna przeprowadzona metodą GIXD wykazała poszerzone maksimum dyfrakcyjne między  $20$  a  $35^\circ 2\theta$  wskazujące na rentgenowsko amorficzny charakter warstwy NT 3G ([D8] rys. 2b). Analiza fazowa XRD stopu TNZ w stanie wyjściowym potwierdziła dwufazową  $\alpha + \beta$  strukturę stosowanego podłoża ([D8] rys. 2a). Na otrzymanym widmie rentgenowskim wykazano występowanie linii dyfrakcyjnych odpowiadających fazie  $\alpha - \text{Ti}$  oraz  $\beta - \text{Ti}$ .

Uwidoczniona pojedyncza nanorurka na obrazie TEM ([D8] rys. 4a, b, c) potwierdziła wytworzenie całkowicie wyodrębnionych struktur. Zarejestrowane widmo dyfrakcyjne dla pojedynczej nanorurki wykazało jej amorficzny charakter ([D8] rys. 4d). Widmo EDS otrzymane dla pojedynczej nanorurki ujawniło, że powstałe NT 3G składają się z Ti, Nb, Zr oraz tlenu ([D8] rys. 4i). Uzyskane mapy EDS wykazały, iż obecne tlenki w pojedynczej nanorurce są równomiernie rozmieszczone ([D8] rys. 4e-h). Badania przeprowadzone metodą XPS ujawniły, że w skład otrzymanej warstwy NT 3G wchodzi  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  oraz  $\text{ZrO}_2$  i  $\text{ZrO}_x$  ([D8] rys. 6b, d, f). Analiza widm XPS otrzymanych dla stopu TNZ przed anodowaniem uwidoczniała stany chemiczne  $\text{Ti}_{2p}$ ,  $\text{Nb}_{3d}$  i  $\text{Zr}_{3d}$  badanych składników stopu. Samopasywna warstewka tlenkowa obecna na powierzchni stopu TNZ składała się z tytanu występującego w dwóch stanach chemicznych: tlenku tytanu  $\text{TiO}_2$  oraz tlenku zredukowanego  $\text{Ti}^{3+}$  ([D8] rys. 6a). Położenie i kształt linii  $\text{Nb}_{3d}$  dla niobu wskazał jego występowanie w dwóch stanach chemicznych: tlenku  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  i niobu w stanie metalicznym. Niob występował najprawdopodobniej w związku z cyrkonem ([D8] rys. 6c). Cyrkon w natywnej warstewce tlenkowej pojawiał się w trzech stanach energetycznych: w stanie metalicznym, najprawdopodobniej w kompleksie z niobem, jako tlenek cyrkonu  $\text{ZrO}_2$  oraz tlenek cyrkonu  $\text{ZrO}_x$  ([D8] rys. 6e). Zarówno niob jak i cyrkon należą do pierwiastków wysoce biozgodnych, stąd też zbudowana z trzech wysoce biozgodnych pierwiastków warstwa samopasywana podwyższa biotolerancję materiału w kontakcie z środowiskiem okołowszczepowym [22,23].

Wytworzone warstwy NT 3G poddano ocenie hemokompatybilności zgodnie z normą ASTM F756-00. W teście hemolizy wykazano, że indeks hemolityczny dla stopu TNZ przed modyfikacją powierzchni wynosił 0,30(8), co świadczyło o pozytywnej odpowiedzi hemokompatybilnej, a w przypadku stopu z wytworzoną warstwą NT 3G osiągnął wartość 0,00 ([D8] rys. 7). Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zastosowanie elektrochemicznej modyfikacji powierzchni stopu TNZ na drodze anodowania pozwoliło praktycznie całkowicie wyeliminować proces hemolizy.

Badania odporności korozyjnej *in vitro* stopu TNZ przed i po anodowaniu przeprowadzono metodą OCP, EIS i anodowych krzywych polaryzacji w roztworze 0,9% NaCl w temperaturze 37 °C. Wyznaczona wartość  $E_{oc}$ , która może być w przybliżeniu traktowana jako potencjał korozyjny, wynosiła -0,143 V dla elektrody TNZ i -0,183 V w przypadku elektrody z wytworzoną warstwą NT 3G na powierzchni, co wskazuje na szybsze rozpuszczanie warstwy NT 3G w porównaniu do samopasywnej warstwy tlenkowej ([D8] rys. 8). Otrzymana krzywa przedstawiająca zależność  $E_{oc}$  w funkcji czasu zanurzenia dla elektrody TNZ wykazała typowe zachowanie charakterystyczne dla spontanicznego tworzenia pasywnej warstwy tlenkowej na tytanie i jego stopach w środowisku biologicznym. W przypadku anodowanej elektrody TNZ uzyskano inny przebieg  $E_{oc}$  w czasie z gwałtownym obniżeniem wartości potencjału obwodu otwartego w pierwszych 30 minutach i późniejszym ciągłym wzrostem jego wartości aż do końca pomiaru. Takie zachowanie mogło być związane z porowatą powierzchnią badanej elektrody i powolnym wnikaniem elektrolitu do wnętrza nanorurek.

Szczegółową charakterystykę mechanizmu i kinetyki korozji elektrochemicznej *in vitro* badanych elektrod przeprowadzono w oparciu o pomiary impedancyjne. Eksperymentalne widma EIS otrzymane przy  $E_{oc}$  przedstawiono w postaci diagramów Bode w postaci zależności logarytmu  $|Z|$  w funkcji logarytmu częstotliwości (D8] rys. 9a) oraz kąta przesunięcia fazowego od logarytmu częstotliwości (D8] rys. 9b). W przypadku obydwu badanych elektrod otrzymano wysokie wartości  $|Z|_{f \rightarrow 0}$  i  $\varphi$  bliskie -90 °, co świadczyło o typowym pojemnościowym zachowaniu materiałów o wysokiej odporności na korozję. Nieco wyższe wartości  $\log|Z|$  w całym zakresie badanych częstotliwości wykazano dla elektrody TNZ w stanie wyjściowym, która charakteryzowała się wyższą odpornością korozyjną zapewnioną przez obecność samopasywnej warstwy tlenkowej o właściwościach barierowych. W przypadku obydwu badanych elektrod widoczna była tylko jedna stała

czasowa w obwodzie elektrycznym. Do interpretacji wszystkich otrzymanych widm EIS zastosowano modelowanie fizyko-chemiczne oparte o koncepcję elektrycznych obwodów zastępczych przy użyciu zmodyfikowanego modelu celki Randles'a ([D8] rys. 9c). W procedurze dopasowania elektrycznego obwodu zastępczego do eksperymentalnych widm EIS stosowana była metoda CNLS i CPE o impedancji opisanej równaniem (4). W wyniku przeprowadzonego dopasowania otrzymano parametry elektrycznego obwodu zastępczego, takie jak  $R_s$ ,  $R_{ox}$ ,  $T_{dl}$  i  $\phi_{dl}$  ([D8] tab. 1). Wykazano, że wartość  $R_{ox}$  oznaczająca opór przeniesienia ładunku dla granicy międzyfazowej TNZ | samopasywna warstwa tlenku | elektrolit wynosiła  $1,24 \cdot 10^7 \Omega \text{ cm}^2$  i była około dwa rzędy wielkości większa niż dla granicy międzyfazowej TNZ | NT 3G | elektrolit. Oznacza to, że kinetyka korozji elektrochemicznej w roztworze soli fizjologicznej była wolniejsza na gładkiej powierzchni elektrody TNZ w stanie wyjściowym w porównaniu z anodowaną elektrodą TNZ o porowatej powierzchni. Wartości  $\phi_{dl}$  wykazały, że chropowatość powierzchni i heterogeniczności warstwy NT 3G nie powodowały znaczących zmian w zachowaniu impedancyjnym anodowanej elektrody TNZ. Stop TNZ swoją wysoką odporność na korozję oraz wysoką biokompatybilność zawdzięcza obecności spontanicznie tworzącej się na powierzchni cienkiej, samopasywnej warstewce tlenkowej o grubości 1-8 nm [24]. Warstwa ta odpowiada za biologiczną obojętność i biotolerancję wyrobów medycznych z tytanu i jego stopów.

Podatność na korozję wżerową stopu TNZ przed i po anodowaniu scharakteryzowano w pomiarach potencjodynamicznych ([D8] rys. 10). Na uzyskanych anodowych krzywych polaryzacji stwierdzono zbliżone wartości  $E_{cor}$  i pasywne zachowanie dla obydwu badanych elektrod. Jediną różnicą w otrzymanych anodowych krzywych polaryzacji są większe wartości gęstości prądu anodowego przy potencjałach powyżej 5,5 V dla elektrody TNZ w stanie wyjściowym. Sugeruje to, że anodowe rozpuszczanie samopasywnej warstwy tlenkowej przy wysokich potencjałach jest szybsze niż warstwy NT 3G. W przeprowadzonych pomiarach potencjodynamicznych nie zaobserwowano przebiccia warstewek tlenkowych świadczącego o inicjacji korozji wżerowej, co jest charakterystyczne dla tytanowych implantów w środowisku zawierającym agresywne jony chlorkowe [12].

**Głównym osiągnięciem naukowym w publikacji [D8] było opracowanie sposobu otrzymywania warstw NT 3G na powierzchni stopu TZN metodą anodowania w elektrolicie  $1M \text{ C}_2\text{H}_6\text{O}_2 + 4\% \text{ wag. NH}_4\text{F}$  w nowych**

warunkach napięciowo-czasowych. Wykazano, że zastosowanie proponowanej elektrochemicznej modyfikacji powierzchni pozwala całkowicie wyeliminować hemolizę stopu TNZ.

W kolejnym etapie badań przeprowadzona została ocena porównawcza właściwości biotribologicznych i mikromechanicznych otrzymanych warstw NT 1G, 2G i 3G na biomedycznym stopie TNZ. Ze względu na fakt, że w doniesieniach literaturowych dominują badania stopów tytanu prowadzone w warunkach tarcia suchego, podjęta została próba oceny zużycia biotribologicznego stopu TNZ przed i po proponowanej modyfikacji powierzchni w środowisku biologicznym. Celem pracy *"Influence of anodizing conditions on biotribological and micromechanical properties of Ti-13Zr-13Nb alloy"* [D9] było określenie, w jaki sposób warunki anodowania determinują właściwości mikromechaniczne i biotribologiczne implantacyjnego stopu TNZ.

Warstwy nanorurek tlenkowych wytworzono przy zastosowaniu opracowanych sposobów modyfikacji elektrochemicznej stopu TNZ opisanych dla NT 1G w artykule [D1], NT 2G w publikacji [D5] oraz NT 3G w pracy [D8]. Obecność wytworzonych warstw NT 1G, 2G i 3G na powierzchni podłoża potwierdzono w badaniach mikroskopowych przeprowadzonych metodą SEM ([D9] rys. 2). W powyższym artykule zamieszczono wyniki badań mikromechanicznych polegających na wyznaczeniu mikrotwardości stopu TNZ przed i po anodowaniu metodą Vickers'a. Znajomość mikrotwardości może być szczególnie przydatna do oceny integralności strukturalnej tkanki kostnej na powierzchni porowatej warstwy NT oraz tkanki kostnej otaczającej implant w procesie osteointegracji [25,26]. Dlatego zasadnym było porównanie właściwości mikromechanicznych stopu TNZ w stanie wyjściowym i po procesie utleniania elektrochemicznego. Mikrotwardość badanych materiałów zmieniała się w zależności od zastosowanego obciążenia ([D9] rys. 3). Dla stopu nieanodowanego wraz ze wzrostem obciążenia w zakresie od 490 do 4900 mN zaobserwowano stałą wartość mikrotwardości, która w granicach błędu wynosiła 302(1). W przypadku warstw NT 1G, 2G i 3G mikrotwardość zależała od przyłożonego obciążenia, co wynikało z różnych długości badanych nanorurek i ich parametrów morfologicznych. W przypadku warstwy NT 1G zaobserwowano wzrost mikrotwardości w porównaniu ze stopem TNZ, której wartość zmniejszała się w zakresie od 433(1) do 340(7) wraz z rosnącym obciążeniem. Takie właściwości mikromechaniczne warstwy NT 1G wynikały z najmniejszej zewnętrznej średnicy nanorurek i ich najkrótszej długości spośród wszystkich badanych generacji warstw NT. Warstwa NT 1G charakteryzowała

się największą liczbą nanorurek na powierzchni, a zatem wykazywała największą nośność [27]. Wartość mikrotwardości malała dla warstw NT 2G i 3G w porównaniu z podłożem i warstwą NT 1G. Warstwy NT 2G wykazały najmniejszą mikrotwardość w zakresie od 181(5) do 252(6) wraz ze wzrostem obciążenia od 490 do 4900 mN. Warstwy NT 3G ujawniły nieco większą mikrotwardość niż warstwy NT 2G, która zmieniała się od 254(3) do 221(3) wraz ze wzrostem obciążenia. Większe zewnętrzne średnice NT 2G i 3G i ich większa długość powodowały łatwiejsze odkształcanie i pękanie uzyskanych nanorurek. Wraz ze wzrostem średnicy NT na powierzchni stopu TNZ, zmniejszała się liczba NT przenoszących obciążenia w obszarze styku badanych powierzchni z wgłębnikiem diamentowym. Z drugiej strony wytworzone NT były w stanie zrekompensować dużą twardość biomedycznego stopu TNZ stosowanego do produkcji implantów. Warstwy NT mogą eliminować naprężenia implant-kość ograniczając zjawisko „stress shielding” [28,29].

Badania biotribologiczne stopu TNZ przed i po procesie anodowania przeprowadzono w warunkach tarcia ślizgowego w obecności roztworu Ringer'a, który był biologicznym płynem smarującym. Charakteryzowane materiały badano w ruchu posuwisto-zwrotnym w układzie kula-tarcza ([D9] rys. 1). Analiza mikroskopowa śladów wytarcia przeciwpróbek po testach biotribologicznych wykazała kierunek uszkodzenia kulki  $ZrO_2$  w kierunku od góry do dołu dla wszystkich badanych materiałów ([D9] rys. 4). Na podstawie przeprowadzonych obserwacji mikroskopowych wyznaczono średnią wartość średnicy śladu wytarcia przeciwpróbki ( $d_{av}$ ) ([D9] rys. 5a) i obliczono średnie zużycie objętościowe kulki ( $V_b$ ) ([D9] rys. 5b). Wartość  $d_{av}$  dla stopu TNZ w stanie wyjściowym wyniosła 650(11)  $\mu m$ . Parametr  $d_{av}$  charakteryzował się większymi wartościami w obecności warstw NT trzech generacji wytworzonych na podłożu stopu wskazując wzrost  $V_b$ . W oparciu o parametr  $d_{av}$  obliczono średnią powierzchnię zużycia ( $A_{av}$ ), która przyjęła najmniejszą wartość równą 6814(64)  $\mu m^2$  dla stopu TNZ wyjściowym ([D9] rys. 8a). Wraz ze wzrostem średniej średnicy zewnętrznej NT i ich długości obserwowano wzrost  $A_{av}$ . Wartość  $A_{av}$  określona dla nieanodowanego podłoża była ponad 2 razy mniejsza niż w przypadku warstw NT 2G i 3G. Na podstawie otrzymanych profili przekrojów poprzecznych śladów wytarcia dla badanych materiałów po teście zużycia biotribologicznego wykazano, że zużycie biotribologiczne powierzchni materiału zależało od warunków anodowania ([D9] rys. 6). Powierzchnia stopu TNZ w stanie wyjściowym wykazała mniejsze zużycia materiału w porównaniu z anodowanymi powierzchniami. Szerokość śladu zużycia dla nieanodowanej



powierzchni stopu wynosiła 665(7)  $\mu\text{m}$ , a dla elektrochemicznie utlenionych powierzchni wzrastała, osiągając największą wartość 827(8)  $\mu\text{m}$  dla warstwy NT 2G ([D9] rys. 7a). Najmniejszą głębokość śladu zużycia wykazano dla podłoża stopu, która osiągnęła wartość 14(1)  $\mu\text{m}$  ([D9] rys. 7a). Stwierdzono, że wszystkie generacje warstw NT wykazały większą głębokość śladu zużycia w porównaniu z nieanodyzowanym podłożem, przy czym największą wartość głębokości śladu zużycia wynoszącą 25(1)  $\mu\text{m}$  zaobserwowano dla warstwy NT 2G. Największą odpornością na zużycie ściernie charakteryzował się stop TNZ z samopasywną warstwą tlenkową na powierzchni, dla którego średnie zużycie objętościowe materiału ( $V_m$ ) wyniosło  $8,20(4) \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3/\text{Nm}$  ([D9] rys. 8b). Odporność na zużycie ściernie dla warstw NT 1G, 2G i 3G była mniejsza w porównaniu do podłoża. Największą wartość  $V_m$  równą  $1,79(9) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3/\text{Nm}$  wyznaczono dla warstwy NT 2G. Tak duże zużycie NT wynikało z porowatości badanych warstw. Podczas procesu tarcia cienkie ścianki NT 2G i 3G o mniejszej mikrotwardości w porównaniu z podłożem i warstwą NT 1G łatwiej pękały, co powodowało większe zużycie materiału ([D9] rys. 3). Określono kinetyczny współczynnik tarcia ( $\mu_k$ ) dla podłoża TNZ oraz trzech generacji NT ([D9] rys. 9). Im mniejsza wartość  $\mu_k$  była obserwowana dla badanych materiałów, tym większe zużycie objętościowe materiału i mniejsza odporność na zużycie ściernie miały miejsce. Warstwy NT 2G charakteryzowały się najmniejszą wartością  $\mu_k$  równą 0,86(6), co przełożyło się na jej największe zużycie objętościowe wśród badanych materiałów ([D9] rys. 9 e, f). Podobne wartości  $\mu_k$  obserwowano w literaturze dla piaskowanej i sterylizowanej powierzchni tytanu [30,31]. Najwyższą wartością  $\mu_k$  wynoszącą 0,94(1) charakteryzowała się powierzchnia NT 1G o najmniejszej średnicy i długości nanorurek ([D9] rys. 10). Mikroskopowe obrazy śladów zużycia badanych materiałów ujawniły obecność zadrapań i bruzd, które były wynikiem ruchu produktów zużycia wzdłuż ścieżki roboczej przeciwpróbki ([D9] rys. 11). Powierzchnia stopu TNZ w stanie wyjściowym charakteryzowała się licznymi zagłębieniami wypełnionymi resztkami ściernego materiału i smarem w postaci roztworu Ringera ([D9] rys. 11a, b). Powierzchnia warstwy NT 1G ([D9] rys. 11c, d) i warstwy NT 2G ([D9] rys. 11e, f) również wykazała duże straty materiału. Nagromadzenie ściernego materiału było widoczne w obszarze kontaktu przeciwpróbki ze ścieżką wytarcia. Powierzchnia NT 3G NT wykazała rozwarstwienie warstwy tlenku ([D9] rys. 11g, h) i pęknięcia, które były spowodowane cyklicznym obciążeniem podczas testu biotribologicznego. Pęknięcia poprzeczne widoczne na obrazie zużycia dla warstwy NT 3G wskazały na dodatkowe zużycie

zmęczeniowe. Analiza mikroskopowych ścieżek wytarcia wykazała, że zużycie ściernie było dominującym mechanizmem. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano mechanizm zużycia ściernego trzech ciał (ang. *three-body abrasion wear mechanism*) dla stopu TNZ przed i po anodowaniu ([D9] rys. 12). W proponowanym mechanizmie, pomiędzy powierzchnią stopu TNZ z warstwą tlenkową i powierzchnią kulki ZrO<sub>2</sub> znajdują się cząstki zużytego materiału, które działają jako nośnik ścierny. Zużycie wynika ze stopniowej utraty materiału na powierzchni. Zużyte resztki powstają głównie w postaci pojedynczych lub zagregowanych NT w wyniku pęknięcia warstw tlenkowych.

**Głównym osiągnięciem naukowym w pracy [D9] było wykazanie silnego wpływu przeprowadzonej elektrochemicznej modyfikacji powierzchni stopu TNZ przy użyciu metody anodowania w proponowanych warunkach elektrochemicznych na jego właściwości mikromechaniczne i biotribologiczne w roztworze Ringer'a. Wykazano, że mikrotwardość i odporność na zużycie biotribologiczne otrzymanych warstw NT maleje ze wzrostem i długością nanorurek. Zmniejszenie mikrotwardości anodowanego stopu TNZ może w praktyce klinicznej eliminować niepożądane naprężenia implant-kość.**

Badania dotyczące poprawy biofunkcjonalności implantacyjnego stopu TNZ były kontynuowane w publikacji pt. "*Biological activity and thrombogenic properties of oxide nanotubes on the Ti-13Nb-13Zr biomedical alloy*" [D10]. Podjęte badania miały na celu określenie wpływu opracowanych warunków anodowania na właściwości biologiczne *in vitro* stopu TNZ. Anodowe warstwy nanorurek tlenkowych na powierzchni stopu TNZ otrzymano w wodnych elektrolitach zawierających aktywne jony fluorkowe ([D10] rys. 1) zgodnie z zaproponowanym sposobem wytwarzania NT 1G [D1], NT 2G [D5] i NT 3G [D8]. Charakterystyka właściwości biologicznych stopu TNZ przed i po procesie anodowania obejmowała badania cytotoksyczności, adhezji, trombogenności, hemokompatybilności i zwilżalności. Ponadto podjęto próbę zastosowania wytworzonych warstw NT 1G, 2G i 3G jako nośniki leków do zastosowań w systemach kontrolowanego uwalniania leków.

Obecność wytworzonych warstw NT była potwierdzona w badaniach mikroskopowych przy użyciu metody FE-SEM i TEM ([D10] rys. 2). Z obserwowanych obszarów NT na obrazach mikroskopowych TEM otrzymano i zanalizowano obrazy dyfrakcji elektronów (SAED), na podstawie których wykazano amorficzny charakter nanorurek każdej badanej generacji.

Ze względu na fakt, że chropowatość powierzchni materiałów implantacyjnych wpływa na przyczepność, a zatem siłę połączenia implant-kość, przeprowadzone zostały badania wpływu warunków anodowania na chropowatość powierzchni stopu TNZ. Istotnym elementem uzyskania dobrego połączenia adhezyjnego jest odpowiednie rozwinięcie powierzchni styku projektowanych biomateriałów. Geometryczną strukturę powierzchni stopu TNZ po procesie anodowania scharakteryzowano w badaniach profilometrycznych przeprowadzonych metodą profilometrii kontaktowej. Otrzymano profile 2D dla warstw NT 1G, 2G i 3G na powierzchni stopu TNZ, które były poddane analizie w celu wyznaczenia parametrów amplitudowych ([D10] rys. 3). Wszystkie uzyskane profile powierzchni były symetryczne. Omówienie wpływu warunków anodowania na chropowatość powierzchni stopu TNZ oparto na wybranym parametrze  $R_a$ . W przypadku warstwy NT 1G wartość  $R_a$  wynosiła 0,16(01)  $\mu\text{m}$ , a dla warstwy NT 2G osiągnęła zbliżoną wartość 0,13(01)  $\mu\text{m}$ . Warstwa NT 3G charakteryzowała się największą wartością parametru  $R_a$  równą 1,34(04)  $\mu\text{m}$ . Wzrost  $R_a$  dla warstwy NT 3G wynika z bardziej rozwiniętej powierzchni i grubszej warstwy tlenkowej w porównaniu z warstwami NT 1G i NT 2G ([D10] tab. 2). W przypadku nieanodowanego stopu TNZ o gładkiej powierzchni wartość  $R_a$  wynosiła 0,10  $\mu\text{m}$  [D7 rys. 1]. Na podstawie uzyskanych wyników można oczekiwać, że warstwa NT 3G będzie umożliwiać najlepszą stabilność połączenia implant-tkanka kostna. Dodatkowo może przyspieszać proces osteointegracji oraz zmniejszać ryzyko uwalniania jonów metali w wyniku procesów korozyjnych i zużycia biotribologicznego. Wyznaczona wartość  $R_a$  dla warstwy NT 3G mieści się w optymalnym zakresie wymaganym dla dobrego zakotwiczenia implantu. Badania aktywności tkanki kostnej po wszczepieniu królikom tytanowych implantów o gładkiej i chropowatej powierzchni wykazały, że lepszy kontakt implantu z kością oraz większą objętość tkanki kostnej uzyskano dla powierzchni chropowatych w porównaniu do powierzchni gładkich [32,33].

Badania warstw NT 1G i 2G przeprowadzone przy zastosowaniu metody XPS podobnie, jak w przypadku warstw NT 3G w pracy [D7] wykazały, że tytan występuje głównie w postaci  $\text{TiO}_2$  i zredukowanego tlenku ([D10] rys. 4a-b). Linia Nb3d dla warstw NT 1G i 2G wskazuje na obecność niobu w jednym stanie chemicznym  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  ([D10] rys. 4c-d). Taki sam wynik dla niobu zaobserwowano również dla warstw NT 3G w pracy [D7]. Analiza linii cyrkonu ujawniła pewne podobieństwa między powierzchniami warstw NT 1G i 2G ([D10] rys. 4e-f). Położenie i kształt linii wykazały obecność cyrkonu w dwóch stanach

chemicznych:  $ZrO_2$  oraz  $Zr(OH)$ . Ponadto wyznaczono udziały poszczególnych stanów chemicznych dla warstw NT 1G, 2G i 3G oraz stopu TNZ przed modyfikacją powierzchni ([D10] rys. 4g). Można zaobserwować, że Nb i Zr związany z tlenem lub grupą OH w anodowych warstwach NT są względnie stabilne. Ich ilość nie zależy od zastosowanej procedury modyfikacji elektrochemicznej. W przypadku tytanu zastosowane anodowanie zasadniczo wpływa na ilość tytanu, ale także na stany chemiczne tytanu. Warto zauważyć, że zastosowane procedury elektrochemicznego utleniania stopu TNZ we wszystkich trzech generacjach prowadzą do zmian względnych stosunków rozpatrywanych pierwiastków ([D10] rys. 4h). Zmiany te są związane z tytanem, gdyż zmieniają się jedynie względne stosunki Ti/Zr i Ti/Nb w porównaniu z próbką referencyjną. Na podstawie badań warstw NT 1G i 2G można również zaobserwować, że nawet jeśli względna ilość składników próbek jest prawie identyczna, jak zaobserwowano dla warstw NT 1G i 3G, ich skład chemiczny jest różny.

Właściwości elektronowe uzyskanych warstw 1G, 2G i 3G scharakteryzowano w badaniach przy zastosowaniu metody SKP w pomiarach CPD i porównano z wynikami uzyskanymi dla stopu TNZ w stanie wyjściowym ([D10] rys. 5). Analiza statystyczna map CPD pozwoliła na określenie parametrów  $CPD_{av}$ ,  $CPD_{rm}$ ,  $CPD_{sk}$ ,  $CPD_{ku}$  i  $CPD_{al}$ . Parametry te pozwoliły ilościowo opisać właściwości elektroniczne powierzchni stopu TNZ przed i po anodowaniu. Uzyskane wyniki wykazały, że wraz ze wzrostem średnic otrzymanych NT wzrasta wartość parametru  $CPD_{av}$ . Najmniejszą wartość  $CPD_{av}$  dla wytworzonych warstw NT wykazała warstwa NT 1G. Parametry  $CPD_{rms}$  uzyskane dla badanych powierzchni wykazały rosnące wysokości CPD w kolejności TNZ, NT 1G, NT 2G i NT 3G. Jednocześnie wartości parametru  $CPD_{al}$  pokazały, że długość korelacji jest największa dla podłoża TNZ i malała w przypadku powierzchni stopu pokrytej nanorurkami ([D10] tab. 3). Parametry  $CPD_{rms}$  i  $CPD_{al}$  wykazały, że podłoże TNZ charakteryzowało się najbardziej jednorodną powierzchnią spośród wszystkich badanych materiałów, a także, że wytwarzanie nanorurek na powierzchni TNZ zwiększa jej niejednorodność elektryczną [34–36]. Wzrost  $CPD_{rms}$  i  $CPD_{al}$  wyznaczonych dla powierzchni stopu z wytworzonymi warstwami NT można wytłumaczyć zwiększeniem wymiarów zewnętrznych średnic nanorurek, które wynosiły 87(10) nm dla NT 1G, 103(10) nm dla 2G i 342(34) nm 3G ([D10] tab. 2). Parametr  $CPD_{sk}$  i  $CPD_{ku}$  dostarczyły dodatkowych informacji na temat profilu pików lub dolin. Histogramy wartości CPD z dopasowanymi rozkładami Gaussa pozwoliły na

określanie średniej arytmetycznej  $CPD_{av}$  i odchylenia standardowego ([D10] rys. 6). Uzyskane wyniki wykazały, iż cała powierzchnia bezwanadowego stopu TNZ była równomiernie pokryta warstwami NT, niezależnie od rodzajów zastosowanych roztworów i parametrów anodowania ([D10] rys. 6).

W kształtowaniu właściwości powierzchni implantów należy również wziąć pod uwagę zwilżalność, która jest istotna dla procesu osteoindukcji poprzedzającego osseointegrację. Ponadto zwilżalność wpływa na absorpcję cząsteczek sprzyjających adhezji fibroblastów i/lub bakterii [37,38]. Dlatego w dalszej części pracy [D10] przeprowadzono badania kąta zwilżania metodą siedzącej kropli w powietrzu dla otrzymanych warstw NT 1G, 2G i 3G oraz stopu TNZ w stanie wyjściowym. Wyniki badań zwilżalności powierzchni wytworzonych warstw NT wykazały, że kąt zwilżania ( $\Theta$ ) wyznaczony dla nieanodowanego stopu TNZ wynosił  $62,9(9)^\circ$ , a dla warstw NT 1G, 2G i 3G przyjmował kolejno wartość  $25,3(5)^\circ$ ,  $11,9(1)^\circ$  i  $14,7(2)^\circ$  ([D10] rys. 7). Przeprowadzone pomiary  $\Theta$  wykazały korzystny, hydrofilowy charakter powierzchni stopu TNZ zarówno przed jak i po anodowaniu. Zmniejszenie wartości  $\Theta$  zaobserwowane dla anodowych warstw NT wskazuje na wzrost hydrofilowości w porównaniu do wyniku uzyskanego dla podłoża. Najkorzystniejsze właściwości hydrofilowe wykazała warstwa NT 2G, a następnie NT 3G i NT 1G. Najmniejszą wartość  $\Theta$  określono dla stopu TNZ. Uzyskane wyniki zwilżalności powierzchni warstw nanorurek tlenkowych na tytanie są podobne [39]. Powierzchnie hydrofilowe wykazują wyższą aktywność biologiczną w kontakcie z płynami ustrojowymi, a tym samym zapewniają lepszą osseointegrację [40].

Badania wpływu anodowania na hemokompatybilność *in vitro* stopu TNZ przeprowadzono w teście hemolizy według normy F756-00, zgodnie z którą wartość indeksu hemolitycznego mniejsza niż 2 wskazuje, że biomateriał jest niehemolityczny. Wyniki testu hemolizy uzyskane dla nieanodowanego stopu TNZ wykazały najwyższy indeks hemolityczny równy 0,30 ([D8] rys. 7). Uzyskane wyniki badań hemokompatybilności dla warstw NT 1G i 2G ujawniły w obydwu przypadkach niższą wartość indeksu hemolitycznego wynoszącą 0,05 w porównaniu do stopu TNZ ([D10] rys. 8), która była tylko nieznacznie wyższa niż indeks hemolityczny dla warstwy NT 3G wynoszący 0,00 ([D8] rys. 7)). Uzyskane wyniki dowodzą, że zaproponowana modyfikacja elektrochemiczna zapewnia wyjątkową zgodność stopu TNZ z krwią.

Charakterystykę wpływu anodowania na interakcję stopu TNZ ze środowiskiem biologicznym przeprowadzono przy zastosowaniu hodowli komórkowych i odpowiedzi komórkowej. W przeprowadzonych badaniach biologicznych *in vitro* określono cytotoksyczność stopu TNZ przed i po anodowaniu. W teście MTT nie wykazano cytotoksyczności dla linii mysich komórek fibroblastów L-929 zarówno dla nieanodowanego podłoża jaki i otrzymanych warstw NT 1G, 2G i 3G ([D10] tab. 4). Można też zauważyć, że w przypadku trzech generacji warstw NT wytworzonych na stopie TNZ uzyskane wyniki są podobne. Adhezja, proliferacja i migracja komórek tworzących tkankę kostną jest związana ze średnicami nanorurek. Potwierdzają to liczne badania wskazujące, że powierzchnia NT sprzyja wzrostowi komórek. Należy zauważyć, że różne grupy badawcze stosowały różne kolonie komórek, co wpływało na wyniki badań [41,42]. Przeprowadzono również badania adhezji komórek do powierzchni anodowych warstw NT 1G, 2G i 3G oraz stopu TNZ w stanie wyjściowym. Wykazano, że komórki przylegały z różną wydajnością ([D10] tab. 5). Dla samopasywnej warstwy tlenkowej obecnej na stopie TNZ i warstwy NT 1G uzyskano wysoką przyczepność. W przypadku warstw NT 2G i 3G stwierdzono średnią adhezję. Uzyskane wyniki można powiązać z różnymi średnicami i długościami otrzymanych nanorurek w zależności od generacji. Adhezja komórek zmniejszała się wraz ze wzrostem i długością NT. W licznych badaniach udowodniono, że komórki kościotwórcze (osteoblasty) przylegają do powierzchni, która jest morfologicznie i chemicznie podobna do naturalnej tkanki kostnej [43,44]. Wykazano, że nanorurki tlenkowe o mniejszej średnicy wykazywały bardziej stymulujący wpływ na wzrost i różnicowanie komórek [45].

Badania trombogenności przeprowadzono dla stopu TNZ przed i po anodowaniu ([D10] rys. 8). Krew użyta w badaniach pochodziła od zdrowych ludzkich ochotników po upewnieniu się, że nie przyjęli żadnych antykoagulantów, w tym m.in. kwasu acetylosalicylowego, przez co najmniej 14 dni przed pobraniem. Analiza uzyskanych wyników wykazała, że trombogenność warstw NT 1G i 3G nie różniła się od siebie a badane biomateriały silnie, czyli niekorzystnie, wpływały na aktywację czynników krzepnięcia. Biomateriały te zostały zaszeregowane odpowiednio do 4 i 5 klasy ([D10] tab. 1). Klasa 5 zawiera próbki kontroli dodatkowo, tak więc warstwy NT 3G aktywują układ krzepnięcia w takim samym stopniu jak silnie trombogenny kolagen. Własności atrombogeniczne warstwy NT 1G są tylko nieznacznie lepsze niż warstwy NT 3G. Wyniki uzyskane dla warstwy NT 2G i stopu TNZ nie różnią

się od siebie, jednak wykazują znacznie lepsze właściwości atrombogenne niż w przypadku warstwy NT 1G i 3G. Warstwa NT 2G i stop TNZ zostały zaszeregowane odpowiednio do klasy 1 i 3. Klasa 1 zawiera biomateriały nieznacznie gorsze od kontroli ujemnej ([D10] [tab. 1](#)). Wykazano, że warstwa NT 2G ma niewielki wpływ na układ krzepnięcia.

Obecnie nanotubularne struktury tlenkowe proponowane są jako perspektywiczne nośniki leków w systemach kontrolowanego uwalniania leków, stąd też w ramach niniejszej dysertacji podjęto badania dotyczące kinetyki uwalniania ibuprofenu z matrycy Hep-DOPA dla warstw NT 1G, 2G i 3G ([D10] [rys. 10](#)). Analiza porównawcza profilu uwalniania ibuprofenu dla warstw NT 1G, 2G i 3G wykazała szybki wzrost uwalnianego ibuprofenu w pierwszych 10 minutach dla warstwy NT 1G. Ciągły wzrost uwalnianego leku obserwowano do 30 minut. Po upływie 60 minut zawartość leku spadła do zera. W przypadku warstwy 2G i 3G ibuprofen w pierwszych 10 minutach uwalniał się na poziomie od 16,25% dla warstwy NT 2G i 10,96% dla warstwy NT 3G. W czasie od 20 do 30 minut następował wzrost uwolnionego leku do około 35 i 36%. Od 40 minut następowało zmniejszenie uwalniania leku wynosząc przy 60 minutach poniżej 10%. Wysoka dawka ibuprofenu uwolnionego z nanorurek tlenkowych 1G w pierwszych minutach świadczy o możliwości szybkiego działania przeciwzapalnego i przeciwbólowego poprzez uwolnienie substancji z nanotubularnej warstwy, co jest niezbędne w celu uśmierzenia bólu w tkankach okołoinplantacyjnych oraz zmniejszenia stanu zapalnego z pominięciem stosowania doustnej terapii przeciwbólowej [46,47]. Ibuprofen z otrzymanych nanorurek uwalniany jest poprzez tzw. "*burst effect*", czyli szybkie uwalnianie leku w ciągu pierwszych 15 minut [48]. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowany został mechanizm kinetyki uwalniania leku na przykładzie ibuprofenu z otrzymanych struktur nanorurkowych na stopie TNZ. Uwalnianie leku oparto o dwustopniowy model Gallaghery-Corrigana, który zakłada dwustopniową kinetykę uwalniania leku. Zgodnie z zaproponowanym modelem, pierwszą fazą uwalniania leku jest jego uwolnienie z polimerowej matrycy. Drugą fazę stanowi powolne uwalnianie determinowane przez degradację matrycy. Szybkość procesu uwalniania leku w tego typu systemach kontrolowanego uwalniania leków jest wysoka w początkowym okresie, a następnie maleje [48].

**Głównym osiągnięciem naukowym w pracy [D10] było wykazanie wpływu anodowania biomedycznego stopu TNZ w proponowanych warunkach elektrochemicznych na wzrost chropowatości powierzchni oraz**

---

poprawę właściwości elektronowych, zwilżalności powierzchni oraz właściwości biologicznych. Wykazano, że proponowana elektrochemiczna modyfikacja powierzchni stopu TNZ na drodze anodowania zapewnia jego wyjątkową zgodność z krwią. Nowością było przeprowadzenie unikatowych badań trombogenności badanych materiałów, które mogą stanowić ważny aspekt w ich zastosowaniu jako matryce przeciwzakrzepowe. Wykazano, że otrzymane warstwy NT 1G, 2G i 3G mogą stanowić potencjalny nośnik leków w systemach kontrolowanego uwalniania leków.



Wykonane badania stanowiące podstawę realizowanej pracy doktorskiej, udowodniły postawioną tezę, że istnieje możliwość poprawy biofunkcjonalności stopu TNZ poprzez wytworzenie na jego powierzchni warstw nanorurek tlenkowych za pomocą anodowania. Opracowany został nowatorski sposób wytwarzania warstw nanorurek tlenkowych 1G, 2G oraz 3G na biomedycznym stopie TNZ, wykazujących optymalne parametry morfologiczne: **NT 1G** (0,5% HF) - średnia średnica zewnętrzna 87(10) nm, średnia średnica wewnętrzna 71(7) nm, długość 0,94(9) nm; **NT 2G** (2% NH<sub>4</sub>F) - średnia średnica zewnętrzna 103(10) nm, średnia średnica wewnętrzna 61(6) nm, długość 3,9(5) μm; **NT 3G** (4% NH<sub>4</sub>F) - średnia średnica zewnętrzna 342(34) nm, średnia średnica wewnętrzna 169(17) nm, długość 9,7(9) μm. Wyznaczone zostały równania liniowe opisujące zmianę średniej średnicy zewnętrznej oraz średniej średnicy wewnętrznej NT 3G w funkcji napięcia anodowania w zakresie 15-35 V, które mogą służyć do wytwarzania warstw NT 3G o założonych parametrach morfologicznych. Udowodniono wpływ zwiększenia stężenia jonów fluorkowych w elektrolicie na wzrost parametrów morfologicznych warstw NT 2G. Opracowany sposób elektrochemicznej modyfikacji powierzchni stopu TNZ zapewnia zwiększenie powierzchni właściwej oraz kształtowania struktury warstw NT 2G.

Wykazano wpływ warunków anodowania na poprawę właściwości mikromechanicznych, elektronowych i bioelektrochemicznych oraz wzrost chropowatości powierzchni stopu TNZ. Wykazana została wysoka odporność korozyjna *in vitro* oraz niska podatność na korozję wżerową w warunkach symulowanych płynów ustrojowych dla stopu TNZ oraz wytworzonych trzech generacji warstw nanorurek tlenkowych. Określony został mechanizm korozji wżerowej oparty o budowę warstw tlenkowych. Wykazano wpływ parametrów morfologicznych otrzymanych warstw NT 1G, 2G i 3G na zmniejszenie odporności na zużycie ściernie stopu TNZ w kolejności: 1G → 2G → 3G NT oraz został zaproponowany mechanizm zużycia biotribologicznego w roztworze Ringera'. Anodowanie poprawiło właściwości hydrofilowe stopu TNZ. Udowodniono, że powierzchnie warstw NT 1G, 2G i 3G o zwiększonej hydrofilowości wykazują większą aktywność biologiczną w kontakcie z płynami ustrojowymi, a tym samym zapewniają lepszą osteointegrację. Przeprowadzone badania biologiczne wykazały hemokompatybilność oraz brak cytotoksyczności w hodowli komórkowej przy użyciu fibroblastów mysich dla stopu TNZ oraz warstw NT 1G, 2G i 3G. Wykazano wpływ rosnącej długości oraz średnic NT na

---

zmniejszenie adhezji komórek do podłoża w kolejności: 1G → 2G → 3G. Nowatorskie badania trombogenności uzyskanych warstw pozwoliły określić warstwy NT 2G jako materiały atrombogeniczne, klasyfikując je do 1 klasy materiałów przeciwzakrzepowych. Zbliżone właściwości trombogeniczne warstw NT 1G i 3G, które silnie wpływają na aktywację czynników krzepnięcia, zaklasyfikowały je do klasy 4 i 5. Ponadto badania kinetyki uwalniania ibuprofenu wykazały możliwość zastosowania warstw NT 1G, 2G i 3G jako uniwersalne nośniki leków w systemach kontrolowanego uwalniania leków.

Przedstawione wyniki badań wnoszą nowy wkład w rozwój implantów osteointegracyjnych o zwiększonej biofunkcjonalności do zastosowań w medycynie regeneracyjnej i spersonalizowanej.

## 5. Literatura:

1. Mishra A. New surface-hardened, low-modulus, corrosion-resistant Ti-13Nb-13Zr alloy for total HIP arthroplasty. *Biomed. Mater. Eng.*, 1994, 4, 231–243. DOI: 10.3233/BME-1994-4310.
2. Bing L, Xiao-ming S, Gui-yong XYL. In-situ preparation of scholzite conversion coatings on titanium and Ti-6Al-4V for biomedical applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.*, 2017 153, 291–299. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.03.007.
3. Zhang L, Chen L. A review on biomedical titanium alloys: recent progress and prospect. *Adv. Eng. Mater.*, 2019, 21,1–29. DOI: 10.1002/adem.201801215.
4. Dąbrowski R. The microstructure and properties of Ti13Nb13Zr alloy for biomedical applications, *Mechanika w medycynie*, Rzeszów, 2014, pp. 53–62.
5. Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement — a materials science perspective. *Biomaterials.*, 1998, 19, 1621–1639. DOI:10.1016/S0142-9612(97)00146-4.
6. Zwilling V, Aucouturier M, Darque-Ceretti E. Structure and physicochemistry of anodic oxide films on titanium and TA6V alloy. *Surf. Interface Anal.*, 1999, 27, 629–637. DOI: 10.1016/S0013-4686(99)00283-2.
7. Mor GK, Carvalho MA, Varghese OK, Pishko MV, Grimes CA. A room temperature TiO<sub>2</sub> nanotube hydrogen sensor able to self-clean photoactively from environmental contamination. *J Mater Res.*, 2004, 19, 628–634. DOI: 10.1557/jmr.2004.19.2.628.
8. Oh S, Daraio C, Chen L-H, Pisanic TR, Finones RR, Jin S. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes. *J Biomed Mater Res.*, 2015, 33, 97–103. DOI:10.1002/jbm.a.
9. Wang N, Li H, Lü W. Effects of TiO<sub>2</sub> nanotubes with different diameters on gene expression and osseointegration of implants in minipigs. *Biomaterials.*, 2011, 32(29), 6900–6911. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.06.023.
10. Ghann W, Kang H, Sheikh T, Yadav S, Chavez-gil T, Nesbitt F. Fabrication, optimization and characterization of natural dye sensitized solar cell. *Nat. Publ. Gr.*, 2017, 1–12. DOI:10.1038/srep41470.
11. Szklarska M, Dercz G, Simka W, Łosiewicz B. A.c. impedance study on the interfacial properties of passivated Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution. *Surf. Interface Anal.*, 2014,46, 698–701. DOI: 10.1002/sia.5383.
12. Freitag M, Łosiewicz B, Goryczka T, Lelaćko J. Application of EIS to study the corrosion resistance of passivated NiTi shape memory alloy in simulated body fluid. *Solid State Phenom.*, 2011, 183, 57–64. DOI: 10.4028/www.scientific.net/SSP.183.57.

13. Łosiewicz B, Osak P, Maszybrocka J, Kubisztal J, Stach S. Effect of autoclaving time on corrosion resistance of sandblasted Ti G4 in artificial saliva. *Materials.*, 2020, 13, 4154. DOI:10.3390/ma13184154.
14. Lasia A. Electrochemical impedance spectroscopy and its applications. Springer 2002. DOI:10.1007/0-306-46916-2\_2.
15. Macak JM, Tsuchiya H, Ghicov A, Yasuda K, Hahn R, Bauer S, Schmuki P. TiO<sub>2</sub> nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 2007, 11(1–2), 3–18. DOI:10.1016/j.cossms.2007.08.004.
16. Sobieszczyk S. Self-organized nanotubular oxide layers on Ti and Ti Alloys. *Adv. Mater. Sci.*, 2009, 9(2), 14–17. DOI: 10.2478/v10077-009-0008-y.
17. Mary SJ, Rajendran S. Corrosion behaviour of metals in artificial blood plasma in presence of glucose. *Zaštita materijala.*, 2012, 53 broj 2, 109–113. DOI: 10.5937/ZasMat1403244M.
18. Ferraris S, Cazzola M, Peretti V, Stella B, Spriano S. Zeta potential measurements on solid surfaces for in vitro biomaterials testing: surface charge, reactivity upon contact with fluids and protein absorption., 2018, 6, 1–7. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00060.
19. Gepreel MA, Niinomi M. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2013, 20, 407–415. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2012.11.014.
20. Chen Q, Thouas GA. Metallic implant biomaterials. *Mat. Sci. Eng. R.*, 2015, 87, 1–57. DOI: 10.1016/j.mser.2014.10.001.
21. Wu S, Wang S, Liu W, Yu X, Wang G, Chang Z. Microstructure and properties of TiO<sub>2</sub> nanotube coatings on bone plate surface fabrication by anodic oxidation. *Surf. Coat. Technol.*, 2019, 374, 362–373. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2019.06.019.
22. Eliaz N. Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review. *Materials.*, 2019, 12, 407. DOI: 10.3390/ma12030407.
23. Lin H, Yin C, Mo A. Zirconia based dental biomaterials: structure, mechanical properties, biocompatibility, surface modification and applications as implant. *Front. Dent. Med.*, 2021, 2, 1–7. DOI: 10.3389/fdmed.2021.689198.
24. Rajan ST, Das M, Arockiarajan A. Biointerfaces biocompatibility and corrosion evaluation of niobium oxide coated AZ31B alloy for biodegradable implants. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.*, 2022, 212, 112342. DOI:10.1016/j.colsurfb.2022.112342.
25. Szklarska M, Dercz G, Rak J, Simka W, Łosiewicz B. The influence of passivation type on corrosion resistance of Ti15Mo alloy in simulated body fluids. *Arch. Metall. Mater.*, 2015, 60(4), 2688-2693. DOI: 10.1515/amm-2015-0433.

26. Escobal I. Corrosion and tribocorrosion characterisation of Ti13Nb13Zr alloy in oral environment for dental implants. 2015.
27. Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC. Biology of implant osseointegration. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, 2009, 20099(2), 61–71. DOI: 10.1016/j.joms.2007.05.013.
28. Sarraf M, Zalnezhad E, Bushroa AR, Hamouda AMS, Rafieerad BN-T. Effect of microstructural evolution on wettability and tribological behavior of TiO<sub>2</sub> nanotubular arrays coated on Ti–6Al–4V. *Ceram. Int.*, 2015, 41, 7952–7962. DOI: 10.1016/j.ceramint.2015.02.136.
29. Luz AR, Souza GB De, Lepienski CM, Kuromoto NK, Siqueira CJM. Tribological properties of nanotubes grown on Ti-35Nb alloy by anodization. *Thin Solid Films.*, 2018, 660, 529–537. DOI:10.1016/j.tsf.2018.06.050.
30. Piotrowska K, Madej M, Ozimina D. Assessment of tribological properties of Ti13Nb13Zr titanium alloy used in medicine. *Tribologia*, 2019, 285(3), 97-106. DOI:10.5604/01.3001.0013.5440.
31. Osak P, Maszybrocka J, Kubisztal J, Łosiewicz B. Biotribology effect of amorphous calcium phosphate coatings on tribological properties of titanium grade 4 in protein-free artificial saliva. *Biotribology*. 2022, 32, 100219. DOI:10.1016/j.biotri.2022.100219.
32. Osak P, Maszybrocka J, Zubko M, Rak J, Bogunia S, Łosiewicz B. Influence of sandblasting process on tribological properties of titanium grade 4 in artificial saliva for dentistry applications. *Materials*. 2021, 14, 1–19. DOI:10.3390/ma14247536.
33. Suzuki K, Aoki K, Ohya K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. *Bone.*, 1997, 21(6), 507–514. DOI:10.1016/s8756-3282(97)00204-4
34. Schmidt C, Kaspar D, Sarkar MR, Claes LE, Ignatius AA. A scanning electron microscopy study of human osteoblast morphology on five orthopedic metals. *Hum. Osteoblast Morphol.*, 2001, 252–261. DOI:10.1002/jbm.10185.
35. Kubisztal J, Łosiewicz B, Dybał P, Kozik V, Bąk A. Water-induced corrosion damage of carbon steel in sulfolane. *Energies.*, 2020, 13, 1–14. DOI: 10.3390/en13174580.
36. Łosiewicz B, Osak P, Maszybrocka J, Kubisztal J, Bogunia S, Ratajczak P, Aniołek K. Effect of temperature on electrochemically assisted deposition and bioactivity of CaP coatings on CpTi Grade 4. *Materials.*, 2021, 14, 5081. DOI: 10.3390/ma14175081.
37. Kubisztal J, Dybał P, Kozik V. Temperature-related corrosion resistance of AISI 1010 carbon steel in sulfolane. *Materials.*, 2020, 13, 2563. DOI:10.3390/ma13112563.
38. Grigorescu S, Ungureanu C, Kirchgeorg R, Schmuki P, Demetrescu I. Various sized nanotubes on TiZr for antibacterial surfaces. *Appl. Surf. Sci.*, 2013, 270, 190–196. DOI:10.1016/j.apsusc.2012.12.165.

39. Grigorescu S, Pruna V, Titorencu I. The two step nanotube formation on TiZr as scaffolds for cell growth. *Bioelectrochemistry*. 2014, 98, 39–45. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2014.03.002.
40. Shin DH, Shokuhfar T, Choi CK, Lee SH. Wettability Changes of TiO<sub>2</sub> Nanotube Surfaces. *Nanotechnology*., 2011, 22, 315704(7pp). DOI:10.1088/0957-4484/22/31/315704.
41. Kulkarni M, Patil-Sen Y, Junkar I, Kulkarni C V., Lorenzetti M, Iglıc A. Wettability studies of topologically distinct titanium surfaces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*., 2015, 129, 47–53. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.03.024 0927-7765.
42. Brammer KS, Oh S, Cobb CJ, Bjursten LM, Heyde H Van Der, Jin S. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO<sub>2</sub> nanotube surface. *Acta Biomater.*, 2009, 5(8), 3215–3223. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.05.008.
43. Citeau A, Guicheux J, Vinatier C. In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials*., 2005, 26, 157–165. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.033.
44. Aninwene GEI, Yao C, Webster TJ. Enhanced osteoblast adhesion to drug-coated anodized nanotubular titanium surfaces. *Int. J. Nanomedicine*., 2008, 3(2), 257–264. DOI: 10.2147/ijn.s2552.
45. Oh S, Daraio C, Chen L, Pisanic TR, Fin RR, Jin S. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes. *J. Biomed. Mater. Res. A*., 2006, 78A, 97-103. DOI: 10.1002/jbm.a.30722.
46. Bauer S, Pittrof A, Tsuchiya H, Schmuki P. Electrochemistry communications size-effects in TiO<sub>2</sub> nanotubes: diameter dependent anatase / rutile stabilization. *Electrochem. commun.*, 2011, 13(6), 538–541. DOI:10.1016/j.elecom.2011.03.003.
47. Bushra R, Aslam N. An overview of clinical pharmacology of ibuprofen. *Oman Med. J.*, 2010, 25(3), 155–161. DOI: 10.5001/omj.2010.49.
48. Al-janabi AAHS. In Vitro antibacterial activity of ibuprofen and acetaminophen. *J. Glob. Infect. Dis.*, 2010, 2(2), 105–108. DOI: 10.4103/0974-777X.62880.
49. Jarosz M, Pawlik A, Szuwarzy M, Jaskuła M, Sulka GD. Nanoporous anodic titanium dioxide layers as potential drug delivery systems: Drug release kinetics and mechanism. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*., 2016, 143, 447–454. DOI:10.1016/j.colsurfb.2016.03.073.

---

#### *IV. Wykaz osiągnięć naukowych*

Dane bibliograficzne cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe  
w rozprawie doktorskiej:

Całkowita liczba publikacji: **10**

Publikacje opublikowane: **9**

Publikacje w trakcie procesu publikacyjnego: **1**

Suma punktów MEiN( 9 publ.) : **645**

Sumaryczny IF wg listy JCR, zgodnie z rokiem opublikowania (9 publ.): **19,461**

Indeks Hirsch'a **8**

Całkowity wykaz publikacji

1. Łosiewicz B, **Stróż A**, Kubisztal J, Osak P, Zubko M. EIS and LEIS study on in vitro corrosion resistance of anodic oxide nanotubes on Ti- 13Zr-13Nb alloy in saline solution. *Coatings*, 13, 5, 2023, 1-18, DOI: 10.3390/coatings13050875.
2. **Stróż A**, Luxbacher T, Dudek K, Chmiela B, Osak P, Łosiewicz B: In vitro bioelectrochemical properties of second-generation oxide nanotubes on Ti-13Zr-13Nb biomedical alloy, *Materials*. 16, 4, 2023, 1-15, DOI:10.3390/ma16041408.
3. **Stróż A**, Maszybrocka J, Goryczka T, Dudek K, Osak P, Łosiewicz B. Influence of anodizing conditions on biotribological and micromechanical properties of Ti-13Zr-13Nb alloy. *Materials*, 16, 3, 2023, 1-17, DOI:10.3390/ma16031237.
4. Łosiewicz B, Skwarek S, **Stróż A**, Osak P, Dudek K, Kubisztal J, Maszybrocka J: Production and characterization of the third-generation oxide nanotubes on Ti-13Zr-13Nb alloy, *Materials*. 15, 6, 2022, 1-20, DOI:10.3390/ma15062321.
5. Aniołek K, Łosiewicz B, Kubisztal J, Osak P, **Stróż A**, Barylski A, Kaptacz S. Mechanical properties, corrosion resistance and bioactivity of oxide layers formed by isothermal oxidation of Ti-6Al-7Nb alloy. *Coatings*. 5, 2021, 505, 1-24, DOI:10.3390/coatings11050505.
6. Łosiewicz B, **Stróż A**, Osak P, Maszybrocka J, Gerle A, Dudek K, Balin K, Łukowiec D, Gawlikowski M, Bogunia S. Production, characterization and application of oxide nanotubes on Ti-6Al-7Nb alloy as a potential drug carrier, *Materials*. 14, 20, 2021, 1-24. DOI:10.3390/ma14206142.
7. **Stróż A**, Dercz G, Chmiela B, Łosiewicz B. Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy with potential use as bone implant American Institute of Physics. 2019, ISBN 978-0-7354-1813-4, 1-5, DOI:10.1063/1.5094314.



8. **Stróż A**, Goryczka T, Łosiewicz B. Electrochemical formation of self-organized nanotubular oxide layers on niobium. *Curr. Nanosci.*, 2018, 14, 1-7. DOI:10.2174/1573413714666180115141012.
9. **Stróż A**, Łosiewicz B, Zubko M, Chmiela B, Balin K, Dercz G, Gawlikowski M, Goryczka T. Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications. *Mater. Character.*, 2017, 132, 363-372. DOI: 10.1016/j.matchar.2017.09.004.
10. **Stróż A**, Dercz G, Stróż D, Łosiewicz B. Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for biomedical applications. *Acta. Phys. Pol. A.*, 2016, 130, 4, 1079-1080. DOI:10.12693/APhysPolA.130.1079.
11. Popczyk M, Szklarska M, **Smółka A**, Osak P, Budniok A. Use of scanning vibrating electrode technique to localized corrosion evaluation", B. Łosiewicz, *Sol. St. Phen. – Electrochemicals for Hydrogen Energy.* 2015, 228, 353-368. DOI: 10.4028/www.scientific.net/SSP.228.353.
12. Popczyk M, Szklarska M, **Smółka A**, Osak P, Budniok A, B. Łosiewicz. Application of scanning Kelvin probe technique for characterization of corrosion interfaces., *Sol. St. Phen. – Electrochemicals for Hydrogen Energy.*, 2015, 228, 369-382. DOI: 10.4028/www.scientific.net/SSP.228.369.
13. Łosiewicz B, Popczyk M, Smółka A, Szklarska M, Osak P. Localized electrochemical impedance spectroscopy for studying corrosion processes in a nanoscale *Sol. St. Phen. – Electrochemicals for Hydrogen Energy.*, 2015, 228, 383-393. DOI: 10.4028/www.scientific.net/SSP.228.383.
14. Łosiewicz B, Popczyk M, **Smółka A**, Szklarska M, Osak P. On the Use of the scanning electrochemical microscopy in corrosion research. *Sol. St. Phen. – Electrochemicals for Hydrogen Energy.*, 2015, 228, 394-409. DOI:10.4028/www.scientific.net/SSP.228.394.
15. Szklarska M, **Smółka A**, Popczyk M, Łosiewicz B. Characteristics of the galvanic baths for electrodeposition of nickel coatings using the Hull cell. *Sol. St. Phen – Electrochemicals for Hydrogen Energy.*, 2015, 228, 79-88. DOI: 10.4028/www.scientific.net/SSP.228.79.
16. Łosiewicz B, Dercz G, Popczyk M, Szklarska M, A. **Smółka A**. Effect of Phosphorus on the Structure of Nickel Electrocoatings", *Sol. St. Phen – Electrochemicals for Hydrogen Energy.*, 2015, 228, 141-147 DOI:10.4028/www.scientific.net/SSP.228.141.
17. Szklarska M, Dercz G, **Smółka A**, Popczyk M, Łosiewicz B. A coulometric method by local anodic dissolution for measuring the thickness of Ni/Cu multi-layer electrocoatings", *Sol. St. Phen – Electrochemicals for Hydrogen Energy.*, 2015, 228, 319-324, DOI: 10.4028/www.scientific.net/SSP.228.319.
18. **Smółka A**, Dercz G, Rodak K. Łosiewicz B. Evaluation of corrosion resistance of nanotubular oxide layers on the Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution. *Arch. Metall. Mater.*, 2015, 60, 2681-2686 DOI: 10.1515/amm-2015-0432.

19. **Smółka A**, Rodak K, Dercz G, Dudek K, B. Łosiewicz. Electrochemical Formation of self-organized nanotubular oxide layers on Ti<sub>13</sub>Zr<sub>13</sub>Nb alloy for biomedical applications. *Acta. Phys. Pol. A.*, 2014, 125, 4 DOI:10.12693/APhysPolA.125.932.
20. Stróż D, Palka J, Lekston Z, **Smółka A**. Structure and properties of Ni-rich shape memory alloy subjected to severe deformation and annealing. *Sol. St. Phen.*, 2013 Vols. 203-204, 339-342. DOI: 10.4028/www.scientific.net/SSP.203-204.339.
21. Popczyk M, Łosiewicz B, Dercz G, **Smółka A**. Influence of thermal treatment on the structure and corrosion resistance of Zn-Ni alloy coatings. *Sol. St. Phen.*, 2013 Vols.203-204, 224-227. DOI: 10.4028/www.scientific.net/SSP.203-204.224.
22. Łosiewicz B, Popczyk M, Goryczka T, Lelątko J, **Smółka A**, Kowalski P. Structure and resistance to electrochemical corrosion of NiTi alloy. *Sol. St. Phen.*, 2013 Vols. 203-204, 335-338. DOI: 10.4028/www.scientific.net/SSP.203-204.335.

Prezentacje ustne na konferencjach krajowych i zagranicznych

1. ICNMS 2019 - 7th International Conference on Nano and Materials Science, 4-7 stycznia, 2019r, San Francisco, USA "Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr alloy with potential use as bone implant"
2. Szkoła Inżynierii Materiałowej - SIM 2016, 27-30 wrzesień 2016, Ryto "Charakterystyka nanorurek tlenkowych trzeciej generacji otrzymanych metodą utleniania anodowego na biomedycznym stopie Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr"
3. 25th Conferences on Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine, 13 - 16. 10.2016 Ryto - Rapid Fire Presentation "Bioelectrochemical properties of Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr alloy before and after surface modification"
4. XXI Physical Metallurgy and Materials Science Conference - Advanced Materials and Technologies AMT, Rawa Mazowiecka 5-8 wrzesień 2016 "Synthesis and characterization of TiO<sub>2</sub> nanotubes on biomedical Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr alloy"
5. XLI Szkoła Inżynierii Materiałowej, Krynica, 24-27 październik 2013 „Ocena odporności korozyjnej nanotubularnych struktur tlenkowych na stopie Ti<sub>13</sub>Zr<sub>13</sub>Nb w środowisku płynów ustrojowych„

*Prezentacje posterowe na konferencjach krajowych i zagranicznych*

1. The XXII Conference of Applied Crystallography (CAC 2018), 02-06 wrzesień 2018, Arłamów, Polska "Effect of modification of oxide nanotubes with silver on structure and properties on Ti13Nb13Zr biomedical alloy"
2. The European Materials Research Society (E-MRS), 19-22 wrzesień 2016, Warszawa "Surface oxidation states of nanotubes formed anodically on Ti13Nb13Zr biomedical alloy"
3. 25th Conferences on Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine, 13 - 16. 10.2016 Ryto "Bioelectrochemical properties of Ti13Nb13Zr alloy before and after surface modification"
4. The XXIII Conference on Applied Crystallography, Krynica- Zdrój, 20-24 wrzesień 2015 "Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for biomedical applications"
5. 57. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego „Chemia – Nadzieja i Marzenia,, Częstochowa, 15-18 wrzesień 2014 „Badania impedancyjne elektrochemicznego zachowania modyfikowanych powierzchniowo biomateriałów tytanowych w środowisku biologicznym”
6. VIII International Warsaw Invention Show IWIS'2014, IWIS'2014, 14-16 październik 2014 "Design a new electrochemical method of forming nanotubular oxide layers of titanium alloys for medical applications”
7. The XLVIII Zakopane School of Physics, Zakopane 20-25 Maj 2013 „Electrochemical formation of self-organized nanotubular oxide layers on Ti13Zr13Nb alloy for biomedical”
8. 15th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis ECASIA 13, Sardynia, 13-18 październik 2013 "Electrochemical formation of nanotubular oxide layers on niobium”
9. The XXII Conference of Applied Crystallography (CAC 2012), Targanice, Poland 02-06 wrzesień 2012 „Structure and resistance to electrochemical corrosion of NiTi alloy”

## Nagrody

- Laureatka drugiej nagrody za najlepszą prezentację ustną nt. "Synthesis and characterization of TiO<sub>2</sub> nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy" na konferencji Advanced Materials and Technologies AMT 2016, która odbyła się w dniach 6-8 czerwca br. w Rawie Mazowieckiej.
- Laureatka złotego medalu na VIII International Warsaw Invention Show - IWIS 2014 za badania: "Development of new electrochemical method of forming nanotubular oxide layers on titanium alloys for medical applications" przyznany przez Kapitułę 8 Międzynarodowej Warszawskiej Wystawy Wynalazków IWIS'2014 w skład której wchodził: Stowarzyszenie Polskich Wynalazców i Racjonalizatorów, Urząd Patentowy RP oraz Politechnika Warszawska. Konferencja była objęta Honorowym Patronatem Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej Bronisława Komorowskiego.
- Laureatka Nagrody Specjalnej Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz złoty medal za wynalazek "Electrochemical production manner and properties of nanoporous gold"

---

*V. Publikacje naukowe stanowiące podstawę rozprawy  
doktorskiej*

RESEARCH ARTICLE | MARCH 21 2019

# Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy with potential use as bone implant

Agnieszka Stróż; Grzegorz Dercz; Bartosz Chmiela; Bożena Łosiewicz



AIP Conference Proceedings 2083, 030004 (2019)

<https://doi.org/10.1063/1.5094314>



View  
Online



Export  
Citation

CrossMark

**AIP Advances**

Why Publish With Us?

-  **25 DAYS**  
average time to 1st decision
-  **740+ DOWNLOADS**  
average per article
-  **INCLUSIVE**  
scope

[Learn More](#)

# Electrochemical Synthesis of Oxide Nanotubes on Biomedical Ti13Nb13Zr Alloy with Potential Use as Bone Implant

Agnieszka Stróż<sup>1,a)</sup> Grzegorz Dercz<sup>1</sup>, Bartosz Chmiela<sup>2</sup> and Bożena Łosiewicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Silesia, 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland

<sup>2</sup> Silesian University of Technology, Krasińskiego 8, 40-001 Katowice, Poland

<sup>a)</sup>agnieszka.stroz@us.edu.pl

**Abstract.** Human movement organs are exposed to numerous loads that may lead to discomforts, injuries, as a result, the necessity of replacing the traumatized or used joints with artificial implants improving health and comfort of life. Application of anodic oxidation as a method of surface modification of new titanium alloys based on biocompatible alloy components allows to obtain oxide nanotubes that will improve the osseointegration process at the border of the live tissue - implant. In this paper, the production technology of oxide nanotubes of the first generation on the Ti13Nb13Zr biomedical alloy using anodic oxidation in hydrofluoric acid electrolyte at 20 V for 120 min, is developed. Under proposed conditions single-walled oxide nanotubes were produced with an average outer diameter of 87 nm, inner diameter of 71 nm and about 1 $\mu$ m length. The physical and chemical properties of the anodized surface of the Ti13Nb13Zr alloy were characterized using grazing incidence X-ray diffraction, scanning electron microscopy with field emission and atomic force microscopy. The obtained results give a new insight into improvement of the ability of the Ti13Nb13Zr implant alloy for better osseointegration.

## INTRODUCTION

Disorders of the musculoskeletal system is a serious medical and economic problem. The World Health Organization (WHO) recognized the decade 2001 ÷ 2010 for the Decade of Bones and Joints. According to the WHO several hundred thousand people around the world suffer from these disorders. It is estimated that 90% of the population above aged 40 years suffer from degenerative diseases such as osteoarthritis and osteoporosis which can cause to bone fractures and immobilization, negatively affecting the quality of life [1].

Titanium based implants have been intensively investigated for bone repair since many years. Although titanium implants have the most desirable mechanical properties compared to other metallic implants, they still do not provide long-term use due to insufficient biocompatibility and lack of specific bioactivity [2].

Biomaterials made of titanium alloys are biocompatible in relative to the human body without creating a direct connection to the bone tissue in the early stages after implantation. Their surfaces play an important role in the response of artificial implants in the biological environment and it is necessary to modify the surface to improve the properties determined by clinical requirements. It leads to faster and more effective osseointegration, that is, the connection of an artificial implant with the surrounding tissue. The best way to ensure connection with bone tissue and to ensure the bioactivity of the titanium implant is to modify its surface. The consequence of striving to improve the contact between the surface of the titanium implant and the living tissue is the use of nanotechnology. Advances in the field of nanotechnology now allow precise nanoscale design of materials used for various applications in medicine. The nanoengineered surfaces have the unique ability of direct cellular interaction on the overall biological

response of the implanted material. Thanks to this unique property, various techniques based on nanotechnology have been developed to generate nanoscale surfaces on existing biocompatible titanium implants [3–5].

Anodization becoming a realistic approach for the fabrication of hierarchical single walled nanotubes (SWNTs) [6]. Dependently on the type and concentration of the electrolyte four generations (4G) of the oxide nanotubes can be produced. Our last articles focused on electrochemical formation of second (2G) and third (3G) generation SWNTs on the surface of the Ti13Nb13Zr biomedical alloy [7–9].

Oxides nanotube layers have many advantages that provide increase in the bioactivity of the implant surface. Basically, they increase the roughness of the surface in nanoscale, creating a structure similar to the naturally rough bone tissue. As demonstrated in numerous studies, bone-forming cells (osteoblasts) tend to adhere to the surface that is morphologically and chemically similar to natural bone [10].

The aim of this study was surface modification of the new developed titanium based alloy for biomedical applications. The present study was undertaken in order to obtain the first generation (1G) SWNTs on the Ti13Nb13Zr biomedical alloy using anodic oxidation under new electrochemical conditions. In available databases the number of articles based on surface modification of the Ti13Nb13Zr alloy where the main topic are oxide nanotubes is very low. This article shows the original research based on new electrochemical conditions for production of oxide nanotubes on this alloy which are not observed in literature.

## MATERIAL AND METHODS

### Material Preparation

The examined samples of the Ti13Nb13Zr (wt.%) alloy were cut in the form of disks from the rod of 0.9 mm in diameter. The samples were ground with 1200 and 2500# grit silicon carbide paper, polished using OP-S suspension, and then sonicated for 20 min using nanopure water (Milli-Q,  $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$ ,  $< 2 \text{ ppb}$  total organic carbon). Anodization was performed at room temperature in 0.5% hydrofluoric acid (48% HF, Sigma Aldrich). The optimal voltage and time of anodic oxidation were determined in the initial tests to be 20 V and 120 min, respectively. Process was carried out using a Kikusui PWR800H Regulated DC Power Supply in the two-electrode system consisting of the working electrode (WE) which was the sample under study and the counter electrode (CE) in the form of a platinum foil being spaced from the WE for a distance of 25 mm.

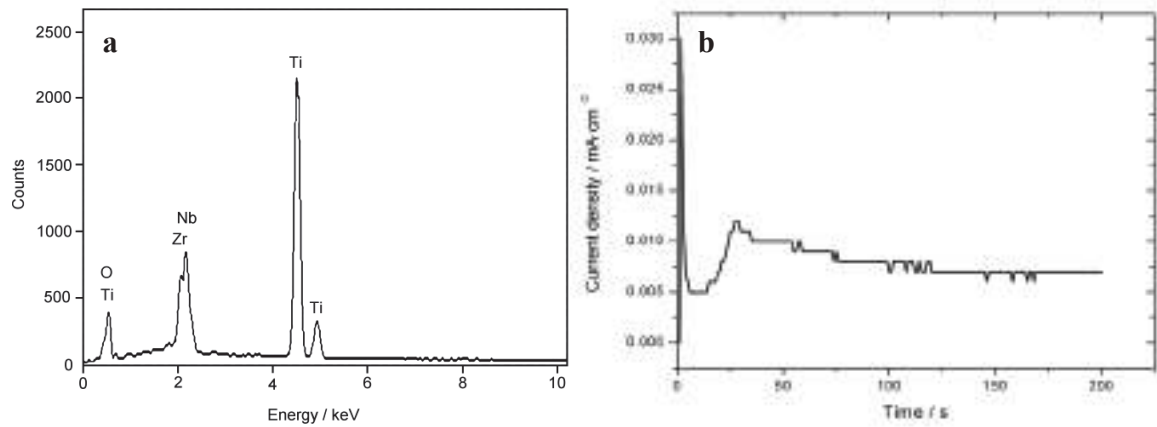
### Material Characterization

The surface morphology and cross-section observations of the Ti13Nb13Zr alloy with formed layers of SWNTs were investigated using a scanning electron microscopy with field emission (FE-SEM) using the HITACHI HD-2300A. The chemical composition after anodization was analyzed by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDXS) used in conjunction with FE-SEM. The X-ray structure of SWNTs was determined using the grazing incidence X-ray diffraction (GIXD) method on the X'Pert Philips PW 3040/60 diffractometer operating at 30 mA and 40 kV (Cu  $K\alpha$  radiation), which was equipped with a vertical goniometer and an Eulerian cradle. The GIXD diffraction patterns were registered in  $2\theta$  range from 20 to 90° and 0.05° step for the incident angle  $\alpha$  of 1.00°. The QScope™ 250 atomic force microscope (AFM) (Quesant Instrument Corporation, Agoura Hills, CA) with integrated into the Hysitron TI 950 TriboIndenter was used to study the topography and roughness of the tested surface.

## RESULTS AND DISCUSSION

The investigated alloy subjected to anodization belongs to the new generation of vanadium-free titanium alloys. It has been shown that elimination of toxic elements such as vanadium, aluminum and nickel from composition of titanium alloys and replacing them with non-toxic elements like zirconium and niobium decreases the risk of neurodegenerative disease. In addition, it provides higher biocompatibility and corrosion resistance [7,8,11]. EDXS spectrum (Figure 1a) showed the presence of peaks coming from the substrate - Ti, Nb and Zr. The presence of oxygen peak in the EDXS spectrum for the alloy anodized under proposed conditions showed that on the surface of the test material an oxide layer is present.

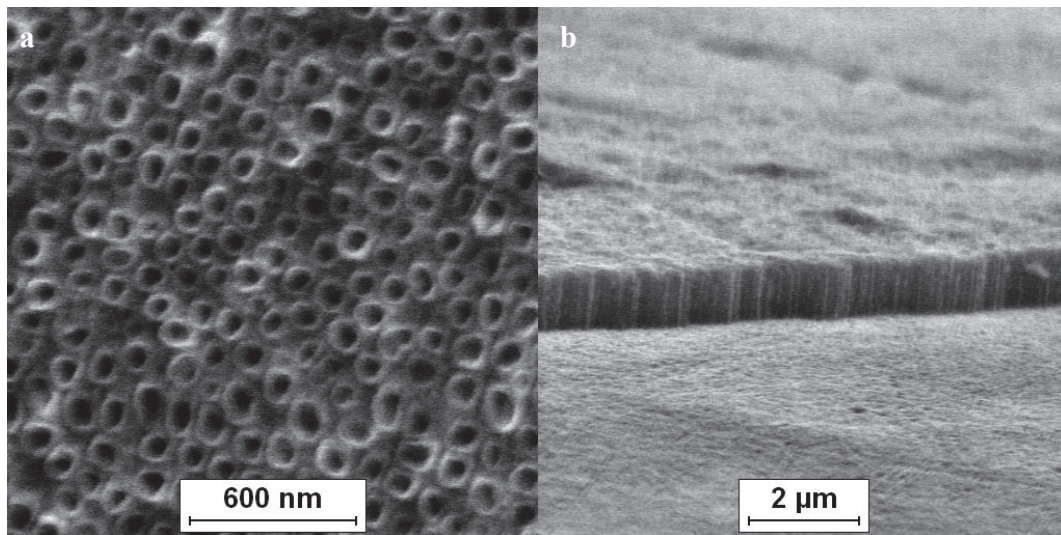




**FIGURE 1.** a) EDXS spectrum of the Ti13Nb13Zr alloy after anodization, and b) density current - time characteristic during the first 200 seconds of the anodization at 20 V for 120 min in 0.5% HF electrolyte.

In order to confirm the occurrence of the anodization process allowing the formation of oxide nanotubes, the course of the study was recorded as a graph (Figure 1b) of current density versus time. The results confirm the presence of an oxide barrier layer, which is the reason for the decrease in the current density in the first seconds of the process. Afterwards the current density increases as a result of the fluoride ion activity.

The precisely and vertically oriented oxide nanotubes fabricated under proposed conditions via anodization of the Ti13Nb13Zr alloy have been shown in Figure 2a. Cross-section of the SWNTs layer is shown in Figure 2b and the thickness of the oxide layer about 1  $\mu\text{m}$  can be observed. Under controlled conditions the SWNTs develop perpendicular to the metal substrate. The detailed mechanism of the multistep formation of 1G SWNTs is similar to that for 2G and 3G SWNTs on the Ti13Nb13Zr alloy reported in our previous works [7,8].

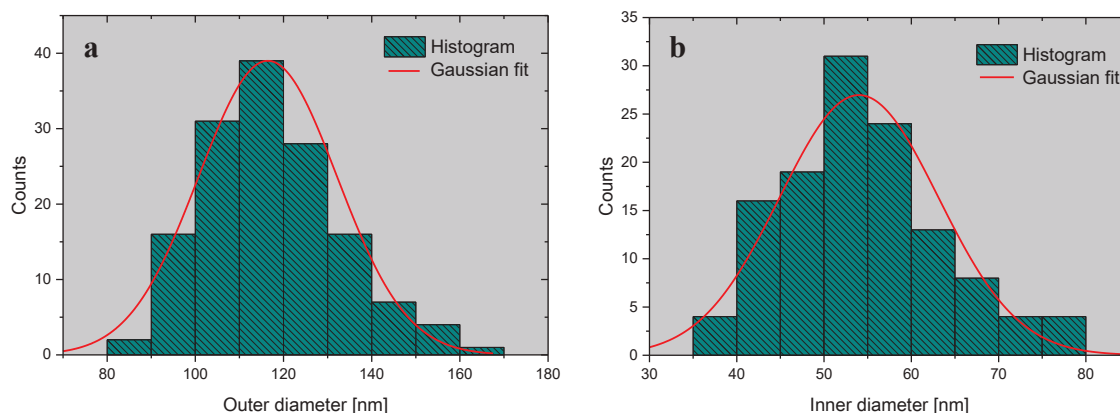


**FIGURE 2.** FE-SEM image of the microstructure of 1G SWNTs layer formed on the Ti13Nb13Zr alloy: a) top general view, and b) cross-section of the material.

Based on the FE-SEM images (Figure 2) recorded from the selected areas of the Ti13Nb13Zr alloy surface after anodic oxidation, the morphological parameters of the obtained nanotubes were determined. The SWNTs length ( $L$ ) was 0.94(9)  $\mu\text{m}$ . Empirical distribution histograms of the outer ( $D_0$ ) and inner ( $D_i$ ) diameter of the SWNTs is shown

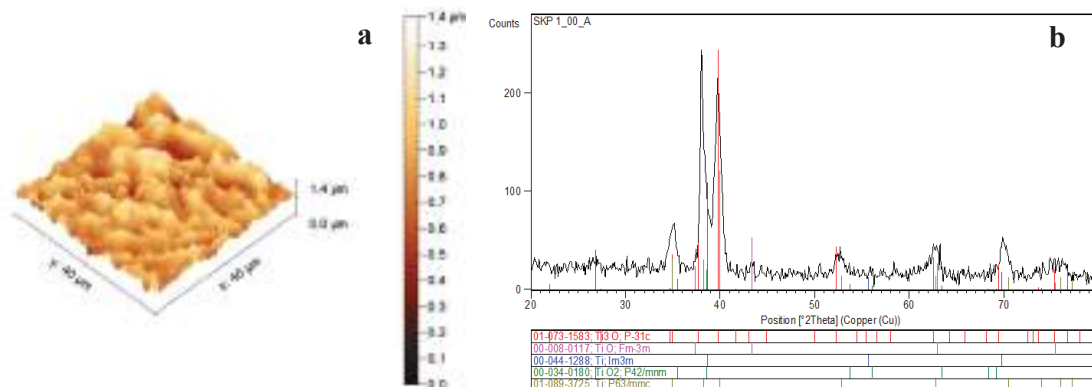
in Figure 3a and b, respectively. Average  $D_0$  and  $D_i$  of the SWNTs was estimated by Gaussian fit to the diameter histogram to be 87(10) nm and 71(7) nm, respectively.

Based on literature it can be concluded that the composition of the electrolyte for anodization strongly influences the microstructure of the obtained oxide nanotubes. Nanotubular oxide layers form when electrolytes contain fluoride ions. First generation of oxide nanotubes is based on aqueous electrolytes of hydrofluoric acid [12,13]. First report of using HF based electrolytes for formation of nanotubes on Ti and Ti6Al4V alloy appeared in 1999 [14]. Zwilling and co-workers in HF based electrolytes achieved self-organized oxide nanotubes on Ti and Ti6Al4V alloy via anodization where pore thickness were about 75 nm [14]. The lengths of nanotubes in first generation were maximum approximately 500 nm. Anodization of titanium foil in 0.5% HF at low voltage allowed to obtain nanotubes with pore size from 15 to 30 nm. Increasing the voltage up to 20 V, the nanotubes of inner diameter about 76 nm were produced [15].



**FIGURE 3.** Histogram of: a) outer and b) internal diameter distribution of the SWNTs on the surface of the Ti13Nb13Zr alloy and Gaussian fitting curve.

A typical AFM image of the surface of the Ti13Nb13Zr alloy after anodization in 3D view is presented in Figure 4a. After anodization of the Ti13Nb13Zr alloy in the appropriate conditions, the surface development has changed. The surface roughness significantly increased and  $R_a = 64.8$  nm. The obtained results point that anodization of the tested alloy caused the increase in surface roughness more than 15 times as compared to the Ti13Zr13Nb alloy before anodization which was the subject of research in our previous article [8].



**FIGURE 4.** a) The 3D AFM image, and b) X-ray pattern diffraction of the Ti13Nb13Zr alloy after anodization in 0.5% HF at 20 V for 120 min.

Hydrofluoric acid is relatively aggressive, consequently it etches and dissolves most of the growing oxide, preventing the formation of long nanotubes during the anodization process. It needs to be highlighted that in this study in proposed new conditions, two-fold increase in the length of the SWNTs on the Ti13Nb13Zr alloy can be obtained compared to research reported in literature [14]. The received morphological parameters of the SWNTs ensure good results for in vitro research for bone formation and gene expression associated with bone formation and remodeling during the osseointegration period [16,17].

Figure 4b presents the diffraction pattern of the Ti13Nb13Zr alloy after anodization in 0.5% HF at 20 V for 120 min. The phase analysis show the presence of phases from the substrate:  $\alpha$  - Ti (PDF ICDD 00-044-1288) and  $\beta$  - Ti (PDF ICDD 01-089-3725). The XRD analysis also revealed the presence of the diffraction lines coming from titanium oxides: TiO<sub>2</sub> (rutile), TiO<sub>3</sub> and TiO.

## CONCLUSION

The obtained results of EDXS, FE-SEM, AFM and GIXD confirmed the possibility of formation of the SWNTs on the surface of the biomedical Ti13Nb13Zr alloy by anodic oxidation in a solution of 0.5% HF at a voltage of 20 V for 120 min at room temperature. The obtained SWNTs of 1G consist to rutile, TiO and TiO<sub>3</sub>. The morphological parameters of the formed nanotubes were determined to be ~ 1  $\mu$ m in the length, 87 nm in outer and 71 nm in inner diameter. Increasing the surface roughness over 15 times compared to the alloy without nanotubes suggests that the proposed method of surface modification is promising for better osseointegration of the Ti13Zr13Nb implant alloy.

## REFERENCES

1. I. N. K. Awad, S. L Edwards, Y. S. Morsi, *Mater. Sci. Eng. C* **76**, 1401–1412 (2017).
2. M. T. Mohammed, Z. A. Khan, A. N. Siddiquee, *The Imperative Materials for Biomedical Applications Titanium and its Alloys*, (2012).
3. K. Lee, A. Mazare, P. Schmuki, *Chem. Rev.* **114** (19), 9385–9454 (2014).
4. P. Sensharma, G. Madhumathi, R. D. Jayant, A. K. Jaiswal, *Mater. Sci. Eng. C* **77**,1302–1315 (2017).
5. T. Albrektsson, P. Brånemark, H. Hansson, J. Lindström, *Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting , Direct Bone-to- Implant Anchorage in Man.* **6470** (2009).
6. M. Kulkarni, A. Mazare, E. Gongadze, *Nanotechnology.* **26**, 62002 (1-18) (2015).
7. A. Stróż, G. Dercz, B. Chmiela, D. Stróż, B. Łosiewicz, *Acta Phys. Pol. A.* **130**(4), 1079–1080 (2016).
8. A. Stróż, B. Łosiewicz, M. Zubko, B. Chmiela, K. Balin, G. Dercz, M. Gawlikowski, T. Goryczka, *Mater. Charact.* **132**, 363–372 (2017).
9. A. Smółka, G. Dercz, K. Rodak, B. Łosiewicz, *Arch. Metall. Mater.* **60**(4), 8–13 (2015).
10. M. Kulkarni, A. Mazare, E. Gongadze, Š. Perutkova, V. Kralj-igli, *Nanotechnology* **26** (2015) 062002 (18pp)
11. G. Dercz, I. Matuła, M. Zubko, J. Dercz, *Powder Diffr.* **32**(S1), S186–S192 (2017).
12. C. A. Grimes, G. K. Mor, *TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays*. Springer (2009)
13. L. Ainouche, L. Hamadou, A. Kadri, N. Benbrahim, D. Bradai, *Electrochim. Acta* **133**, 597–6
14. V. Zwillig, M. Aucouturier, E. Darque-Ceretti, *Surf. Interface Anal.* **27**, 629-637 (1999).
15. G. K. Mor, M. A. Carvalho, O. K. Varghese, M.V. Pishko, C. A. Grimes, *J Mater Res.* **19**, 628–634 (2004).
16. N. Wang, H. Li, W. Lü, *Biomaterials* **32**(29), 6900–6911 (2011)
17. C. D. Seunghan Oh, *J Biomed Mater Res.* **33**, 97–103 (2015).

Article

# EIS and LEIS Study on In Vitro Corrosion Resistance of Anodic Oxide Nanotubes on Ti–13Zr–13Nb Alloy in Saline Solution

Bożena Losiewicz <sup>1,4</sup>, Agnieszka Stróż <sup>1</sup>, Julian Kubisztal <sup>1</sup>, Patrycja Osak <sup>1</sup> and Maciej Zubko <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Materials Engineering, Faculty of Science and Technology, University of Silesia in Katowice, 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland

<sup>2</sup> Department of Physics, Faculty of Science, University of Hradec Králové, Rokitského 62, 500 03 Hradec Králové, Czech Republic

\* Correspondence: bozena.losiewicz@us.edu.pl; Tel.: +48-32-3497-527

**Abstract:** This work concerns the search for new ways to modify the surface of the biomedical Ti–13Zr–13Nb alloy for applications in regenerative medicine and personalized medicine. Obtained for the first time, oxide nanotubes (ONTs) layers of first-generation (1G) on a Ti–13Zr–13Nb alloy were produced by anodizing in 0.5% HF electrolyte at 20 V for 120 min. The physico-chemical characterization of the obtained bamboo-inspired 1G ONTs was conducted using TEM and ATR-FTIR methods. In vitro corrosion resistance of the 1G ONTs and comparative Ti–13Zr–13Nb substrate in saline solution at 37 °C was conducted by open-circuit potential, Tafel curves, anodic polarization curves, and EIS methods. LEIS and SVET study of local corrosion resistance was also carried out. It was found that surface modification by anodizing of the Ti–13Zr–13Nb alloy under proposed conditions allowed to obtain porous ONTs highly resistant to pitting corrosion. The obtained results give a new insight into the relationship between the morphological parameters of first-generation oxide nanotubes and in vitro corrosion resistance of the Ti–13Zr–13Nb alloy in saline solution at the macro- and microscale.

**Keywords:** anodizing; corrosion resistance; oxide nanotubes; Ti–13Zr–13Nb alloy



**Citation:** Losiewicz, B.; Stróż, A.; Kubisztal, J.; Osak, P.; Zubko, M. EIS and LEIS Study on In Vitro Corrosion Resistance of Anodic Oxide Nanotubes on Ti–13Zr–13Nb Alloy in Saline Solution. *Coatings* **2023**, *13*, 875. <https://doi.org/10.3390/coatings13050875>

Academic Editors: Mariana Braic and Alina Vladescu

Received: 28 February 2023

Revised: 11 April 2023

Accepted: 25 April 2023

Published: 6 May 2023



Copyright: © 2023 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 (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The human body is a very demanding environment for engineering materials due to the need to use implant materials that must be highly resistant to corrosion, especially pitting, in the environment of tissues and body fluids [1–7]. Titanium and its alloys are currently one of the most commonly used biomaterials in modern medicine. The self-passive oxide layer formed naturally in the air or the passive oxide layer obtained as a result of forced passivation on the surface of the titanium-based implants provides their protection against harmful environmental factors of the human body, thanks to which these biomaterials can be commonly used in implantology, e.g., for the production of short- and long-term implants, such as stents, orthodontic wires, dental implants, knee and hip endoprostheses, plates, bone screws, etc. [1,2]. Insufficient resistance of metallic biomaterials to corrosion may become a source of elements that have a toxic effect on tissues or cause carcinogenic reactions in the body [8].

Titanium alloys used in implantology contain toxic elements such as Al, V, and Ni, the release of which can lead to many diseases such as Alzheimer’s, metallosis, neuropathy, or a broadly understood allergic reaction [8]. To eliminate the harmful effects of toxic elements, new alloys based on biocompatible elements such as niobium, zirconium, molybdenum, and tantalum have been developed at the turn of the last few years, which act as stabilizers of the  $\beta$  structure in titanium [9–21]. Therefore, emphasis is placed on the production of new titanium-based alloys with mechanical properties similar to the Ni–Ti alloy and greater corrosion resistance, not containing harmful elements such as Ti–Nb–Zr, Ti–Mo–Zr, Ti–Nb–Ta, Ti–Mo, Ti–Zr, or Ti–Ta [1,2,9–21]. In addition, the surface of titanium

and titanium alloys is additionally modified by various methods, from mechanical, through plasma, to electrochemical, in order to increase their corrosion resistance and biocompatibility [1–6,9,10,12,22–26]. Electrochemical methods such as electrochemically assisted deposition (ECAD) [5,24], electrophoretic deposition (EPD) [6], or anodizing [7,9–12,14–18,25–33], the latest development of which is plasma electrolytic oxidation (PEO), have a great potential for development, as they enable a wide modification of the chemical composition, surface morphology, and are cheap and easy to implement for large-scale production.

One of the electrochemical methods most often used to modify the self-passive oxide layer on titanium and its alloys, which ensures the possibility of producing self-assembled oxide nanotubes (ONTs), is anodizing [7,9–12,14–18,25–33]. Oxidation of titanium in an electric field in an aqueous electrolyte occurs according to the commonly accepted Guntersulze–Betz model [34]. The process of electrochemical production of a matrix of ONTs on the titanium and its alloys can be divided into several steps, which depend on the current density. In the first and shortest step, a compact, barrier oxide layer is produced. The beginning of the second step is associated with the activation of the barrier oxide layer by fluoride ions, which, in dissolving the oxide layer, cause the formation of randomly distributed pores. The start of this step is associated with an increase in the current intensity, which is caused by reducing the thickness of the oxide layer at the bottom of the pores. This leads to further deepening of the pores, which, after some time, begin to branch, overlapping each other competing for the flow of current. Under optimal conditions, the current flows evenly between the pores leading to the self-assembly of the porous layer, which begins to take the shape of the ONTs matrix. This is the third step of the process, characterized by a relative stabilization of the current. After reaching the equilibrium, the oxide layer thickness, both at the bottom of the nanotubes and in the space between the nanotubes, is constant as the result of the titanium oxidation rate equaling the dissolution rate of the formed oxide layer by fluoride ions. This process leads to a gradual increase in the length of the ONTs, which can be vividly described as the movement of the barrier layer into the titanium or its alloy, with a relatively small change in the position of the upper surface of the nanotubes associated with slow, chemical dissolution. Sometimes, the increase in the length of ONTs is distinguished as the fourth step of the whole process, but most authors treat it as a further part of the third step. The growth rate of the ONTs gradually decreases during the anodizing process. Since this rate is the same as the chemical dissolution rate taking place on the top surface of the layer, further anodizing does not elongate the formed ONTs [34,35].

The properties of ONTs layers are mainly determined by the chemical composition of the electrolyte and its temperature, the applied anodizing voltage or current density, and the substrate material [7,9–12,14–18,25–35]. An increase in the anodizing voltage increases the pore size by merging small pores into large ones, thereby reducing the number of pores. Increasing the surface roughness of the implant at the nanoscale contributes to facilitating the adhesion of osteogenic cells. Due to the similarity of the structure of ONTs layers to the structure of bone tissue in chemical and morphological terms, the porous surface of the implant improves the osseointegration as a result of faster growth of bone tissue and the formation of a stronger bond between the bone and the implant surface [32]. Obtaining ONTs with a high level of pore organization has become a very useful technology to functionalize the surface of surgical implants, production of biomedical sensors, or drug carriers [7].

In this paper, we continue our study on surface functionalization of the Ti–13Zr–13Nb alloy using anodizing [10,14–18,25,26]. The subject of the research was tuning the surface properties of this alloy towards biomedical applications by producing first-generation (1G) ONTs layers under new anodizing conditions in hydrofluoric acid solution. Due to the potential use for long-term implants, the newly developed 1G ONTs layers were subjected for the first time to *in vitro* corrosion resistance characteristics in a biological environment. Considering that usually used direct current (DC) and alternating current (AC) methods do not provide full information on the corrosion behavior of biomaterials

because they allow the measurement of only the average current values for the entire electrode surface in contact with the electrolyte, both electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and localized electrochemical impedance spectroscopy (LEIS) were applied at the macro- and microscale, respectively. Both EIS and LEIS were based on the same principles that a small sinusoidal voltage disturbance was applied to the electrode under test and the current response was measured, allowing the impedance to be calculated. The difference was that in the EIS method, the bulk current was measured, and in the case of the LEIS method, a microprobe scanning close to the electrode surface was used, which allowed the measurement of the local current in the electrolyte and the calculation of the local impedance.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Substrate Preparation

The substrate material used for anodizing was a commercial Ti–Zr–Nb alloy with a chemical composition (wt.%): 74–Ti, 13–Zr, and 13–Nb (BIMO TECH, Wrocław, Poland). This bi-phase ( $\alpha + \beta$ ) alloy was obtained as a bar 20 mm in diameter and 1000 mm long. The bar was in the annealed state and before the tests, it was plastically processed in the two-phase range with air cooling in accordance with the specifications of ASTM F1713-08(2021)e1 [36]. Tested samples prepared in the form of discs 3 mm thick were embedded in duracryl, and then wet-ground on abrasive papers with silicon carbide of various grits of gradation of 600, 800, 1200, and 2500 (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) using a metallographic grinding and polishing machine Forcipol 202 (Metkon Instruments Inc., Bursa, Turkey). Then the samples were polished using polishing cloths and suspensions. After polishing, the samples were placed in an ultrasonic cleaner USC-TH (VWR International, Radnor, PA, USA) with ultrapure water (Milli-Q Advantage A10 Water Purification System, Millipore SAS, Molsheim, France) for 20 min to remove unwanted impurities. Then the samples were degreased with acetone (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland). The sample cleaning procedure was repeated twice.

### 2.2. Anodizing Conditions of Ti–13Zr–13Nb Alloy

For the purposes of anodizing, electrodes were made from the prepared alloy samples. Electrical contact was provided by an insulated copper wire that was attached to the back side of the alloy samples with epoxy resin. The back side of the alloy samples and the side walls were protected using a two-component epoxy resin, which was chemically resistant. The native oxide layer was removed from the electrode surface immediately before anodizing using depassivation in 25% *v/v* HNO<sub>3</sub> (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland) for 10 min. The electrodes were then cleaned with Milli-Q water in an ultrasonic bath for 20 min and placed in an electrochemical cell.

Anodizing was carried out in an aqueous solution of 0.5% hydrofluoric acid (ACS-grade HF, 48%, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) at a temperature of 22(1) °C at a voltage of 20 V for 120 min using the PWR800H high-current power supply (Kikusui Electronics Corporation, Yokohama, Japan). The distance between the sample (anode) with a geometric area of 0.64 cm<sup>2</sup> and the platinum foil (cathode) with an area of 16 cm<sup>2</sup> was constant and amounted to 25 mm. After the anodizing process, the electrodes were rinsed in Milli-Q water and dried in air at ambient temperature.

### 2.3. TEM Measurements

The structure of 1G ONTs on Ti–13Zr–13Nb alloy was examined by high resolution electron microscopy (HREM) method using a JEOL JEM-3010 Transmission Electron Microscope (TEM, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) operating at an acceleration voltage of 30 kV, equipped with a Gatan 2 k × 2 k Orius<sup>TM</sup> 833 SC200D CCD camera. During TEM studies, the microstructure of ONTs without the presence of a substrate was observed. For this purpose, the anodized Ti–13Zr–13Nb alloy was immersed in isopropanol and sonicated for 60 min in an ultrasonic bath. Then, the ONTs detached from the substrate was de-

posited on a copper mesh covered with an amorphous carbon foil standardized to prepare a sample for TEM observations.

#### 2.4. ATR-FTIR Measurements

To determine the functional groups of the tested materials, the Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) method was used. ATR-FTIR absorption spectra were recorded using an IR Trace-100 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with ATR attachment with a diamond crystal for testing solid-states. All measurements were conducted in the spectral region of  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  at 100 scans per sample at  $21(1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The radiation was split into two beams, one of which ran along a path of constant length, and the other was generated by an interferometer with a moving mirror moving at a constant speed. The changing path length difference of the two beams caused mutual interference, resulting in an interferogram. The use of the Fourier transform allowed to transform the interferogram from the time domain to the frequency domain receiving a spectrum. The infrared (IR) beam penetrated the sample to a depth of several microns before being reflected. During the measurements, the crystal and the material under study stayed in contact.

#### 2.5. DC and AC Measurements in Saline

In vitro tests of the corrosion resistance of the studied material were conducted in a saline solution at the temperature of  $37(1)\text{ }^{\circ}\text{C}$  using the method of open-circuit potential (OCP), polarization curves, and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). A solution of 0.9% NaCl pH = 7.4(1) was deaerated for 30 min with argon; 4% NaOH and 1%  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$  were used to adjust the pH. For preparation of the saline solution, analytically pure reagents (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland) and ultrapure water were used.

All electrochemical tests were performed using the Autolab/PGSTAT12 computer controlled electrochemical system (Metrohm Autolab B.V., Utrecht, The Netherlands). Electrochemical measurements were carried out in a three-electrode system consisting of a working electrode (WE) in the form of the tested material, a counter electrode (CE) as a platinum mesh, and a reference electrode (RE) placed in the Luggin capillary against which all potential values were measured. The RE was a saturated calomel electrode (SCE) with a potential of 244.4(1) mV. The method of preparation of WE was described in the work [7]. After stabilization of open-circuit potential ( $E_{OC}$ ) for 2 h, the polarization curves  $j = f(E)$  were recorded using the potentiodynamic method in the potential range  $\pm 50\text{ mV}$  in relation to the  $E_{OC}$  with the electrode polarization rate  $v = 1\text{ mV s}^{-1}$ . The obtained polarization curves were the basis for determining the corrosion resistance parameters.

Subsequently, the EIS spectra were recorded at the  $E_{OC}$  in the frequency range from 20 kHz to 1 mHz using 10 frequencies per decade. A sine wave with an amplitude of 10 mV as an excitation signal was applied. Kramers–Kronig relations (K–K test) were used to assess the correctness of the obtained EIS data [37]. The analysis of the experimental EIS spectra was carried out based on the equivalent electrical analogs using the EQUIVCRT program with Boukamp's circuit description and the method of complex nonlinear least squares (CNLS) with modulus weighting [38]. The Fisher–Snedecor test  $F$  for the confidence level of  $\alpha = 0.01$  corresponding to 99% probability was used to check the significance of the parameters of the equivalent electrical circuits used [37]. The  $\chi^2$  (chi-square) test was used for verification of the EIS fit quality.

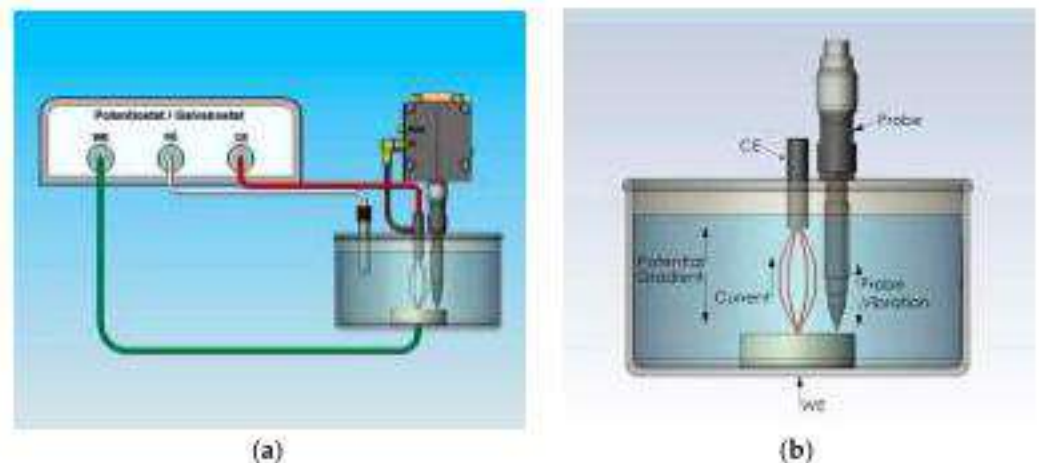
Susceptibility to pitting corrosion was tested using anodic polarization curves in the potential window from  $E_{OC}$  minus 150 mV to 9.4 V at  $v = 1\text{ mV s}^{-1}$ . To accurately visualize and interpret the obtained results, electrochemical noise was eliminated using the Savitzky–Golay smoothing algorithm and OriginPro 2018 software (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Each type of measurement was repeated thrice, and the values of the determined parameters were given as mean values with standard deviation (SD).

### 2.6. Scanning Electrochemical Measurements in Saline

To analyze local changes in the corrosion resistance of the Ti-13Zr-Nb alloy before and after electrochemical oxidation, the scanning vibration probe technique (SVET) and LEIS were used. The SVET and LEIS techniques allowed to determine the distribution of the ion current density ( $j$ ) and the impedance modulus ( $|Z|$ ), respectively, above the surface of the sample in an aqueous solution of 0.9% NaCl with a conductivity of  $16.32 \text{ mS cm}^{-1}$ . Distribution maps of a specific parameter over the material surface ( $j$  or  $|Z|$ ) were recorded using a PAR Model 370 Scanning Electrochemical Workstation (Princeton Applied Research, Oak Ridge, TN, USA). SVET and LEIS measurements were carried out in a four-electrode system: WE, CE as a platinum grid in the SVET technique and a platinum ring applied to the probe in the LEIS method, RE as SCE, and SVET or LEIS probe. All electrodes were immersed in a saline solution contained in a glass cell known as the TriCell. For both techniques, the probe-sample distance was determined using a video camera to be approximately  $150 \mu\text{m}$ .

The SVET technique measured the localized current in a saline above a sample by virtue of the IR drop in the electrolyte [39]. The connection mode of a sample under potentiostatic control with an isolated potentiostat was used, which reduced noise (Figure 1a). A potential gradient between the WE and the CE in the saline was directly proportional to the current and the conductivity of the electrolyte (Figure 1b). A probe immersed in the electrolyte was perpendicular to the WE. The probe was mounted on a precision vibrating stage, which vibrated in the vertical plane. The potential of the probe was directly proportional to its position in the potential gradient. The amplitude of the AC potential on the probe was therefore directly proportional to the current. The probe was scanned in the saline electrolyte such that the distribution of current on the surface of a sample might be mapped in the X and Y planes.



**Figure 1.** Scheme of the SVET setup with Scanning Electrochemical Workstation Software M370, Version 1.20: (a) Sample under potentiostatic control with isolated potentiostat; (b) TriCell with a four-electrode configuration.

The maps of the ion current density distribution were recorded at a fixed anode current density in the passive range of  $60 \mu\text{A cm}^{-2}$ , which corresponded to a potential of about 2 V vs. SCE on a potentiodynamic curve and a fixed microprobe vibration amplitude of  $30 \mu\text{m}$ . The scanned area was  $512 \times 512 \mu\text{m}$  with a step of  $16 \mu\text{m}$ . Using a gold electrode with a diameter of  $200 \mu\text{m}$  immersed in the same solution as the tested materials, a calibration was performed, which enabled the conversion of the voltage recorded by the SVET microprobe into the values of the ion current density.

The LEIS technique was used to monitor corrosion mechanisms and kinetics. The maps of the impedance modulus distribution were measured at the  $E_{\text{OC}}$ , considered

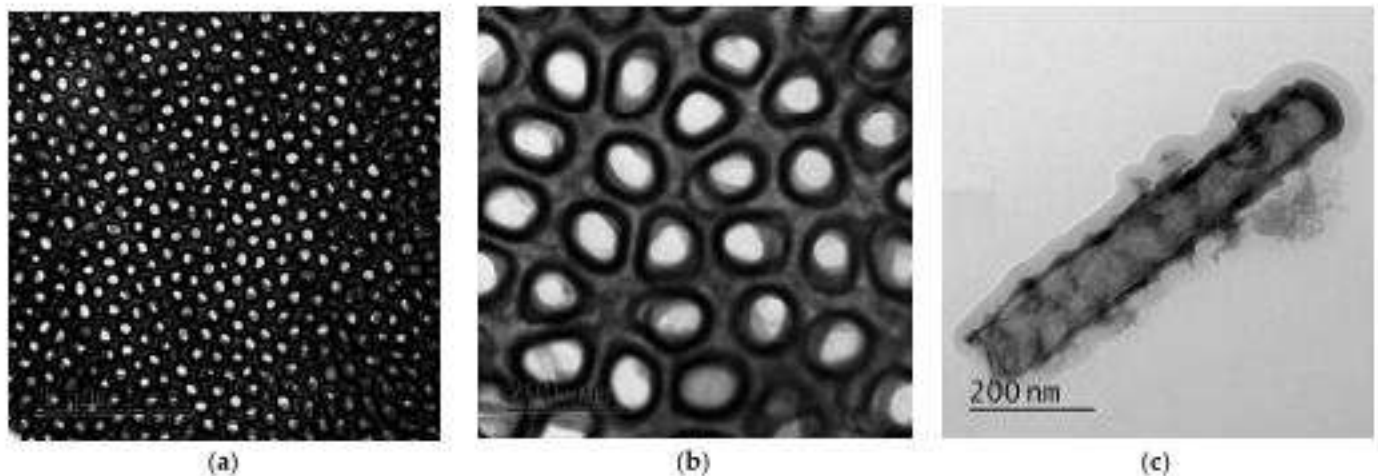


approximately as the corrosion potential ( $E_{cor}$ ) of the material and the selected frequency, i.e., 500 mHz. More details about the LEIS technique are available in [40,41].

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. TEM Characterization of 1G ONTs on Ti-13Zr-13Nb Alloy

The 1G ONTs layers were produced by anodizing Ti-13Zr-13Nb alloy at 20 V for 120 min in 0.5% HF solution and then detached from the substrate. Figure 2a,b show examples of TEM images of the surface morphology of the formed ONTs layer at different scales. The on-top general view of the obtained ONTs layer in a selected micro-region revealed a uniform distribution of densely packed ONTs with single and very smooth walls and a high degree of self-organization. In the TEM image of a single oxide nanotube, its regular shape can be observed without any fraying at the top of ONT. The cross-section of a single oxide nanotube has a cylindrical shape. The obtained bamboo-like ONTs showed a vertical arrangement. No bundles of 1G ONTs growing locally were observed as was the case with 2G [17] and 3G [18] ONTs on the Ti-13Zr-13Nb alloy.



**Figure 2.** TEM microscopic image of 1G ONTs produced by anodizing Ti-13Zr-13Nb alloy at 20 V for 120 min in 0.5% HF solution and then detached from the substrate: (a) On-top general view of the ONTs layer; (b) On-top general view of the ONTs layer at higher magnification; (c) Single oxide nanotube.

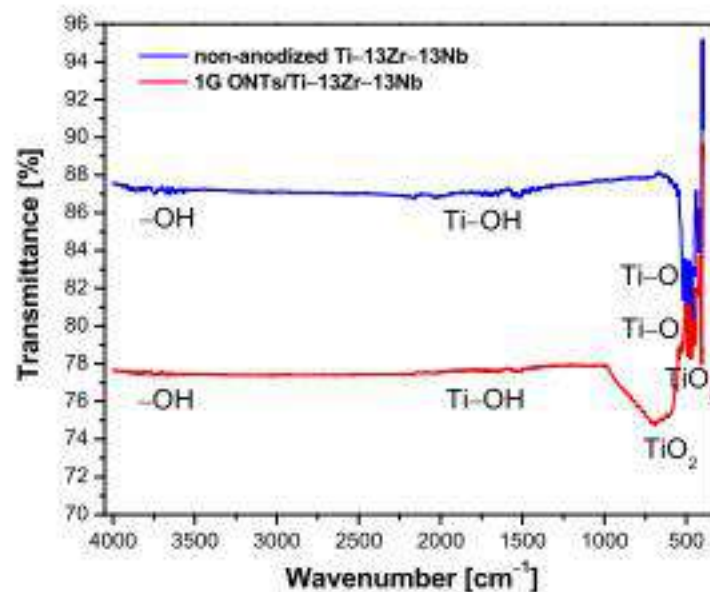
On the basis of TEM microscopic images, the morphological parameters of the produced 1G ONTs were determined, such as the average inner and outer diameter of the oxide nanotube and its length. Under the proposed anodizing conditions, the ONTs with an average inner diameter of 70(8) nm and an average outer diameter of 90(13) nm were formed. The average length of the ONTs was 0.91(7)  $\mu\text{m}$ . The obtained results are consistent within the limit of error with the values of morphological parameters determined on the basis of FE-SEM images in selected local areas of the 1G ONTs surface, formed under comparable conditions [15]. The mechanism of multi-step formation of 1G ONTs layer on the Ti-13Zr-13Nb alloy surface based on activity of fluoride ions in aqueous inorganic solutions was explained in detail in the previous work [18]. For comparison, 2G ONTs with the inner diameter of 61(11) nm, outer diameter of 103(16) nm, and length of 3.9(2)  $\mu\text{m}$  were formed on the same substrate surface in a 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 2\% \text{NH}_4\text{F}$  solution at 20 V for 120 min [17]. On the other hand, 3G ONTs on the Ti-13Zr-13Nb alloy formed in 1M  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2 + 4\% \text{NH}_4\text{F}$  at 50 V for 80 min were characterized by the inner diameter of 218(39) nm, outer diameter of 362(44) nm, and length of 9.7(6)  $\mu\text{m}$  [14]. These results show that anodizing conditions, and in particular the type of electrolyte, have a significant impact on the morphological parameters of the obtained ONTs.

The proposed ONTs can be saturated with antibiotics and bactericidal/bacteriostatic substances, which will make it possible to omit the oral route of dosing the drug. The

drug will act directly in the bone tissue, inhibiting the growth of bacteria already at the implantation site. Medicinal substances will be released from the inside of the ONTs in the place of the newly inserted implant. Innovative implants with a layer of ONTs on their surface can therefore be proposed as intelligent drug carriers in drug delivery systems, especially for personalized medicine [7]. They will also allow for painless application, faster healing, and significant acceleration of bone tissue regeneration [1,2,32].

### 3.2. ATR-FTIR Characterization of Ti-13Zr-13Nb Alloy before and after Anodizing

Measurements of transmittance in the fundamental IR range were based on the phenomenon of total internal reflection of light from the interface of two materials with different refractive indices. The ATR-FTIR spectroscopy, as one of the most accurate spectroscopic methods, allowed to assign particular functional groups to specific areas with characteristic absorption bands. The non-anodized Ti-13Zr-13Nb alloy along with the 1G ONTs layer was investigated by ATR-FTIR spectroscopy in the range of 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 3).



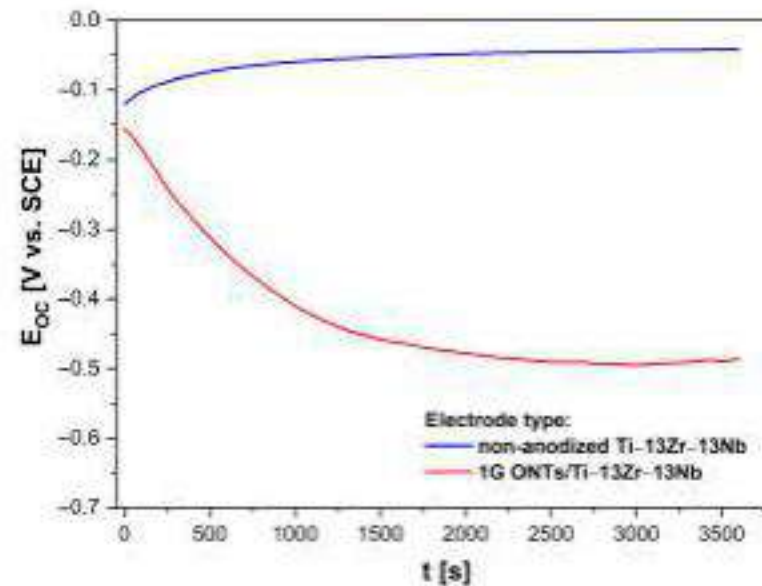
**Figure 3.** The ATR-FTIR absorption spectrum of the non-anodized Ti-13Zr-13Nb alloy and with 1G ONTs layer formed at 20 V for 120 min in 0.5% HF solution.

Several characteristic bands for  $\text{TiO}_2$  are visible in both obtained ATR-FTIR spectra in Figure 3. The broad  $\text{TiO}_2$  peak observed at 3896–3577  $\text{cm}^{-1}$  is related to the stretching vibrations of the hydroxyl group  $-\text{OH}$ , which represents water as moisture present on the surface of the material or in the vicinity of the tested sample [42]. Both the ATR-FTIR absorption spectrum recorded for the non-anodized Ti-13Zr-13Nb alloy and the 1G ONTs layer produced show a band at the wavelength of 1630  $\text{cm}^{-1}$ , which corresponds to bending modes of water  $\text{Ti-OH}$  [43]. The peak in the range of 873–558  $\text{cm}^{-1}$  visible in the ATR-FTIR absorption spectrum for the 1G ONTs/Ti-13Zr-13Nb sample indicates the presence of  $\text{TiO}_2$  in the anodic oxide layer on the alloy substrate surface. The peak at 580  $\text{cm}^{-1}$  in both obtained spectra corresponds to vibrations of the  $\text{Ti-O}$  bond [44]. This is a peak characteristic of  $\text{TiO}_2$  present on the surface of the material [45,46]. Bands in the range of 495–453  $\text{cm}^{-1}$  correspond to the frequency of  $\text{TiO}_2$  in the rutile phase. Bands at 451 and 410  $\text{cm}^{-1}$  correspond to the frequencies of the anatase nanocrystalline phase and/or the rutile phase [47]. The results obtained using ATR-FTIR spectroscopy confirmed the presence of the anodic ONTs layer on the Ti-13Zr-13Nb alloy surface. They are also in good agreement with the results obtained using the grazing incidence X-ray diffraction (GIXD) for the obtained 1G ONTs layer, which confirmed the presence of both  $\alpha$ -Ti phase and  $\beta$ -Ti phase from the substrate and titanium oxides such as  $\text{TiO}_2$  (rutile),  $\text{TiO}_3$ , and  $\text{TiO}$  [15].

### 3.3. Assessment of In Vitro Corrosion Resistance Measurements in Saline Solution

#### 3.3.1. Open-Circuit Potential Measurements

The preliminary assessment of the effect of anodizing the Ti-13Zr-13Nb alloy in the proposed conditions on the corrosion resistance in vitro in saline solution was carried out based on the measurement of open-circuit potential. The conditions of the in vitro electrochemical measurements with the potentiostat open loop corresponded to the in vivo conditions in the human body. The  $E_{OC}$  value was determined as the potential difference measured between WE and RE without using an external current source in the electrochemical system for 2 h as shown in Figure 4.

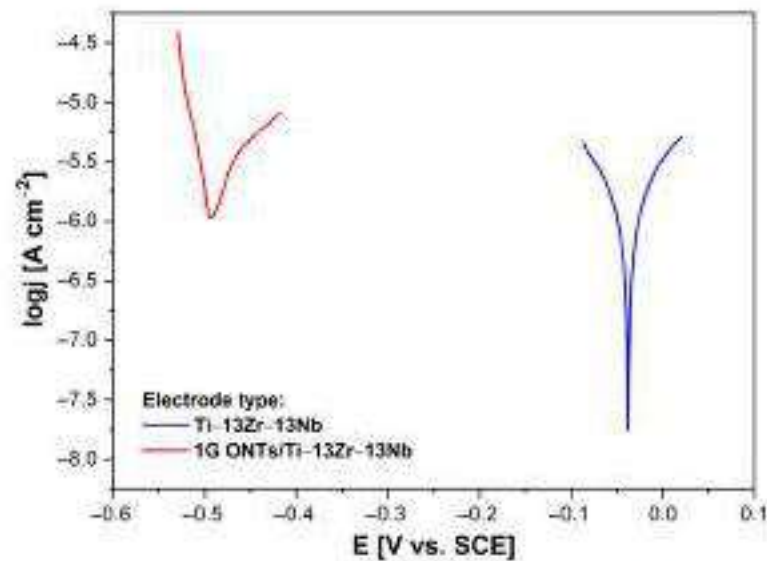


**Figure 4.** Dependence of open-circuit potential ( $E_{OC}$ ) on immersion time ( $t$ ) for the Ti-13Zr-13Nb electrode without and with 1G ONTs layer in saline solution at 37 °C.

After 2 h of immersion, a stable  $E_{OC}$  value for both tested electrodes was reached. After this time, the rate of  $E_{oc}$  change was slower than  $1 \text{ mV min}^{-1}$ . For the non-anodized Ti-13Zr-13Nb electrode, the stable  $E_{OC}$  was  $-42 \text{ mV}(8) \text{ V}$ , while for the 1G ONTs/Ti-13Zr-13Nb electrode, the  $E_{OC}$  shift towards cathode potentials was observed. The significant decrease in the  $E_{OC}$  value to  $-486 \text{ mV}(24) \text{ V}$  for the anodized Ti-13Zr-13Nb electrode indicates that the initiation of electrochemical corrosion will occur more easily on the porous surface of ONTs. Such a character of  $E_{OC}$  changes initially indicates a greater thermodynamic tendency to the corrosion of porous 1G ONTs/Ti-13Zr-13Nb electrode. Figure 4 also shows the influence of the Ti-13Zr-13Nb alloy anodizing on the course of the  $E_{OC} = f(t)$  curve. The observed changes in  $E_{OC}$  reflect various trends in the metal | solution interface variability with increasing immersion time. As shown in Figure 4, the  $E_{oc}$  value for the non-anodized Ti-13Zr-13Nb electrode gradually shifted in time towards the anodic potentials. This phenomenon resulted from a spontaneous formation and thickening of an ultrathin oxide layer on the electrode surface with time [22]. The self-passive oxide layer protected the Ti-13Zr-13Nb electrode from dissolving in the electrolyte. In the case of the 1G ONTs/Ti13Zr-13Nb electrode, in the initial phase of the measurements, the  $E_{OC}$  rapidly shifted towards the cathode potentials, and then the rate of its changes gradually decreased until it finally reached a stable value.

#### 3.3.2. Analysis of Tafel Curves

Figure 5 shows the Tafel curves recorded in a narrow range of potentials  $\pm 50 \text{ mV}$  relative to the  $E_{OC}$  for the Ti-13Zr-13Nb electrode before and after anodizing in saline solution at 37 °C. The obtained  $\log |j| = f(E)$  dependences were the basis for determining the corrosion resistance parameters, which are summarized in Table 1.



**Figure 5.** Tafel curves for the Ti-13Zr-13Nb electrode before [10] and after anodizing in saline solution at 37 °C. The polarization scan rate was  $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Table 1.** In vitro corrosion resistance parameters determined based on the Tafel curves for the Ti-13Zr-13Nb electrode before and after anodizing in saline solution at 37 °C (see Figure 5).

Electrode Type	$E_{cor}$ (V)	$j_{cor}$ ( $\text{A cm}^{-2}$ )	$b_c$ ( $\text{V dec}^{-1}$ )	$b_a$ ( $\text{V dec}^{-1}$ )	$R_p$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	CR at $E_{cor}$ ( $\text{mm yr}^{-1}$ )
Ti-13Zr-13Nb [10]	-0.038(8)	$3.3(7) \times 10^{-7}$	-0.018(4)	0.012(2)	460(92)	0.003(1)
1G ONTs/Ti-13Zr-13Nb	-0.497(26)	$4.9(9) \times 10^{-6}$	-0.033(8)	0.032(7)	50(7)	0.004(1)

The values of corrosion resistance parameters, such as corrosion potential ( $E_{cor}$ ), corrosion current density ( $j_{cor}$ ), and cathodic ( $b_c$ ) and anodic ( $b_a$ ) Tafel slope were determined numerically by fitting the parameters of the Butler–Volmer Equation (1) to the experimentally obtained dependence  $j = f(E)$  [48]:

$$j = j_{cor} \left\{ \exp \left[ \frac{2.303(E - E_{cor})}{b_a} \right] - \exp \left[ -\frac{2.303(E - E_{cor})}{b_c} \right] \right\} \quad (1)$$

Polarization resistance ( $R_p$ ) and general corrosion rate at  $E_{cor}$  were calculated using Equations (2) and (3), respectively, according to ASTM G102:89(2015)e1 [49]:

$$R_p = \frac{B}{j_{cor}} \quad (2)$$

$$CR = K_1 \frac{EW}{\rho} j_{cor} \quad (3)$$

where B—Stern–Geary coefficient,  $K_1$ —conversion constant, EW—equivalent weight, and  $\rho$ —density.

The EW for the Ti-13Zr-13Nb electrode was calculated at 12.5 assuming the thermodynamically stable forms of  $\text{Ti}^{4+}$ ,  $\text{Zr}^{2+}$ , and  $\text{Nb}^{5+}$  based on the Pourbaix diagram of Ti-H<sub>2</sub>O, Zr-H<sub>2</sub>O, and Nb-H<sub>2</sub>O system, respectively [50]. CR is expressed in  $\text{mm yr}^{-1}$  assuming in the Equation (3) the value of  $K_1$  equal to  $3.27 \times 10^{-3} \text{ mm g } \mu\text{A}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ yr}^{-1}$  and taking into account  $j_{cor}$  expressed in  $\mu\text{A cm}^{-2}$ .

The potentiodynamic polarization curves presented in Figure 5 illustrate the course of anodic and cathodic reactions in the corrosion process of the non-anodized and anodized Ti-13Zr-13Nb electrodes in saline solution. One of the most important electrochemical

parameters that quantify the changes in the corrosion resistance of the materials under study is the  $E_{cor}$  (Table 1). This thermodynamic quantity has values similar to the  $E_{OC}$ . The  $E_{cor}$  can be used as a comparative parameter for the assessment of the corrosion resistance of various materials in the same corrosive environment. Figure 5 shows the  $E_{cor}$  shift towards the cathodic potentials for 1G ONTs/Ti-13Zr-13Nb electrode in comparison with the Ti-13Zr-13Nb electrode before anodizing. Such electrochemical behavior indicates a lower corrosion tendency for the Ti-13Zr-13Nb electrode covered with a self-passive oxide layer with stronger barrier properties [10,14,22,51,52].

The  $j_{cor}$  value for the porous 1G ONTs/Ti-13Zr-13Nb electrode is ca. 15 times higher as compared to the  $j_{cor}$  determined for the non-anodized substrate (Table 1). The obtained values are directly proportional to the CR at the  $E_{cor}$ . These results indicate faster dissolution rate of the anodic 1G ONTs layer as compared to the self-passive oxide layer formed spontaneously. However, it should be emphasized that the material consumption of both tested electrodes is on the same order of  $10^{-3}$  mm yr<sup>-1</sup> (Table 1).

The Tafel slope for the cathodic ( $b_c$ ) and anodic ( $b_a$ ) branch were determined based on the Equations (4) and (5), respectively [48]:

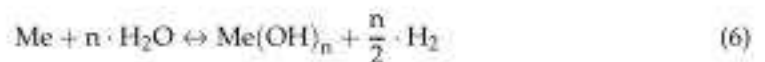
$$b_c = -\frac{2.3RT}{\alpha nF} \quad (4)$$

$$b_a = \frac{2.3RT}{(1-\alpha)nF} \quad (5)$$

In the above equations,  $R$  is assigned to the gas constant equal to  $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ,  $T$  denotes the temperature in K,  $\alpha$  means the cathodic transfer coefficient,  $n$  is the number of electrons involved in the reaction, and  $F$  is the Faraday constant equal to  $96,500 \text{ C mol}^{-1}$ .

For both tested electrodes  $b_c > b_a$ , i.e., the rate determining step of the corrosion process is the slower anodic reaction (Table 1). Based on the results obtained, it is possible to propose the corrosion mechanism of the investigated materials, which is consistent with the passive dissolution under anaerobic conditions in a neutral aqueous solution [3,53].

The course of the charge transfer reaction can be described by the following general reaction in which  $\text{H}_2\text{O}$  acts as the oxidation agent:



The  $\text{Me}(\text{OH})_n$  products in Reaction (6) can be metal oxides, hydroxides, or hydrated oxides. Gaseous hydrogen is also evolved as a product of this reaction.

The Reaction (6) is coupled with the water reduction consuming electrons from the oxidation reaction. The Reactions (7) and (8) also proceed in a neutral solution:



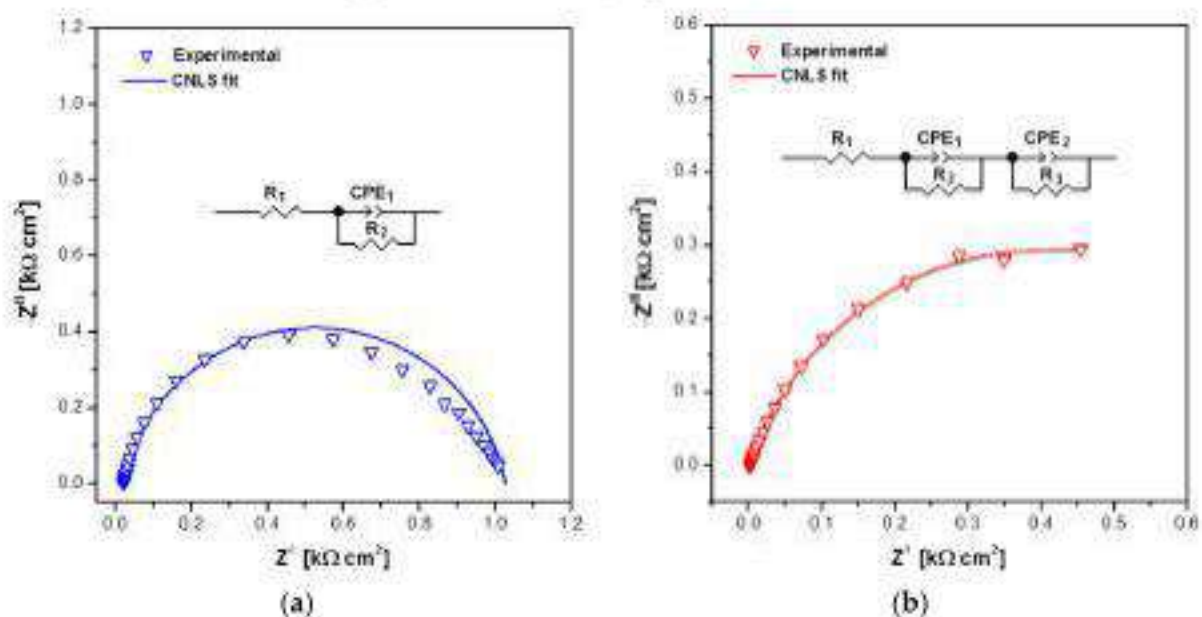
Based on the  $b_c$  and  $b_a$  values in Table 1, one can see that the rate of anodic reaction described by Equation (6) is slower as compared to the rate of the reduction reactions represented by Equations (7) and (8). It can be concluded that anodizing does not change the nature of the electrochemical processes occurring on the Ti-13Zr-13Nb electrode in saline solution. However, a strong decrease in the  $R_p$  value is observed for the Ti-13Zr-13Nb electrode covered with the 1G ONTs layer compared to the non-anodized electrode with an amorphous native oxide layer (Table 1) [10]. The corrosion resistance of such electrodes is dependent on both the structure and thickness of the oxide layer [15].

### 3.3.3. EIS Study on Mechanism and Kinetics of Electrochemical Corrosion in Saline Solution

EIS method was used for characterization of the interfacial properties of the Ti-13Zr-13Nb | oxide layer | saline solution system. The experimental Nyquist diagrams for the Ti-13Zr-13Nb electrode before [10] and after anodizing recorded at  $E_{OC}$  in saline solution at 37 °C are shown as symbols in Figure 6a and Figure 6b, respectively. The corresponding phase angle Bode diagrams are presented in Figure 7. Symbols in Figures 6 and 7 are experimental data and continuous lines are CNLS fit. The CNLS fitting procedure used the concept of electrical equivalent circuits in which, instead of capacitors, the constant phase element (CPE) was applied. The impedance of CPE ( $Z_{CPE}$ ) was defined by the Equation (9) [10]:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{T(j\omega)^\phi} \quad (9)$$

where  $T$  is the capacitance parameter expressed in  $F s^{\phi-1} cm^{-2}$  dependent on the potential of electrode potential, and  $\phi$  relates to the angle of rotation of purely capacitive line on the complex plane plots of  $\alpha = 90^\circ(1 - \phi)$ . The CPE is a leaking capacitor with nonzero real and imaginary components. For  $\phi = 1$ ,  $T$  is equal to the capacitance of the double layer ( $C_{dl}$ ), and purely capacitive behavior is observed. According to Equation (9), pure capacitance is for  $\phi$  equal to 1, infinite Warburg impedance for  $\phi$  equal to 0.5, pure resistance for  $\phi$  equal to 0, and pure inductance for  $|\phi$  equal to 1 [37].



**Figure 6.** Nyquist diagram for the Ti-13Zr-13Nb electrode in saline solution at 37 °C with the equivalent electrical circuit model for the pitting corrosion process: (a) Non-anodized [10]; (b) After formation of 1G ONTs layer.

The maximum value of  $\phi$  is slightly less than  $90^\circ$  in the case of the non-anodized and anodized Ti-13Zr-13Nb electrodes (Figure 7). For the non-anodized electrode, only one time constant is present in the electrical circuit (Figures 6a and 7a). Such impedance behavior characterizes titanium and its alloys coated with a thin oxide layer in a biological milieu [3,6,10,14,52]. Two time constants are visible in the electrical circuit for the Ti-13Zr-13Nb electrode with anodic 1G ONTs layer (Figures 6b and 7b). The obtained results are in accordance with our previous study on the EIS behavior of the autoclaved alloy with a sintered HAp/nSiO<sub>2</sub>/Ag hybrid coating [6] and the Ti-13Zr-13Nb alloy with formed ONTs layers of second- and third-generation [10,14]. The experimental high values of  $|Z|_{\omega \rightarrow 0}$  are typical for materials with capacitive behavior and high corrosion resistance [37].

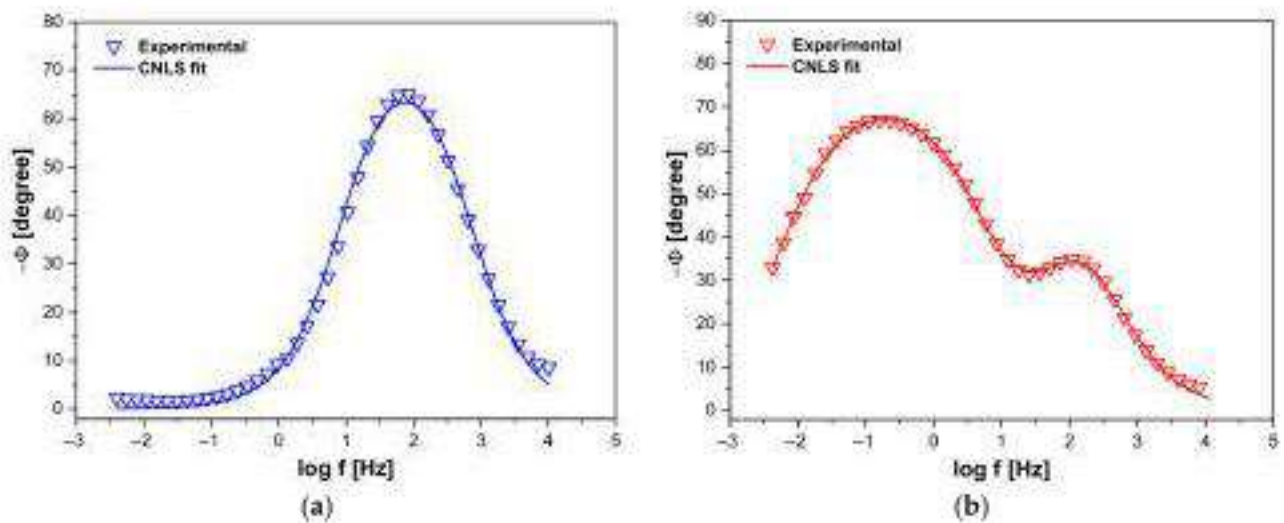


Figure 7. Phase angle Bode diagram for the Ti-13Zr-13Nb electrode in saline solution at 37 °C: (a) Non-anodized [10]; (b) After formation of 1G ONTs layer.

The EIS experimental data on the protective properties of a self-passive oxide layer on the surface of the non-anodized Ti-13Zr-13Nb electrode were approximated using the equivalent electrical circuit model for the pitting corrosion process which is called one-CPE model (Figure 6a) [10,37]. This model with four adjustable parameters as  $R_1$ ,  $CPE_1-T$ ,  $CPE_1-\phi$ , and  $R_2$  displays only one semicircle on the Nyquist plot [3,6,10,14,37,52]. In this model,  $R_1$  is the solution resistance,  $CPE_1-T$  denotes the  $CPE_1$  capacitive parameter,  $CPE_1-\phi$  is the  $CPE_1$  exponent associated with the  $C_{dl}$ , and  $R_2$  is the charge transfer resistance through the interface of electrode | oxide layer | electrolyte. The construction of such equivalent electrical circuits as well as the physical meaning of the individual circuit parameters have been described in detail in earlier work [10,37].

In the case of the Ti-13Zr-13Nb electrode with the layer of 1G ONT, to approximate the experimental EIS data, the equivalent electrical circuit model for the pitting corrosion process illustrated in Figure 6b was used. This two-CPE model is described by seven adjustable parameters,  $R_1$ ,  $CPE_1-T$ ,  $CPE_1-\phi$ ,  $R_2$ ,  $CPE_2-T$ ,  $CPE_2-\phi$ ,  $R_3$ , and displays two semicircles on the Nyquist plot [6,10,37]. In this model, presence of a two-layered structure of the passive oxide film on the surface of the metallic electrode is assumed. The semicircle at high frequencies (HF) refers to the outer oxide layer with a porous structure (ONTs) and is described by the circuit parameters such as  $R_1$ ,  $CPE_1-T$ ,  $CPE_1-\phi$ , and  $R_2$ .  $R_1$  is the solution resistance,  $CPE_1-T$  is the capacitance of porous ONTs layer,  $CPE_1-\phi$  is the  $CPE_1$  exponent, and  $R_2$  corresponds to the resistance of the ONTs layer. The remaining parameters of the circuit as  $CPE_2-T$ ,  $CPE_2-\phi$ , and  $R_3$  describe the second semicircle at low frequencies (LF) which refers to the inner-barrier oxide layer directly adjacent to the alloy substrate and showing strong protective properties.  $CPE_2-T$  and  $CPE_2-\phi$  are the  $CPE_2$  capacitive parameter and the  $CPE_2$  exponent, respectively, related to the barrier oxide layer.  $R_3$  is the resistance of this barrier oxide layer.

Figures 6 and 7 illustrate the CNLS-fitted data marked as continuous lines which were obtained using the described electrical equivalent circuits. The very good quality of the CNLS fit is observed. All CNLS-fit parameters determined using the one-CPE equivalent electrical circuit model shown in Figure 6a for the Ti-13Zr-13Nb electrode before anodizing are summarized in Table 2. Table 3 presents all CNLS-fit parameters determined using the two-CPE equivalent electrical circuit model shown in Figure 6b for the Ti-13Zr-13Nb electrode with 1G ONTs layer.

**Table 2.** The parameters with standard deviations determined by approximation of the experimental EIS data for the non-anodized Ti–13Zr–13Nb electrode in saline solution at 37 °C [10] and the one-CPE equivalent electrical circuit model for the pitting corrosion process (see Figure 6a).

Electrode Type	$R_1$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$\text{CPE}_1\text{-T}$ ( $\text{F cm}^{-2} \text{ s } \phi^{-1}$ )	$\text{CPE}_1\text{-}\phi$	$R_2$ ( $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$ )
Non-anodized Ti–13Zr–13Nb	20.69(2)	$0.73(5) \times 10^{-5}$	0.877(8)	1.01(1)

**Table 3.** The parameters with standard deviations determined by approximation of the experimental EIS data for the anodized Ti–13Zr–13Nb electrode in saline solution at 37 °C and the two-CPE equivalent electrical circuit model for pitting corrosion process (see Figure 6b).

Electrode Type	$R_1$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$\text{CPE}_1\text{-T}$ ( $\text{F cm}^{-2} \text{ s } \phi^{-1}$ )	$\text{CPE}_1\text{-}\phi$	$R_2$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$\text{CPE}_2\text{-T}$ ( $\text{F cm}^{-2} \text{ s } \phi^{-1}$ )	$\text{CPE}_2\text{-}\phi$	$R_3$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )
1G ONTs/ Ti–13Zr–13Nb	0.57(1)	$5.09(34) \times 10^{-3}$	0.805(9)	1.46(3)	$1.87(2) \times 10^{-2}$	0.821(1)	916(12)

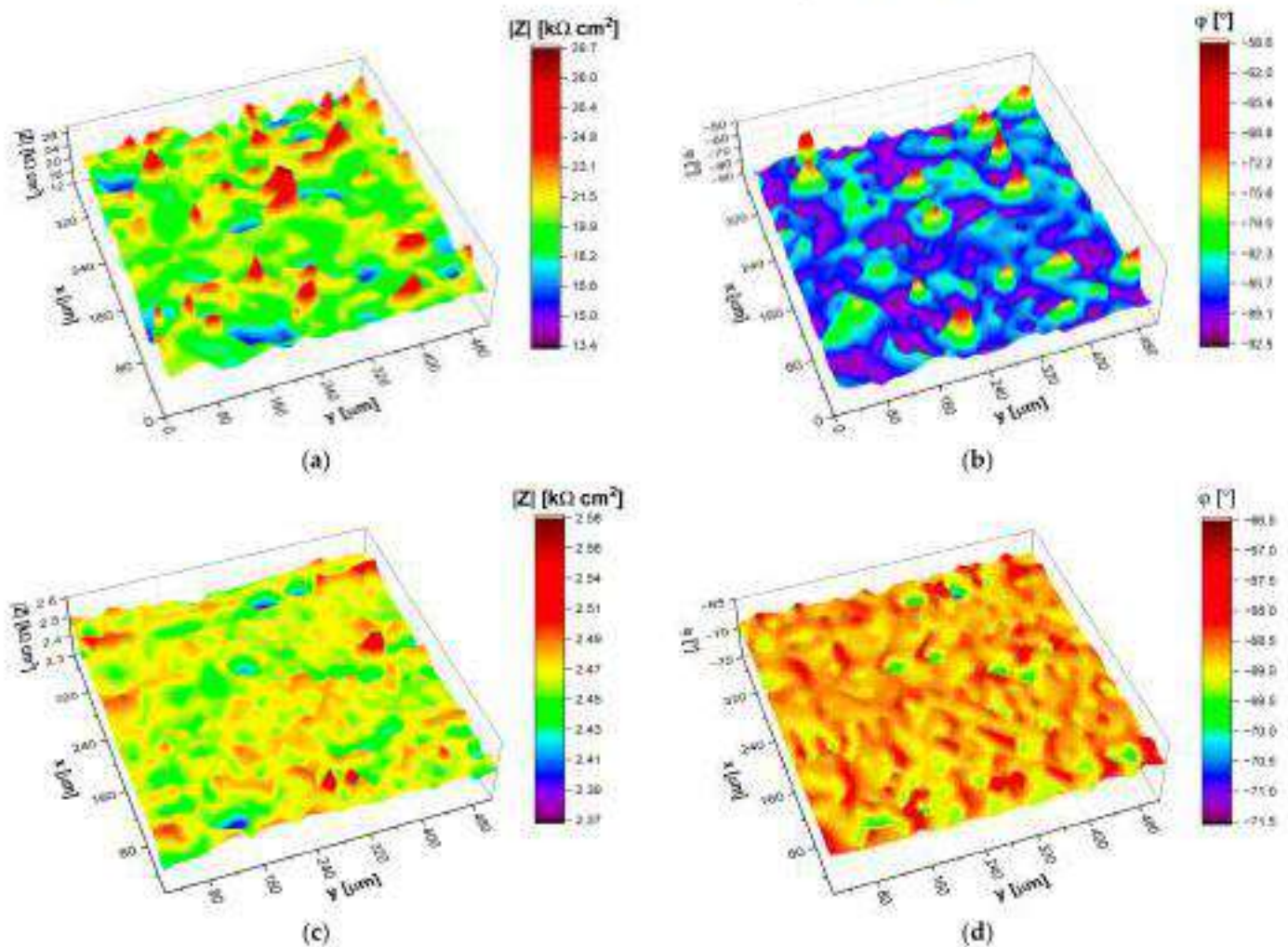
The value of  $R_2 = 1.01(1) \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$  is obtained for the Ti–13Zr–13Nb electrode before anodizing (Table 2), which is close to the  $R_p$  parameter determined based on the polarization curves near the  $E_{OC}$  (Table 1). The obtained results prove the correctness of the performed EIS tests. In physical and chemical terms, the parameters  $R_2$  and  $R_p$  mean the same and refer to the ongoing corrosion process according to Equation (6). In the case of the Ti–13Zr–13Nb electrode with 1G ONTs layer, the charge transfer resistance associated with the outer oxide layer,  $R_3$  of  $916(12) \Omega \text{ cm}^2$ , is over 627 times higher in comparison with  $R_2$  (Table 3). This phenomenon may result from the fact that the local electrolyte concentration inside the oxide nanotubes strongly increases compared to the pH in the volume of the electrolyte, which intensifies the destructive processes at the bottom of the oxide nanotubes. The deviation of CPE- $\phi$  parameter from 1 can be related to physico-chemical or geometrical inhomogeneities [37].

### 3.3.4. LEIS and SVET Study of Local Corrosion Resistance in Saline

Figure 8 shows the distributions of the local values of the impedance modulus  $|Z|$  over the surface of the Ti–13Zr–Nb alloy before and after electrochemical oxidation in 0.9% NaCl solution. The average value of impedance irregularities determined for non-anodized Ti–13Zr–Nb and after electrochemical oxidation are approximately 1.6  $\text{k}\Omega$  and 13  $\Omega$ , respectively. On this basis, it can be concluded that the surface of the non-anodized Ti–13Zr–Nb alloy is characterized by a relatively heterogeneous distribution of impedance values compared to the Ti–13Zr–Nb alloy with 1G ONTs layer. The cause of local impedance fluctuations (of the order of several  $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$ ) is probably the non-uniform thickness of the natural passive layer formed on Ti–13Zr–Nb in the initial state. From a thermodynamic viewpoint, Ti and its alloys can react quickly with oxygen and produce stable metal oxides on the surface. Native oxide films formed in the air are ultrathin [3,22,51]. The thickness of the native oxide film exposed to air increases over time. Its composition and microstructure are dependent on the temperature and pH of the environment. The native oxide film on the surface of Ti and its alloys often becomes inhomogeneous as it grows, which may be the cause of a relatively heterogeneous distribution of local impedance values. Therefore, in order to increase the stability of the native oxide layer on the titanium and its alloys, ensuring high corrosion resistance of implants, forced passivation is often used in clinical practice. It should be noted that the average value of the impedance modulus determined for the non-anodized Ti–13Zr–Nb is over 8 times higher compared to Ti–13Zr–Nb after electrochemical oxidation. For Ti–13Zr–Nb in the initial state, it is  $20.3 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ , and for Ti–13Zr–Nb after electrochemical oxidation, it is equal to  $2.5 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ . This effect is related to the formation of a porous layer of ONTs as the outer part of the passive layer. The



analysis of the impedance distribution maps recorded at  $E_{OC}$  confirms and complements the results obtained with the EIS method (Figures 6 and 7).

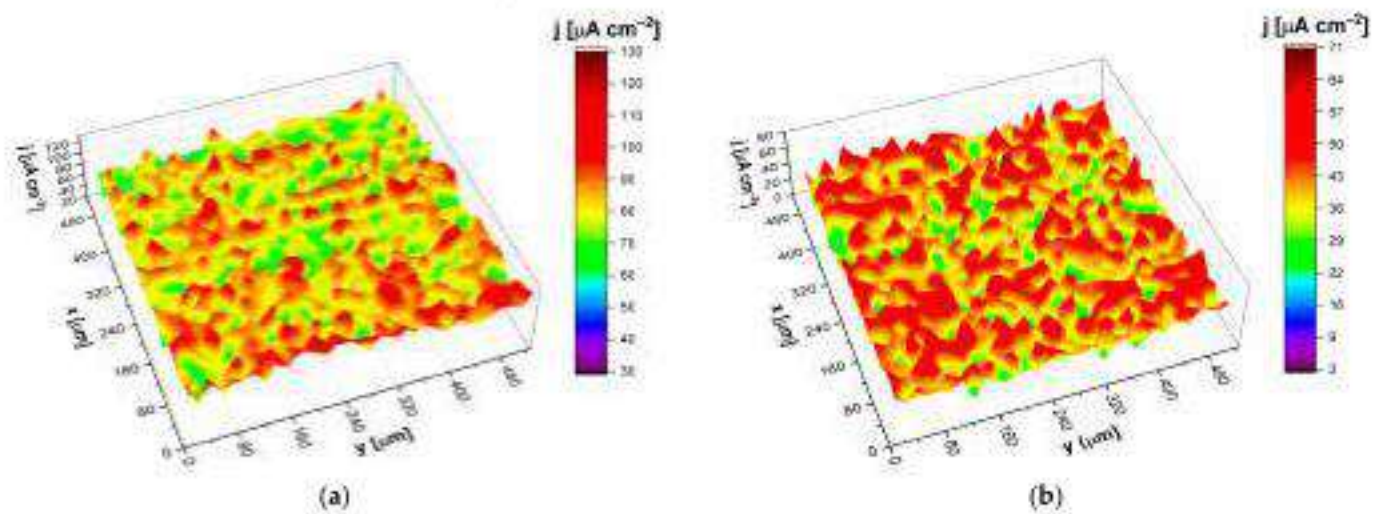


**Figure 8.** LEIS maps recorded at  $E_{OC}$  in saline solution at 37 °C for the Ti-13Zr-13Nb: (a)  $|Z|$  for the non-anodized alloy; (b)  $\varphi$  for the non-anodized alloy; (c)  $|Z|$  for the anodized alloy; (d)  $\varphi$  for the anodized alloy.

The scanning vibrating electrode (SVET) technique also known as scanning vibrating probe (SVP) technique was used to measure the localized current flowing in a saline electrolyte above the tested samples. Figure 9 presents distributions of local values of ion current density ( $j$ ) over the surface of the non-anodized and anodized Ti-13Zr-Nb alloy in a 0.9% NaCl solution.

The obtained SVET maps show that the average value  $j$  determined for the Ti-13Zr-Nb alloy in the initial state is about 2 times higher compared to the anodized sample. For the non-anodized Ti-13Zr-13Nb alloy, the average  $j$  is  $81 \mu\text{A cm}^{-2}$ , and for the Ti-13Zr-Nb substrate covered with a layer of 1G ONTs, it is  $41 \mu\text{A cm}^{-2}$ . The observed difference in the anodic current values indicates that the electrochemical oxidation process is faster/easier on the non-anodized surface of the Ti-13Zr-Nb alloy compared to the material on which the oxide layer has already been formed. It proves that it is easier to oxidize the fresh surface of the Ti-13Zr-Nb alloy than to thicken the already existing oxide layer. The average value of current density irregularities determined for the Ti-13Zr-Nb alloy before and after anodizing are about  $10 \mu\text{A cm}^{-2}$  and  $9 \mu\text{A cm}^{-2}$ , respectively. On this basis, it can be concluded that the surface of the Ti-13Zr-Nb alloy, both in the initial state and after

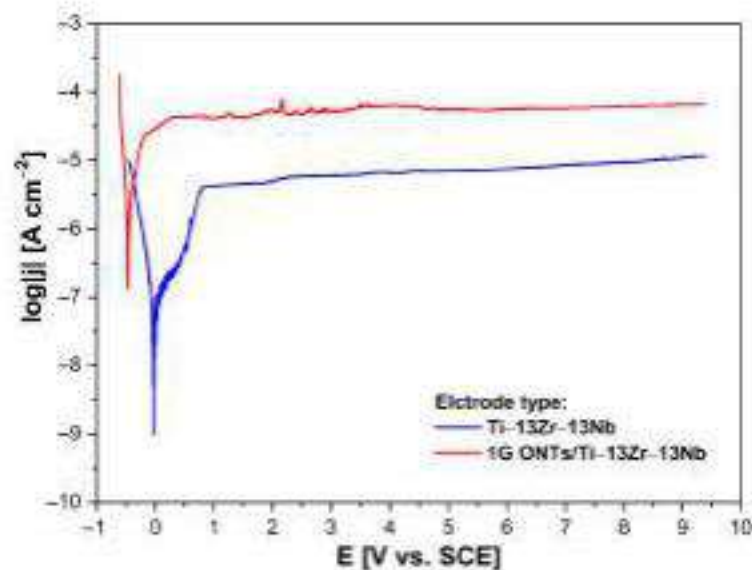
electrochemical oxidation, is characterized by a relatively homogeneous distribution of ion current density values.



**Figure 9.** Ion current density maps for the Ti-13Zr-13Nb alloy in saline solution at 37 °C: (a) Non-anodized; (b) Anodized. X and Y coordinates denote the length of the mapping in  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.5. Study of Anodic Polarization Curves on Susceptibility to Pitting Corrosion in Saline

The susceptibility of the Ti-13Zr-13Nb alloy without and with the 1G ONTs layer to pitting corrosion in the saline environment was determined on the basis of recording the anodic polarization curves obtained by the potentiodynamic method. A continuous change of the WE potential was recorded with the electrode polarization rate  $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$  with the simultaneous recording of the current flowing through the interface electrode | solution. The measurement was carried out from the potential 150 mV as more negative in relation to the  $E_{\text{OC}}$  towards the anodic potentials to the value of 9.4 V, recording the cathode–anode transition. Comparison of anodic polarization curves in the form of  $\log |j| = f(E)$  for the non-anodized and anodized Ti-13Zr-13Nb electrodes is shown in Figure 10.



**Figure 10.** Anodic polarization curves for the non-anodized and anodized Ti-13Zr-13Nb electrode in saline solution at 37 °C.

Based on the obtained potentiodynamic characteristics in a very wide range of potentials, a similar course for both tested electrodes and their passive anodic behavior can be

stated. However, one can observe that the formation of the 1G ONTs layer by anodizing of the Ti–13Zr–13Nb electrode causes the shift of the anodic polarization curve towards cathodic potentials. This is due to the decrease in the corrosion resistance of the porous 1G ONTs layer in comparison to the smooth and ultrathin oxide layer formed spontaneously on the surface of Ti–13Zr–13Nb. The lower passive current densities of the order of  $10^{-5} \text{ A cm}^{-2}$  were also observed for the non-anodized Ti–13Zr–13Nb electrode, which indicate the slower anodic dissolution according to Equation (6) in the case of the self-passive layer. Importantly, on both recorded anodic polarization curves, no increase in the measured passive current density is observed up to 9.4 V, which would be associated with the initiation of pitting corrosion in saline solution. Determination of the breakdown potential of the oxide layers on the Ti–13Zr–13Nb electrode above the applied anodic limit was impossible due to the limitations of the potentiostat and the stability of RE. The obtained anodic characteristics confirm the excellent corrosion resistance in vitro of both the non-anodized and anodized Ti–13Zr–13Nb electrodes in saline solution containing aggressive chloride ions, which is required for long-term implants.

#### 4. Conclusions

Based on the conducted studies using TEM and ATR-FTIR methods, it was found that the surface modification of the biomedical Ti–13Zr–13Nb alloy via anodizing in a 0.5% HF electrolyte at 20 V for 120 min allowed to produce nanotubular oxide layers.

The obtained 1G ONTs with a rutile structure have the average inner diameter of 70(8) nm, average outer diameter of 90(13) nm, and average length of 0.91(7)  $\mu\text{m}$ . EIS study of the anodized Ti–13Zr–13Nb electrode revealed the impedance behavior typical for titanium and its alloys covered with a porous oxide layer, which was confirmed by local corrosion resistance parameters obtained by LEIS and SVET methods. The slight decrease in corrosion resistance of the anodized Ti–13Zr–13Nb electrode in comparison with the self-passive Ti–13Zr–13Nb electrode was revealed. However, no susceptibility to pitting corrosion up to 9.4 V was found in potentiodynamic studies for both the non-anodized and anodized Ti–13Zr–13Nb electrode, confirming their excellent in vitro corrosion resistance in saline solution. Thanks to the ability to control the diameter and length of the nanotubes, the porous surface of the 1G ONTs layer can also be used as an intelligent drug carrier and accelerate the process of osseointegration.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.L.; methodology, B.L., A.S. and J.K.; software, B.L. and J.K.; validation, A.S., J.K., P.O. and M.Z.; formal analysis, A.S., J.K., P.O. and M.Z.; investigation, A.S., J.K., P.O. and M.Z.; resources, B.L.; data curation, A.S., J.K., P.O. and M.Z.; writing—original draft preparation, B.L., A.S., J.K. and P.O.; writing—review and editing, M.Z.; visualization, A.S., J.K. and P.O.; supervision, B.L.; project administration, B.L.; funding acquisition, B.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Jakubowicz, J. *Ti-Based Biomaterials: Synthesis, Properties and Applications*; MDPI AG: Basel, Switzerland, 2020. [CrossRef]
2. Anene, F.; Jaafar, C.A.; Zainol, I.; Hanim, M.A.; Suraya, M. Biomedical materials: A review of titanium based alloys. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part C J. Mech. Eng. Sci.* **2020**, *235*, 3792–3805. [CrossRef]
3. Losiewicz, B.; Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Stach, S. Effect of autoclaving time on corrosion resistance of sandblasted Ti G4 in artificial saliva. *Materials* **2020**, *13*, 4154. [CrossRef] [PubMed]
4. Aniolek, K.; Losiewicz, B.; Kubisztal, J.; Osak, P.; Stróż, A.; Barylski, A.; Kaptacz, S. Mechanical properties, corrosion resistance and bioactivity of oxide layers formed by isothermal oxidation of Ti-6Al-7Nb alloy. *Coatings* **2021**, *11*, 505. [CrossRef]

5. Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Ratajczak, P.; Losiewicz, B. Long-Term Assessment of the In Vitro Corrosion Resistance of Biomimetic ACP Coatings Electrodeposited from an Acetate Bath. *J. Funct. Biomater.* **2021**, *12*, 12. [[CrossRef](#)]
6. Dudek, K.; Dulski, M.; Losiewicz, B. Functionalization of the NiTi Shape Memory Alloy Surface by HAp/SiO<sub>2</sub>/Ag Hybrid Coatings Formed on SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> Glass Interlayer. *Materials* **2020**, *13*, 1648. [[CrossRef](#)]
7. Losiewicz, B.; Stróż, A.; Osak, P.; Maszybrocka, J.; Gerle, A.; Dudek, K.; Balin, K.; Lukowiec, D.; Gawlikowski, M.; Bogunia, S. Production, Characterization and Application of Oxide Nanotubes on Ti-6Al-7Nb Alloy as a Potential Drug Carrier. *Materials* **2021**, *14*, 6142. [[CrossRef](#)]
8. Costa, B.C.; Tokuhara, C.; Rocha, L.A.; Oliveira, R.C.; Lisboa-Filho, P.N.; Pessoa, J. Vanadium ionic species from degradation of Ti-6Al-4V metallic implants: In vitro cytotoxicity and speciation evaluation. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *96*, 730–739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ossowska, A.; Zieliński, A.; Supernak, M. Formation of High Corrosion Resistant Nanotubular Layers on Titanium Alloy Ti13Nb13Zr. *Solid State Phenom.* **2011**, *183*, 137–142. [[CrossRef](#)]
10. Smolka, A.; Dercz, G.; Rodak, K.; Losiewicz, B. Evaluation of corrosion resistance of nanotubular oxide layers on the Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution. *Arch. Metall. Mater.* **2015**, *60*, 2681–2686. [[CrossRef](#)]
11. Luz, A.R.; de Souza, G.B.; Lepienski, C.M.; Siqueira, C.J.M.; Kuromoto, N.K. Tribological properties of nanotubes grown on Ti-35Nb alloy by anodization. *Thin Solid Film.* **2018**, *660*, 529–537. [[CrossRef](#)]
12. Stróż, A.; Goryczka, T.; Losiewicz, B. Electrochemical formation of self-organized nanotubular oxide layers on niobium (Review). *Curr. Nanosci.* **2019**, *15*, 42–48. [[CrossRef](#)]
13. Schneider, S.G.; Nunes, C.A.; Rogero, S.P.; Higa, O.Z.; Bressiani, J.C. Mechanical properties and cytotoxic evaluation of the Ti-13Nb-13Zr alloy. *Biomecânica* **2000**, *8*, 84–87. [[CrossRef](#)]
14. Stróż, A.; Losiewicz, B.; Zubko, M.; Chmiela, B.; Balin, K.; Dercz, G.; Gawlikowski, M.; Goryczka, T. Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications. *Mater. Charact.* **2017**, *132*, 363–372. [[CrossRef](#)]
15. Stróż, A.; Dercz, G.; Chmiela, B.; Losiewicz, B. Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy with potential use as bone implant. *AIP Conf. Proc.* **2019**, *2083*, 030004. [[CrossRef](#)]
16. Smolka, A.; Rodak, K.; Dercz, G.; Dudek, K.; Losiewicz, B. Electrochemical Formation of Self-Organized Nanotubular Oxide Layers on Ti13Zr13Nb Alloy for Biomedical Applications. *Acta Phys. Pol.* **2014**, *125*, 932–935. [[CrossRef](#)]
17. Stróż, A.; Dercz, G.; Chmiela, B.; Stróż, D.; Losiewicz, B. Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for biomedical applications. *Acta Phys. Pol.* **2016**, *130*, 1079–1080. [[CrossRef](#)]
18. Losiewicz, B.; Skwarek, S.; Stróż, A.; Osak, P.; Dudek, K.; Kubisztal, J.; Maszybrocka, J. Production and Characterization of the Third-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Alloy. *Materials* **2022**, *15*, 2321. [[CrossRef](#)]
19. Lee, T. Variation in Mechanical Properties of Ti-13Nb-13Zr Depending on Annealing Temperature. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 7896. [[CrossRef](#)]
20. Davidson, J.A.; Kovacs, P. New Biocompatible, Low Modulus Titanium Alloy for Medical Implants. U.S. Patent No. 5,169,597, 8 December 1992.
21. Lee, M.; Kim, I.-S.; Moon, Y.H.; Yoon, H.S.; Park, C.H.; Lee, T. Kinetics of Capability Aging in Ti-13Nb-13Zr Alloy. *Crystals* **2020**, *10*, 693. [[CrossRef](#)]
22. Szklarska, M.; Dercz, G.; Simka, W.; Losiewicz, B. A.c. impedance study on the interfacial properties of passivated Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution. *Surf. Interface Anal.* **2014**, *46*, 698–701. [[CrossRef](#)]
23. Osak, P.; Maszybrocka, J.; Zubko, M.; Rak, J.; Bogunia, S.; Losiewicz, B. Influence of Sandblasting Process on Tribological Properties of Titanium Grade 4 in Artificial Saliva for Dentistry Applications. *Materials* **2021**, *14*, 7536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Losiewicz, B. Effect of amorphous calcium phosphate coatings on tribological properties of titanium grade 4 in protein-free artificial saliva. *Biotribology* **2022**, *32*, 100219. [[CrossRef](#)]
25. Stróż, A.; Maszybrocka, J.; Goryczka, T.; Dudek, K.; Osak, P.; Losiewicz, B. Influence of Anodizing Conditions on Biotribological and Micromechanical Properties of Ti-13Zr-13Nb Alloy. *Materials* **2023**, *16*, 1237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Stróż, A.; Luxbacher, T.; Dudek, K.; Chmiela, B.; Osak, P.; Losiewicz, B. In Vitro Bioelectrochemical Properties of Second-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Biomedical Alloy. *Materials* **2023**, *16*, 1408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Durdu, S.; Cihan, G.; Yalcin, E.; Altinkok, A. Characterization and mechanical properties of TiO<sub>2</sub> nanotubes formed on titanium by anodic oxidation. *Ceram. Int.* **2021**, *47*, 10972–10979. [[CrossRef](#)]
28. Ossowska, A.; Olive, J.-M.; Zielinski, A.; Wojtowicz, A. Effect of double thermal and electrochemical oxidation on titanium alloys for medical applications. *Appl. Surf. Sci.* **2021**, *563*, 150340. [[CrossRef](#)]
29. Ossowska, A.; Zieliński, A.; Olive, J.-M.; Wojtowicz, A.; Szwed, P. Influence of Two-Stage Anodization on Properties of the Oxide Coatings on the Ti-13Nb-13Zr Alloy. *Coatings* **2020**, *10*, 707. [[CrossRef](#)]
30. Handzlik, P.; Gutkowski, K. Synthesis of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy by the electrochemical method. *J. Porous Mater.* **2019**, *26*, 1631–1637. [[CrossRef](#)]
31. Stepień, M.; Handzlik, P.; Fitzner, K. Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on Ti6Al7Nb alloy and their interaction with the simulated body fluid. *J. Solid State Electrochem.* **2016**, *20*, 2651–2661. [[CrossRef](#)]
32. Wu, S.; Wang, S.; Liu, W.; Yu, X.; Wang, G.; Chang, Z.; Wen, D. Microstructure and properties of TiO<sub>2</sub> nanotube coatings on bone plate surface fabrication by anodic oxidation. *Surf. Coat. Technol.* **2019**, *374*, 362–373. [[CrossRef](#)]

33. Zhang, S.; Qin, J.; Yang, C.; Zhang, X.; Liu, R. Effect of Zr addition on the microstructure and tribological property of the anodization of Ti-6Al-4V alloy. *Surf. Coat. Technol.* **2018**, *356*, 38–48. [[CrossRef](#)]
34. Guntherschulze, A.; Betz, H. Neue Untersuchungen Über die elektrolytische Ventilwirkung: I. Die Oxydschicht des Tantals. *Z. Für Phys.* **1931**, *68*, 145–161. [[CrossRef](#)]
35. Kowalski, D.; Kim, D.; Schmuki, P. TiO<sub>2</sub> nanotubes, nanochannels and mesosponge: Self-organized formation and applications. *Nano Today* **2013**, *8*, 235–264. [[CrossRef](#)]
36. ASTM F1713-08(2021)e1; Standard Specification for Wrought Titanium-13Niobium-13Zirconium Alloy for Surgical Implant Applications (UNS R58130). ASTM: West Conshohocken, PA, USA, 2021.
37. Lassa, A. *Electrochemical Impedance Spectroscopy and Its Applications*; Springer Science + Business Media: New York, NY, USA, 2014; ISBN 978-1-4614-8932-0. [[CrossRef](#)]
38. *User Manual for Frequency Response Analysis (FRA) for Windows*, version 4.9; Eco Chemie, B.V.: Utrecht, The Netherlands, 2001.
39. Losiewicz, B.; Popczyk, M.; Szklarska, M.; Smolka, A.; Osak, P.; Budniok, A. Use of Scanning Vibrating Electrode Technique to Localized Corrosion Evaluation. *Solid State Phenom.* **2015**, *228*, 353–368. [[CrossRef](#)]
40. Losiewicz, B.; Popczyk, M.; Smolka, A.; Szklarska, M.; Osak, P.; Budniok, A. Localized Electrochemical Impedance Spectroscopy for Studying the Corrosion Processes in a Nanoscale. *Solid State Phenom.* **2015**, *228*, 383–393. [[CrossRef](#)]
41. Losiewicz, B.; Kubisztal, J. Effect of hydrogen electro sorption on corrosion resistance of Pd80Rh20 alloy in sulfuric acid: EIS and LEIS study. *Int. J. Hydrogen Energy* **2018**, *43*, 20004–20010. [[CrossRef](#)]
42. Pezhooli, N.; Rahimi, J.; Hasti, F.; Maleki, A. Synthesis and Evaluation of Composite TiO<sub>2</sub>@ZnO Quantum Dots on Hybrid Nanostructure Perovskite Solar Cell. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 9885. [[CrossRef](#)]
43. León, A.; Reuquen, P.; Garín, C.; Segura, R.; Vargas, P.; Zapata, P.; Orihuela, P.A. FTIR and Raman Characterization of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Coated with Polyethylene Glycol as Carrier for 2-Methoxyestradiol. *Appl. Sci.* **2017**, *7*, 49. [[CrossRef](#)]
44. Ghann, W.; Kang, H.; Sheikh, T.; Yadav, S.; Chavez-Gil, T.; Nesbitt, F.; Uddin, J. Fabrication, Optimization and Characterization of Natural Dye Sensitized Solar Cell. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41470. [[CrossRef](#)]
45. Al-Amin, M.; Dey, S.; Rashid, T.; Ashaduzzaman, M.; Shamsuddin, S. Solar Assisted Photocatalytic Degradation of Reactive Azo Dyes in Presence of Anatase Titanium Dioxide. *Int. J. Latest Res. Eng. Technol.* **2016**, *2*, 14–21.
46. Zhu, Y. Insight into the Structure and Formation of Titanium Oxide Nanotubes. *Funct. Mater. Lett.* **2008**, *1*, 239–246. [[CrossRef](#)]
47. Petrović, B.; Kisić, D.; Jokanović, B.; Rakočević, Z.; Nasov, I.; Trajkovska Petkoska, A.; Jokanović, V. Wetting Properties of 700 Titanium Oxides, Oxynitrides and Nitrides Obtained by DC and Pulsed Magnetron Sputtering and Cathodic Arc Evaporation. *Mater. Sci.-Pol.* **2019**, *37*, 173–181. [[CrossRef](#)]
48. Bard, A.J.; Faulkner, L.R. *Electrochemical Methods. In Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; Wiley: New York, NY, USA, 2001.
49. ASTM G102-89(2015)e1; Standard Practice for Calculation of Corrosion Rates and Related Information from Electrochemical Measurements, ASTM: West Conshohocken, PA, USA, 2015.
50. Pourbaix, M. *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions*, 2nd ed.; NACE International, National Association of Corrosion Engineers: Houston, TX, USA, 1974; ISBN 10: 0915567989.
51. Freitag, M.; Losiewicz, B.; Goryczka, T.; Lelátko, J. Application of EIS to study the corrosion resistance of passivated NiTi shape memory alloy in simulated body fluid. *Solid State Phenom.* **2012**, *183*, 57–64. [[CrossRef](#)]
52. Osak, P.; Losiewicz, B. EIS study on interfacial properties of passivated Nitinol orthodontic wire in saliva modified with 711 Eludril® Mouthwash. *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.* **2018**, *54*, 680–688. [[CrossRef](#)]
53. Brunette, D.M.; Tengvall, P.; Textor, M.; Thomsen, P. Titanium in Medicine. In *Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*; Springer: Berlin, Germany, 2001; pp. 145–162, ISBN 978-3-642-56486-4.

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

# Electrochemical Formation of Self-Organized Nanotubular Oxide Layers on Ti13Zr13Nb Alloy for Biomedical Applications

A. SMOŁKA<sup>a,\*</sup>, K. RODAK<sup>b</sup>, G. DERCZ<sup>a</sup>, K. DUDEK<sup>a</sup> AND B. ŁOSIEWICZ<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Materials Science, Silesian Interdisciplinary Centre for Education and Research  
University of Silesia, 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland

<sup>b</sup>Faculty of Chemistry, Silesian University of Technology, B. Krzywoustego 6, 44-100 Gliwice, Poland

<sup>c</sup>Faculty of Materials Engineering and Metallurgy, Z. Krasińskiego 8, 40-019 Katowice, Poland

In this work, the anodic formation of self-organized nanotubular oxide layers on Ti13Zr13Nb implant alloy was presented. Anodic oxidation was carried out at room temperature in [1 M] (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution with 1 wt% content of NH<sub>4</sub>F. The voltage and time of anodization was 20 V for 120 min, respectively. Under proposed conditions, the best arrangement of nanopores was observed. The physical and chemical properties of the anodized surface of the Ti13Zr13Nb alloy were characterized using grazing incidence X-ray diffraction, scanning transmission electron microscopy, and atomic force microscopy. It was found that diameter of nanopores varied from 10 to 32 nm. Mechanism of the fabrication of the unique 3D tube-shaped nanostructure of TiO<sub>2</sub> on the surface of the Ti13Zr13Nb alloy by electrochemical anodization, has been discussed.

DOI: [10.12693/APhysPolA.125.932](https://doi.org/10.12693/APhysPolA.125.932)

PACS: 87.85.jj, 81.07.De, 87.85.J–

## 1. Introduction

Implantable materials make critical contributions to modern medicine. The human body presents a very challenging environment for materials engineers because of the need for implants that are highly corrosion resistant, biocompatible, and able to bond to bone during osseointegration [1–5].

Metallic biomaterials have been in the past, and will continue to be in the future, used in implants spanning all areas of the use in the human body like orthopedic, spinal, dental, cardiovascular, neural, urological, and other applications [1]. Metallic biomaterials will remain central to such medical applications due to their unique properties compared to those of other groups of materials.

An active area of research in metallic biomaterials involves new titanium alloys, especially  $\beta$ -structure alloys which exhibit low elastic modulus, ability to utilize large oxygen additions without brittle failure, lower notch sensitivity in fatigue, and are able to work harden and cold from shapes. Unfortunately, in most used in medicine titanium alloys, the toxic elements, e.g. Ni, V or Al, are present and their release in the human body can lead to the Alzheimer disease, neuropathy, metalosis or allergic reactions. Therefore, in recent years more biocompatible elements like Ta, Nb, Zr, Sn or Pd, which for example play a role of  $\beta$  structure stabilizer in titanium, were started to be applied. To eliminate these health problems, an alternative, multifunctional and biocom-

patible titanium alloy, Ti13Zr13Nb, has been developed, which is based only on non-toxic elements. This alloy exhibits optimal mechanical and plastic properties as well as high corrosion resistance and biocompatibility resulting from the spontaneous formation of the passive oxide layer TiO<sub>2</sub> and small amount of Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and ZrO<sub>2</sub> on the surface [1–3, 6].

Recently, anodizing is a developed method of the surface modification of titanium and its alloys. Anodizing process carried out under specified conditions (voltage, electrolyte type and pH, time path) results in formation of nanostructures on the surface [4, 5]. It has been reported that the presence of nanotubes on the surface of titanium and its alloys improves the adhesion and proliferation of cells for medical application [7]. The structure of nanotubes allow to use them in targeted drug delivery systems or to encapsulate proteins and enzymes.

The aim of the present study is to investigate the self-organized formation of nanotubular oxide layers by anodizing of the Ti13Zr13Nb implant alloy in the electrolyte based on ammonia sulfate with fluorine-ion addition.

## 2. Experimental

The tested samples of the Ti13Zr13Nb alloy with dimension of  $7 \times 4 \times 0.8$  mm<sup>3</sup> were cut from flat bars. Composition of the Ti13Zr13Nb alloy is given in wt%. The samples were ground with 600# grit silicon carbide paper, sonicated for 20 min using nanopure water (Milli-Q, 18.2 M $\Omega$  cm<sup>2</sup>, < 2 ppb total organic carbon), and then electropolished. The bath composition and time used for electropolishing procedure are described in Ref. [7]. Electropolishing was carried out at a current density of 1.4 A cm<sup>-2</sup> for 4.4 min. Next, the samples were cleaned in ultrasonic bath in nanopure water. Anodic oxidation

\*corresponding author; e-mail: [agnieszka.smolka@us.edu.pl](mailto:agnieszka.smolka@us.edu.pl),  
[bozena.losiewicz@us.edu.pl](mailto:bozena.losiewicz@us.edu.pl)

was performed at room temperature in [1 M]  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution with 1 wt% content of  $\text{NH}_4\text{F}$ . Value of pH solution was 6.3. The time and voltage of anodization was 120 min and 20 V, respectively. The two-electrode electrochemical cell was used with a working electrode (anode) made of the Ti13Zr13Nb alloy and a platinum foil (cathode) as a counter electrode. The distance between cathode and anode was 25 mm. The sample under investigation was placed inside a self-designed Teflon holder which contained O-ring. The exposed surface area of the electrode was  $0.64 \text{ cm}^2$ . Anodization process was carried out using a MAG-5N galvanizing aggregate.

The morphology and structure of the formed nanotubular oxide layers was examined using a HITACHI HD-2300A scanning transmission electron microscopy (STEM) and the grazing incidence X-ray diffraction (GIXD) on the X'Pert Philips PW 3040/60 diffractometer operating at 30 mA and 40 kV, which was equipped with a vertical goniometer and an Eulerian cradle, respectively. The wavelength of radiation ( $\lambda \text{ Cu } K_\alpha$ ) was  $1.54178 \text{ \AA}$ . The GIXD patterns were registered in the  $2\theta$  range from  $10$  to  $50^\circ$  with a  $0.05^\circ$  step for the incident  $0.25^\circ$ ,  $0.50^\circ$ ,  $1.00^\circ$  angle. The chemical composition of the alloy was analyzed by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The QScope<sup>TM</sup> 250 atomic force microscope (AFM) (Quesant Instrument Corporation, Agoura Hills, CA) integrated into the Hysitron TI 950 TriboIndenter, was used to study the topography and roughness of the surface.

### 3. Results and discussion

Figure 1 shows STEM images of the surface morphology of the Ti13Zr13Nb alloy after anodization carried out under optimal electrochemical conditions at 20 V for 120 min in [1 M]  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution with the content of 1 wt%  $\text{NH}_4\text{F}$ . One can see in the top view of  $\text{TiO}_2$  nanotube layer formed on the Ti13Zr13Nb alloy (Fig. 1a) that the addition of  $\text{NH}_4\text{F}$  influences the dissolution of parts of the oxide layer in which nanotubular structures are formed. Typical, broad cracks of the  $\text{TiO}_2$  layer are visible at low magnification [1, 9]. Figure 1b presents the characteristic image at high magnification of the top view of nanotubes formed by anodization on Ti13Zr13Nb alloy. A uniform distribution of the single-walled  $\text{TiO}_2$  nanotubes is visible. A chosen area for estimation of the nanotube diameter shows that by anodizing of the Ti13Zr13Nb alloy under proposed conditions, the single-walled  $\text{TiO}_2$  nanotubes with internal diameter in the range from 12 to 32 nm, can be formed (Fig. 1c).

EDS analysis revealed the presence of peaks originating from the substrate, such as Ti, Zr and Nb (Fig. 2). The obtained results confirm the chemical composition of the alloy under investigation. The oxygen peak in the spectrum indicates that the oxide layer on the Ti13Zr13Nb alloy surface is present.

Figure 3 shows the GIXD pattern of the Ti13Zr13Nb alloy after anodization at 20 V for 120 min. Presence of titanium oxide ( $\text{TiO}_2$  rutile, ICDD PDF 00-034-0180) was confirmed using the GIXD technique. Additionally,

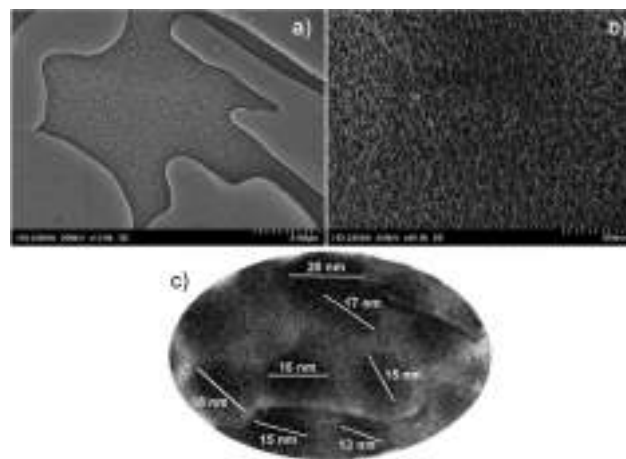


Fig. 1. STEM image of the surface morphology of  $\text{TiO}_2$  nanotube layer formed on the Ti13Zr13Nb alloy: (a) top view at high magnification, (b) top view at low magnification, and (c) chosen area for estimation of the nanotube diameter.

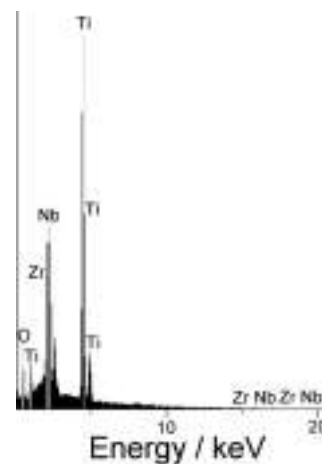


Fig. 2. EDS analysis of the Ti13Zr13Nb alloy after anodization at 20 V for 120 min.

the phase analysis revealed the presence of two phases from substrate:  $\alpha$ -Ti (ICDD PDF 00-044-1294) and  $\beta$ -Ti (ICDD PDF 01-089-3726).

A typical AFM image of the surface of the Ti13Zr13Nb alloy before anodization in 2D (Fig. 4a) and 3D (Fig. 4b) view is presented. The determined mean roughness index,  $R_a$ , of the tested surface equals 4.3 nm, indicating very smooth surface morphology. After anodization of the Ti13Zr13Nb alloy in the appropriate conditions, the surface development has changed (Fig. 5a and b). The surface roughness significantly increased and  $R_a = 92.9 \text{ nm}$ . The obtained results point that anodizing of the tested alloy caused the increase in surface roughness more than 20 times as compared to the Ti13Zr13Nb alloy before formation of  $\text{TiO}_2$  nanotubes.

Based on the obtained results, the mechanism of  $\text{TiO}_2$  nanotubes formation on the Ti13Zr13Nb alloy in the electrolyte based on ammonia sulfate with fluoride-ion addi-

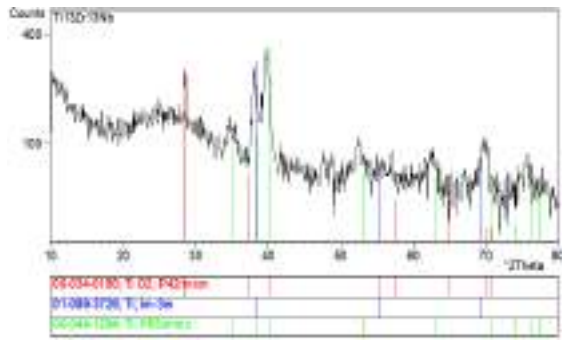


Fig. 3. GIXD pattern of the Ti13Zr13Nb alloy after anodization at a 20 V for 120 min.

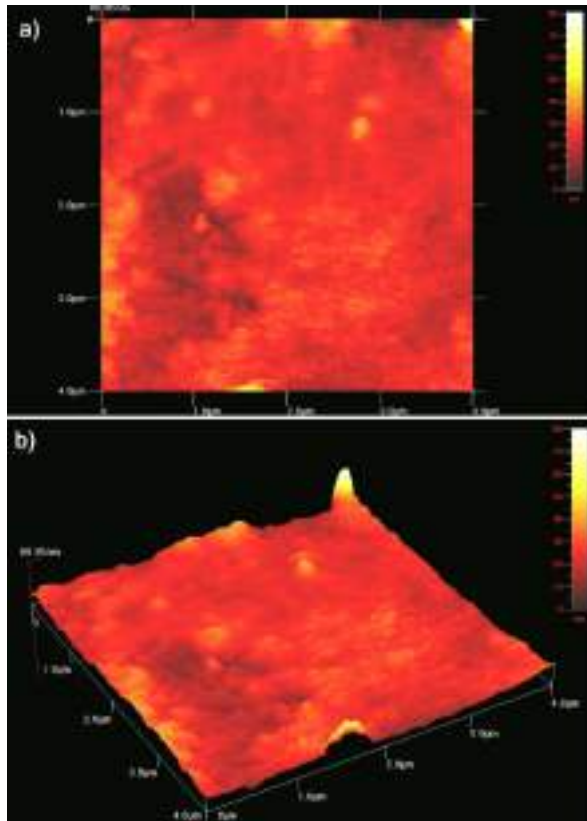


Fig. 4. The AFM image of the surface of the Ti13Zr13Nb alloy before anodization: (a) 2D, and (b) 3D view.

tion, was presented schematically in Fig. 6. In accordance with the literature data concerning formation of self-organized nanotubular oxide layer on Ti [1, 9, 10], in case of the Ti13Zr13Nb alloy anodization also three simultaneous processes have to be considered. This is the field assisted oxidation of Ti metal to form TiO<sub>2</sub>, the field assisted dissolution of Ti metal ions in the electrolyte, and the chemical dissolution of Ti and TiO<sub>2</sub> due to etching by fluorine ions, which is enhanced by the presence of H<sup>+</sup> ions. It should be noted that self-organized

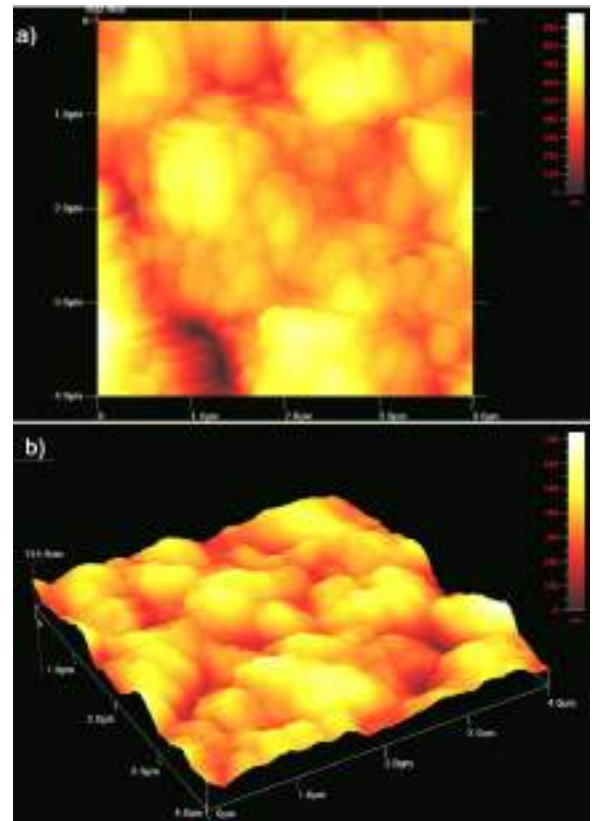


Fig. 5. The AFM image of the Ti13Zr13Nb alloy after anodization at a 20 V for 120 min: (a) 2D, and (b) 3D view.

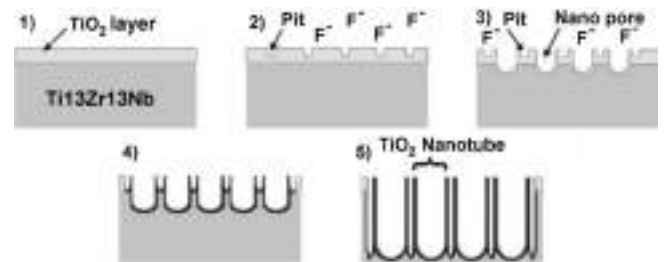
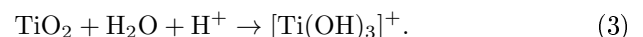
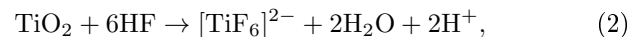
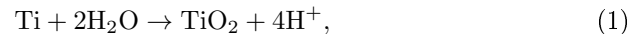


Fig. 6. Scheme of the TiO<sub>2</sub> nanotube formation on the surface of the Ti13Zr13Nb alloy, inspired by Fig. 1 from Ref. [9].

TiO<sub>2</sub> nanotubes are not formed on the pure surface of the Ti13Zr13Nb alloy but on the thin TiO<sub>2</sub> oxide layer naturally present on the alloy surface. Therefore, the mechanism of TiO<sub>2</sub> nanotubes formation is related to the kinetics of two processes: oxidation (1) and dissolution (2), (3):



The phenomena of anodic formation of nanotubular oxide layers on pure Zr and Nb was also observed in the literature [1, 9, 10], however, in case of the Ti13Zr13Nb alloy, the oxide layer is revealed by XRD as rutile. In



Fig. 3 one can also observe amorphous halo which can be related to the presence of other amorphous oxides on the alloy surface, undetectable by XRD [8]. For a description of the formation of  $\text{TiO}_2$  nanotubes by anodization process displayed in Fig. 6, the anodization mechanism of creating the nanotube structure is divided into five steps: 1 — before anodization, a nanoscale  $\text{TiO}_2$  passive layer is present on the Ti13Zr13Nb alloy surface, 2 — when constant voltage is applied, a pit is formed on the  $\text{TiO}_2$  layer, 3 — as anodization time increases, the pit grows longer and larger, and then it becomes a nanopore, 4 — nanopores and small pits undergo continuous barrier layer formation, and 5 — after specific anodization time, completely developed nanotubes are formed on the Ti13Zr13Nb surface.

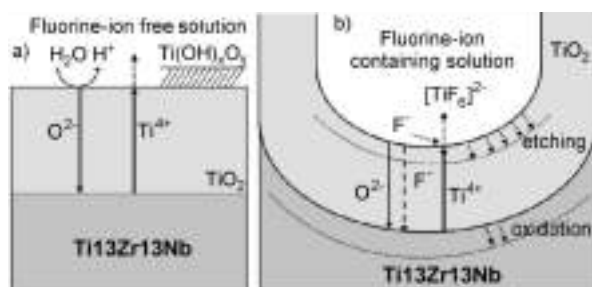


Fig. 7. Anodization scheme of the Ti13Zr13Nb alloy: (a) in the absence, and (b) in the presence, of fluorine anions, inspired by Fig. 1 from Ref. [10].

The nanotubular structure formation depends on the anodization conditions and especially on the concentration of fluorine ions in the solution. It is well known that with the increase in the applied voltage, larger diameter nanotubes can be formed. This aspect of diameter manipulation using applied voltage was widely discussed in Refs. [9] and [10]. Anodization scheme of the Ti13Zr13Nb alloy in the absence and in the presence of fluorine anions, is shown in Figs. 7a and b, respectively. Reaction (1) describes the Ti oxide growth on the anodized surface of the Ti13Zr13Nb alloy in the absence of fluorine anions in solution (Fig. 7a). Oxidized Ti species react with  $\text{O}^{2-}$  ions coming from dissolution of water particle and form the oxide layer. Next, the oxide growth takes place and this process is controlled by field-aided ion transport of  $\text{O}^{2-}$  and  $\text{Ti}^{4+}$  through the growing oxide. This layer is typically loose and porous.

In the presence of fluorine ions (Fig. 7b), according to reaction (2), water-soluble  $\text{TiF}_6^{2-}$  complexes are formed. Due to the small ionic radius,  $\text{F}^-$  ions can enter the growing  $\text{TiO}_2$  lattice and to be transported through the oxide by the applied field. According to reaction (3), the complex formation ability leads to a permanent chemical dissolution of formed titanium dioxide and prevents  $\text{Ti}(\text{OH})_x\text{O}_y$  precipitation as  $\text{Ti}^{4+}$  ions arriving at the oxide solution interface can be solvated to  $\text{TiF}_6^{2-}$  before reacting to a precipitate  $\text{Ti}(\text{OH})_x\text{O}_y$  layer [10].

## 4. Conclusions

The obtained results of EDS, STEM, GIXD and AFM studies confirmed the possibility of electrochemical formation of self-organized nanotubular oxide layers on Ti13Zr13Nb implant alloy under proposed conditions. The result of the anodization carried out in [1 M]  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution with 1 wt% content of  $\text{NH}_4\text{F}$  at room temperature at 20 V for 120 min, was formation of  $\text{TiO}_2$  (rutile) nanotubes. The diameter that can be obtained ranged from 10 to 32 nm. The mechanism of the  $\text{TiO}_2$  nanotubes formation is based on the field assisted oxidation of Ti metal to form  $\text{TiO}_2$ , the field assisted dissolution of Ti metal ions in the electrolyte, and the chemical dissolution of Ti and  $\text{TiO}_2$  due to etching by fluorine ions, which is enhanced by the presence of  $\text{H}^+$ . The obtained results suggest that the proposed method of surface modification is promising for better osseointegration of the Ti13Zr13Nb implant alloy.

## Acknowledgments

Dr. Wojciech Simka, Silesian University of Technology, Poland, is gratefully acknowledged for supplying Ti13Zr13Nb alloy and helpful discussion. This work was sponsored from the scholarship program DoktoRIS (No. Application 200398).

## References

- [1] *Comprehensive Biomaterials*, Eds. P. Ducheyne, K.E. Healy, D.W. Hutmacher, D.W. Grainger, C.J. Kirkpatrick, Elsevier Sci., Amsterdam 2011.
- [2] W. Yu, J. Qiu, L. Xu, *Biomed. Mater.* **4**, 065012 (2009).
- [3] Z. Xu, Q. Li, *J. Mater. Sci. Technol.* **28**, 865 (2012).
- [4] S. Bai, D. Ding, C. Ning, R. Qin, L. Huang, *Electrochem. Commun.* **12**, 152 (2010).
- [5] C.E.B. Marino, L.H. Mascaro, *J. Electroanal. Chem.* **568**, 115 (2004).
- [6] B. Łosiewicz, G. Dercz, M. Szklarska, W. Simka, M. Łęźniak, A. Krzakała, A. Swinarew, *Solid State Phenom.* **203-204**, 212 (2013).
- [7] J.R. Davies, in: *Handbook of Materials for Medical Devices*, Ed. J.R. Davies, ASM International, Ann Arbor 2003, p. 193.
- [8] W. Simka, M. Mosialek, G. Nawrat, P. Nowak, J. Żak, J. Szade, A. Winiarski, A. Maciej, L. Szyk-Warszyńska, *Surf. Coat. Technol.* **213**, 239 (2012).
- [9] K.S. Brammer, S. Oh, C.J. Frandsen, S. Jin, in: *Biomaterials Science and Engineering*, Ed. R. Pignatello, InTech, Rijeka 2011.
- [10] J.M. Macak, H. Tsuchiya, A. Ghicov, K. Yasuda, R. Hahn, S. Bauer, P. Schmuki, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **11**, 3 (2007).

A. SMOLKA\*#, G. DERCZ\*, K. RODAK\*\*, B. ŁOSIEWICZ\*\*

**Evaluation of corrosion resistance of nanotubular oxide layers on the Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution**

**OCENA ODPORNOŚCI KOROZYJNEJ NANOTUBULARNYCH STRUKTUR TLENKOWYCH NA STOPIE Ti13Zr13Nb W ŚRODOWISKU PŁYNÓW USTROJOWYCH\***

Evaluation of corrosion resistance of the self-organized nanotubular oxide layers on the Ti13Zr13Nb alloy, has been carried out in 0.9% NaCl solution at the temperature of 37°C. Anodization process of the tested alloy was conducted in a solution of 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with the addition of 1 wt.% NH<sub>4</sub>F. The self-organized nanotubular oxide layers were obtained at the voltage of 20 V for the anodization time of 120 min. Investigations of surface morphology by scanning transmission electron microscopy (STEM) revealed that as a result of the anodization under proposed conditions, the single-walled nanotubes (SWNTs) can be formed of diameters that range from 10 to 32 nm. Corrosion resistance studies of the obtained nanotubular oxide layers and pure Ti13Zr13Nb alloy were carried out using open circuit potential, anodic polarization curves, and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) methods. It was found that surface modification by electrochemical formation of the self-organized nanotubular oxide layers increases the corrosion resistance of the Ti13Zr13Nb alloy in comparison with pure alloy.

*Keywords:* anodization, corrosion resistance, self-organized nanotubes, Ti13Zr13Nb implant alloy

Przeprowadzono badania oceny odporności korozyjnej nanotubularnych struktur tlenkowych na stopie Ti13Zr13Nb w środowisku płynów ustrojowych. Określono wpływ obecności nanotubularnych struktur tlenkowych na zmianę odporności korozyjnej stopu Ti13Zr13Nb. Proces anodowania elektrochemicznego prowadzono w roztworze 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> z 1 % dodatkiem NH<sub>4</sub>F. Samoorganizujące się warstwy nanorurek otrzymano przy napięciu 20 V i czasie anodowania 120 min. Badania morfologii powierzchni metodą skaningowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej ujawniły, że w wyniku anodowania w zaproponowanych warunkach można otrzymać nanorurki o średnicy mieszczącej się w zakresie od 10 do 32 nm. Badania odporności korozyjnej nanotubularnych warstw tlenkowych oraz czystego stopu Ti13Zr13Nb przeprowadzono w 0,9 % roztworze soli fizjologicznej NaCl w temperaturze 37°C z wykorzystaniem metody potencjału obwodu otwartego, krzywych polaryzacji anodowej oraz elektrochemicznej spektroskopii impedancji. Wykazano, iż modyfikacja powierzchni za pomocą formowania nanotubularnych struktur tlenkowych zwiększa odporność korozyjną stopu Ti13Zr13Nb w porównaniu do czystego stopu.

**1. Introduction**

The global growth in the world population age is reflected in the increase in implant surgery performed. Implant having to find the human body must satisfy two main functions, namely, biocompatibility and biofunctionality [1]. Currently, there is a wide range of metallic biomaterials used as implants [1-7]. The titanium and its alloys are the most commonly used implant materials in medicine since the early 60s of the twentieth century [2, 4]. Their popularity is due to good biomechanical properties, high biocompatibility and excellent corrosion resistance in comparison with other metallic biomaterials such as 316L steel and Co-Cr alloys [3, 4]. In order to increase both the biological activity of titanium and its

alloys, and the growth of osseous tissue, various modifications of the surface layer have been applied [2, 3, 7]. Electrochemical surface modification of titanium and its alloys is associated with occurring thin (2-5 nm) oxide layer of TiO<sub>2</sub> which is formed spontaneously as a result of exposure of titanium and its alloys on air. The oxide layer with strong barrier properties protects titanium surface against corrosion. One of the recently developed methods is an electrochemical formation of the self-organized nanotubular oxide layers on the surface of titanium and its alloys by anodization. Formation of the nanotubular oxide layers on the surface of titanium biomaterials has a purpose to enhance the osseointegration between a titanium implant surface and a living bone tissue. The element of titanium implant placed in the bone has a surface on which cell

\* UNIVERSITY OF SILESIA, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE, SILESIAN INTERDISCIPLINARY CENTRE FOR EDUCATION AND RESEARCH, 75 PUŁKU PIECHOTY 1A, 41-500 CHORZÓW, POLAND

\*\* SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS ENGINEERING AND METALLURGY, 8 KRASIŃSKIEGO STR., 40-019 KATOWICE, POLAND

# Corresponding author: agnieszka.smolka@us.edu.pl

and tissue healing reactions can occur. These reactions may be identical, but not in each case must be. The nanotubular oxide layers may act as micro- or nanosyringes saturated with microbicides or therapeutic agents, and enable their controlled release into the body with a determined rate which is dependent on the geometry of the pores, thus contributing to the reduction of adverse reactions after implantation. The presence of the nanotubes on the implant surface also contributes to growth of the corrosion resistance of the biomaterial in the environment of simulated body fluids (SBFs) what has been reported in the literature [5-7].

The aim of this study was to obtain the self-organized nanotubular oxide structures on the Ti13Zr13Nb implant alloy by anodization method, and to determine their effect on the corrosion resistance of the Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution (PSS).

## 2. Material and research methods

The investigated material was the Ti13wt.%Zr13wt.%Nb alloy. The samples with dimensions of 7.0 x 4.0 x 0.8 mm were cut from flat bars, and mechanically polished before anodization using abrasive papers (Buehler, P 600, P 1200 and P 3000, SiC). Then, they were sonicated for 20 min in ultrapure water (Millipore, resistivity of 18.2 MW cm, < 2 ppb total organic carbon).

The anodization process was carried out in a solution of 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with 1 wt.% of NH<sub>4</sub>F addition (pH=5) for 120 min at a voltage of 20 V. The formation process of the nanotubular oxide structures was carried out by means of a MAG-5N galvanizing aggregate in the two-electrode system consisting of the working electrode which was the tested sample, and the counter electrode in the form of a platinum foil being spaced from the working electrode for a distance of 25 mm.

The corrosion resistance of the obtained nanotubular oxide structures and comparatively the Ti13Zr13Nb alloy before anodization, was determined in PSS of 0.9% NaCl solution at the temperature of 37 ± 2° C using the method of open-circuit potential (OCP), polarization curves and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). In order to ensure an inert atmosphere in the electrochemical cell during the measurements, over the electrolyte surface a constant flow of Ar (99.999% purity) was maintained. In the corrosion investigations, a three-electrode electrochemical cell was used. The working electrode was made of the Ti13Zr13Nb alloy before and after anodization. One side of the sample with the geometric surface area of 0.28 cm<sup>2</sup> was exposed to corrosive medium, the other side was insulated with epoxy resin which has not been in the reaction with the electrolyte. The counter electrode was the platinum foil with the geometric surface area of 2 cm<sup>2</sup>. All values of the potentials were measured in relation to the saturated calomel electrode (SCE). Electrochemical measurements were carried out using a computer-controlled Metrohm/Eco Chemie Autolab PGSTAT30 Potentiostat/Galvanostat Electrochemical System. The corrosion tests included the measurements of the open circuit potential, E<sub>OC</sub>, for 2 h, after which the anodic polarization curves were recorded in the potential range of ± 50 mV versus the stable

E<sub>OC</sub> value at a rate of the electrode polarization of v = 1 mV s<sup>-1</sup>. The obtained polarization curves were subjected to the Tafel extrapolation in order to determine the following corrosion resistance parameters: corrosion potential, E<sub>cor</sub>, corrosion current density, j<sub>cor</sub>, polarization resistance, R<sub>p</sub>, cathodic, b<sub>c</sub>, and anodic, b<sub>a</sub>, Tafel coefficient, respectively, as well as corrosion rate, Cr, at E<sub>cor</sub> given in mm per year. Calculations were performed according to the standard ASTM G 102-89 [128]. Based on the obtained polarization curves showing the relationship log j = f(E) and using the Tafel extrapolation method, the parameters of the corrosion resistance were determined. The EIS measurements were carried out potentiostatically at a corrosion potential, E<sub>cor</sub>, determined based on the Tafel extrapolation. Ac impedance spectra were registered in the frequency range of 20 kHz - 1 mHz using 10 frequencies per decade and an excitation signal in the form of a sine wave with an amplitude of 10 mV. The experimental EIS data were analyzed based on the equivalent electrical analogs by means of the EQUIVCRT program [9] and using the non-linear least squares (NLS) method with modulus weighting. The equivalent circuits were defined using circuit description code given by Boukamp [10, 11]. The experimental ac impedance results were presented as symbols in the form of the Nyquist diagram (also known under the name of a complex plane impedance plot) which is the well-known and generally accepted way of EIS data presentation [12]. It is characterized by the real component of the impedance, Z', on the axis of abscissae, and the imaginary component of the impedance, Z'', on the axis of ordinates. All graphs were created based on the function of Z'' = f(Z'). The experimental impedance spectra for the Ti13Zr13Nb alloy before anodization were approximated using an equivalent electrical circuit (EEC) which slightly differs from the classical Randle's EEC [12]. The obtained results were used for a comparative assessment of the corrosion resistance of the Ti13Zr13Nb before and after anodization.

The morphology of the formed nanotubular oxide layers was examined by scanning transmission electron microscopy (STEM) and scanning electron microscopy (SEM) using a HITACHI HD-2300A and a JEOL JSM-6480 microscope, respectively. The structure was studied by the grazing incidence X-ray diffraction (GIXD) using a X'Pert Philips PW 3040/60 diffractometer operating at 30 mA and 40 kV, which was equipped with a vertical goniometer and an Eulerian cradle. The wavelength of radiation (λCuKα) was 1.54178 Å. The GIXD patterns were registered in the 2θ range from 10 to 50° with a 0.05° step for the incident 0.25°, 0.50°, 1.00° angle.

## 3. results and discussion

A STEM microphotograph of the Ti13Zr13Nb alloy surface after anodization process carried out at a potential of 20 V for 120 min in 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with 1 wt.% of NH<sub>4</sub>F addition is shown in Fig. 1. One can observe characteristic cracks and narrow crevices on the alloy surface which are caused by dissolution of the oxide layer formed in the initial phase of oxidation. The obtained barrier layer of the oxides on the alloy surface due to tight adherence to the substrate and low conduction may influence the reduction of the corrosion rate of

the tested biomaterial. In the cracks and crevices, the oxide layer dissolution proceeded, and initially pores and finally the self-organized nanotubular oxide layers, were formed. The detailed mechanism of the multistep formation of the titanium oxide single-walled nanotubes (SWNTs) on the Ti13Zr13Nb alloy as well as their physico-chemical characteristics were shown in our earlier work [13]. The anodization process of the Ti13Zr13Nb alloy under proposed conditions allowed to obtain the TiO<sub>2</sub> SWNTs with an internal diameter in the range from 12 to 32 nm.

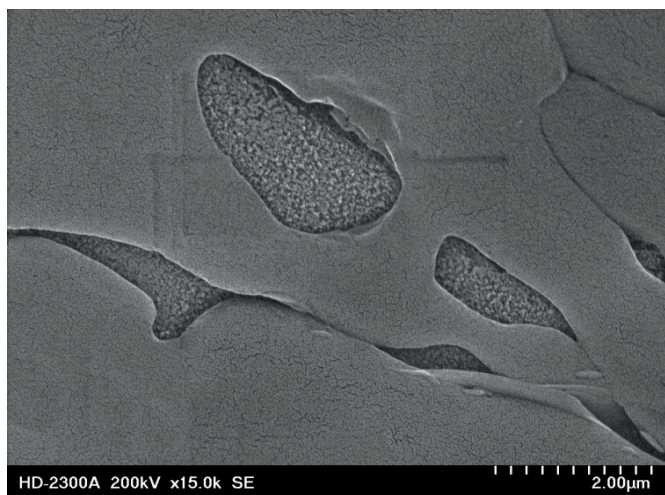


Fig. 1. STEM microphotograph (top view) showing the surface morphology of the Ti13Zr13Nb alloy with the TiO<sub>2</sub> SWNTs produced in the cracks and crevices

The phase analysis of the substrate, Ti13Zr13Nb alloy, showed two phases:  $\alpha$ -Ti (ICDD PDF 03-065-3362) and  $\beta$ -Ti (ICDD PDF 01-089-4913). The presence of titanium oxide (TiO<sub>2</sub> rutile, ICDD PDF 00-034-0180) on the surface of the Ti13Zr13Nb alloy after anodization at 20 V for 120 min, was confirmed using the GIXD technique in the previous work [13].

The potentiodynamic curves of  $\log j = f(E)$  registered in PSS in the narrow range of potentials for the Ti13Zr13Nb alloy before and after anodic oxidation are presented in Fig. 2. The equivalent weight, EW, for the Ti13Zr13Nb alloy of 12.5 was applied. The thermodynamically stable forms of Ti<sup>4+</sup>, Zr<sup>2+</sup> and Nb<sup>5+</sup> under experimental conditions were estimated based on the Pourbaix diagram for Ti-H<sub>2</sub>O, Zr-H<sub>2</sub>O and Nb-H<sub>2</sub>O system, respectively [14]. The alloy density of  $d = 4.66 \text{ gcm}^{-3}$  was used in calculations [15]. Summary of the determined parameters with their standard deviations is presented in Table 1.

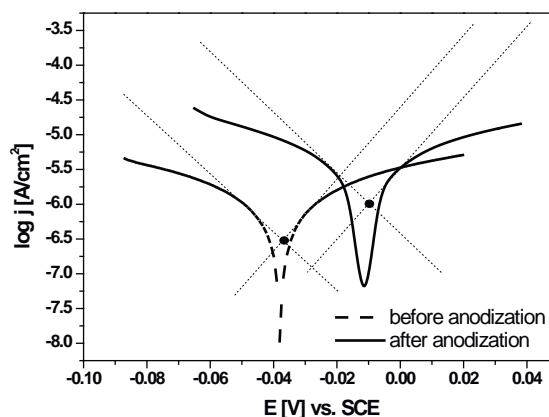


Fig. 2. The potentiodynamic curves of  $\log j = f(E)$  registered in PSS of 0.9% NaCl at 37°C for the Ti13Zr13Nb alloy before (dashed line) and after (straight line) anodic oxidation

$E_{\text{cor}}$  and  $j_{\text{cor}}$  values were precisely determined at the intersection of the extrapolated Tafel lines for anodic and cathodic branches (Fig. 2). One can see that for the electrode after anodization process,  $E_{\text{cor}}$  is slightly shifted towards noble potentials and an increase in  $j_{\text{cor}}$  value is observed as compared with the corresponding parameters determined for the unmodified electrode. Such a character of changes in electrochemical corrosion behavior of the Ti13Zr13Nb electrode is connected with the presence of the nanotubular oxide layer on the electrode surface. The value of  $E_{\text{cor}} = -0.011 \pm 0.002 \text{ V}$  points that corrosion process will start later on the electrode after anodization. The value of  $j_{\text{cor}}$  is proportional to the corrosion rate. It can be also supposed that the thicker oxide layer, the higher corrosion current density value is registered as in that case of the obtained nanotubular oxide layer. For the Ti13Zr13Nb electrode before anodization, the value of  $b_c$  and  $b_a$  Tafel coefficient was  $0.018 \pm 0.004$  and  $0.012 \pm 0.002 \text{ V dec}^{-1}$ , respectively, while for the electrode after anodization  $b_c = 0.017 \pm 0.003 \text{ V dec}^{-1}$  and  $b_a = 0.014 \pm 0.003 \text{ V dec}^{-1}$  (Table 1). Based on the slopes of the Tafel lines shown in Fig. 2 as dotted lines, it can be expected that in both considered cases the rate of cathodic processes will be faster than the reaction of oxidation. The cathodic process proceeding in PSS can be the reduction of hydrogen ions according to the following equation:

TABLE 1  
The corrosion resistance parameters determined by the Tafel extrapolation method in PSS of 0.9% NaCl at 37°C for the Ti13Zr13Nb alloy before and after anodic oxidation

Ti13Zr13Nb alloy	$E_{\text{cor}}$ [V]	$j_{\text{cor}}$ [A cm <sup>-2</sup> ]	$R_p$ [Ω cm <sup>2</sup> ]	$b_c$ [V dec <sup>-1</sup> ]	$b_a$ [V dec <sup>-1</sup> ]	CR at $E_{\text{cor}}$ [mm yr <sup>-1</sup> ]
Before anodization	-0.038 ±0.008	$3.31 \cdot 10^{-7}$ ± $6.62 \cdot 10^{-8}$	460 ±92	0.018 ±0.004	0.012 ±0.002	0.003 ±0.001
After anodization	-0.011 ±0.002	$1.11 \cdot 10^{-6}$ ± $2.22 \cdot 10^{-7}$	145 ±29	0.017 ±0.003	0.014 ±0.003	0.010 ±0.002



The occurring anodic process is the reaction of dissolution of the alloy component. The  $b_c$  and  $b_a$  Tafel coefficients obtained for the Ti13Zr13Nb electrode before and after anodization have similar values within the calculated error range. The lower value of  $R_p$  and the higher corrosion rate at  $E_{cor}$  for the anodized electrode can be explained by the presence of porous nanotubular structure. Inside pores on the surface, the corrosion process will proceed faster due to a local change of solution pH, however, the barrier oxide layer tightly adherent to the substrate assures enough corrosion resistance leading to the conclusion that the method of electrochemical formation of the nanotubular oxide structure provides high corrosion resistance for Ti13Zr13Nb biomaterial in PSS. The obtained results confirm that the tested alloy devoid of the TiO<sub>2</sub> SWNTs is characterized by a slightly lower corrosion resistance as compared to the alloy anodized under proposed conditions. This is consistent with the literature data according to which the presence of the nanotubular oxide structures increases the corrosion resistance in SBFs [1-4].

EIS was used to characterize the interfacial properties of the Ti13Zr13Nb | TiO<sub>2</sub> | PSS and Ti13Zr13Nb | TiO<sub>2</sub> SWNTs | PSS system. For this purpose, the EIS spectra were recorded in physiological saline solution at 37°C at the value of  $E_{cor}$ .

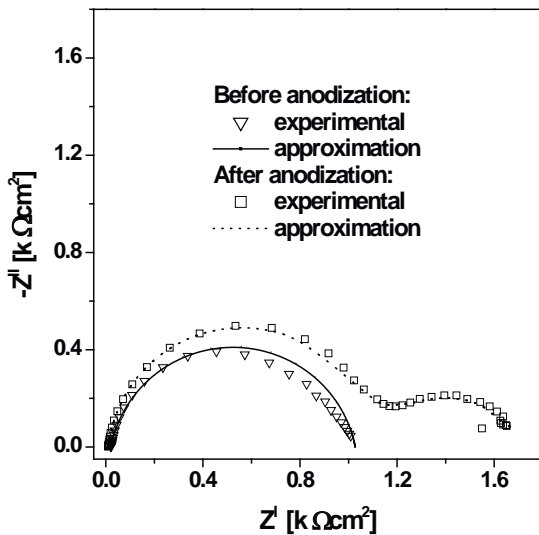


Fig. 3. Nyquist diagram registered at  $E_{cor}$  in PSS of 0.9% NaCl at 37°C for the Ti13Zr13Nb alloy before and after anodization

Figure 3 presents impedance spectra obtained at  $E_{cor}$  for the Ti13Zr13Nb alloy before and after anodization with experimental (symbols) and fitted (lines) data. In case of the unmodified alloy a single semi-circle is observed in the whole range of frequencies studied. Such ac impedance behavior in corrosion process is typical for titanium and its alloys undergoing to natural self-passivation [16]. For the Ti13Zr13Nb alloy with nanotubes formed on its surface in the Nyquist

diagram two semi-circles are visible in Fig. 3, wherein the diameter of the first semi-circle registered at high frequencies (HF) is much greater than for the second semi-circle obtained at low frequencies (LF). Such a change in the shape of EIS spectrum in comparison with the impedance spectrum obtained for the Ti13Zr13Nb alloy with thin oxide film on the surface formed as a result of natural self-passivation, may indicate that the impedance response at HF is derived from the outside part of the TiO<sub>2</sub> SWNTs layer (the porous material) being in contact with the electrolyte, and the LF semi-circle obtained at LF is related to the inner barrier TiO<sub>2</sub> film closely adherent to the substrate (which is the essential protection against corrosion of the Ti13Zr13Nb electrode). This impedance behavior is similar to that found for porous Ti electrode covered with nanotubular oxide layer in SBF solution [15].

In this simple CPE model which represents the physical model of the corrosion process of thin oxide layer | PSS system (Fig. 4a),  $R_s$  is the solution resistance being in series with a parallel connection of  $R_{ox}$ -CPE<sub>dl</sub> elements.  $R_{ox}$  is the resistance of charge transfer through the oxide layer | PSS interface, and the electrical double layer capacitance,  $C_{dl}$ , to approximation procedure was substituted by a constant phase element (CPE) [12]. Its impedance is:

$$\hat{Z}_{CPE} = \frac{1}{T(j\omega)^\phi} \quad (2)$$

where  $T$  (in  $F \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{\phi-1}$ ) denotes the capacitance parameter, and  $\phi \leq 1$  is a dimensionless CPE exponent related to the constant phase angle,  $\alpha = 90^\circ(1-\phi)$ . The CPE model explains the impedance behavior of a smooth electrode [12] and leads to a rotated single semi-circle on the Nyquist diagram.

The values of  $C_{dl}$  for the oxide layer | PSS interface were determined from the formula given by Brug et al. [17]:

$$T = C_{dl}^\phi (R_s^{-1} + R_{ct}^{-1})^{1-\phi} \quad (3)$$

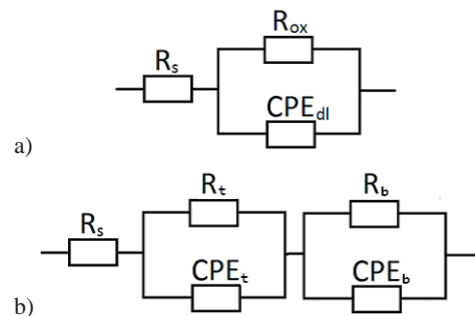


Fig. 4. Equivalent circuit model used for approximation of the experimental EIS data for the system: a) Ti13Zr13Nb | TiO<sub>2</sub> | PSS, and b) Ti13Zr13Nb | TiO<sub>2</sub> SWNTs | PSS at 37°C

The impedance spectra obtained for the Ti13Zr13Nb alloy with nanotubular oxide layers were interpreted using the model containing two CPEs instead of capacitors (Fig. 4b). This EEC consists of the solution resistance in series with two parallel CPE-R elements, where  $R_t$  is resistance of the outer tube layer,  $CPE_t$  represent the capacitance of the outer tube layer,  $R_b$  is resistance of the inner-barrier layer, and  $CPE_b$

denotes capacitance of the inner-barrier layer [5]. This model explains the impedance behavior of an porous electrode, and produces two semi-circles on the Nyquist diagram where the HF semi-circle is related to the surface porosity (nanotubular oxide structure), and the LF semi-circle is related to the charge-transfer process through the inner-barrier oxide layer | PSS interface.

All registered impedance plots were analysed using the NLS method. The best fit to the experimental data for the Ti13Zr13Nb | TiO<sub>2</sub> | PSS and Ti13Zr13Nb | TiO<sub>2</sub> SWNTs | PSS system was obtained using the CPE and two-CPE model, respectively. The approximations of the Nyquist plots (Fig. 3) using the appropriate models from Figs. 4a and b, were very good. The Bode diagrams displayed in Figs. 5 and 6 also confirm good quality of approximations. The results of approximations with their standard deviations are shown in Tables 2 and 3.

In case of the smooth Ti13Zr13Nb electrode before anodization, the R<sub>s</sub> parameter has a higher value of 20.69±0.02 Ω cm<sup>2</sup> (Table 2) as compared with R<sub>s</sub> = 9.41±0.09 Ω cm<sup>2</sup> determined for the porous electrode after TiO<sub>2</sub> SWNTs anodic formation (Table 3).

The value of charge transfer resistance through the Ti13Zr13Nb | TiO<sub>2</sub> | PSS interface is R<sub>ox</sub> = 1.01±0.01 kΩ cm<sup>2</sup> (Table 2). This value is slightly lower than R<sub>t</sub> = 1.03±0.01 kΩ cm<sup>2</sup> and significantly higher than R<sub>b</sub> = 707±18 Ω cm<sup>2</sup> (Table 3) obtained for the Ti13Zr13Nb | TiO<sub>2</sub> SWNTs | PSS interface. It means that the kinetics of electrochemical corrosion in PSS is a little bit slower on the anodized Ti13Zr13Nb electrode as compared with that biomaterial devoid of the presence of TiO<sub>2</sub> SWNTs. Moreover, these data are in good agreement with the results of the Tafel analysis (Table 1), and the literature reports on the corrosion resistance of the self-organized nanotubular oxide layers on titanium and its alloys in SBFs [14].

It should be added that for the anodized Ti13Zr13Nb electrode higher values of parametres characterizing the CPE elements (CPE-T<sub>i</sub> and corresponding CPE-φ<sub>t</sub>, CPE-T<sub>b</sub> and corresponding CPE-φ<sub>b</sub>) were obtained (Table 3) than in case of the same type of electrode but before anodization (CPE-T<sub>dl</sub> and corresponding CPE-φ<sub>dl</sub>) (Table 2). In Table 3, the higher capacitance of the electrical double-layer for the Ti13Zr13Nb electrode with the TiO<sub>2</sub> SWNTs on the surface (C<sub>dl</sub> = 131±26

μF cm<sup>2</sup>) is presented as compared with C<sub>dl</sub> = 2.13±0.43 μF cm<sup>2</sup> calculated according to Eqn. 3 for the unmodified electrode (Table 2). Such a difference in the value of C<sub>dl</sub> is probably connected with the stronger surface development of the TiO<sub>2</sub> SWNTs layer (the porous material) than in case of the self-passivated thin oxide layer, and it should not be related to the increase in conductivity of the TiO<sub>2</sub> nanotubes.

The Bode diagrams in the form of log |Z| = f (log f) shown in Fig. 5 confirm the increase in the corrosion resistance of the Ti13Zr13Nb alloy after anodization. The increase in the value of log |Z| determined at the lowest frequency studied of f = 1 mHz, is observed for the Ti13Zr13Nb electrode after the applied electro-oxidation. For both types of the studied electrodes, a linear variation between log |Z| and log f with a slope close to -1 in the range of intermediate frequencies is visible what confirms their capacitive behavior.

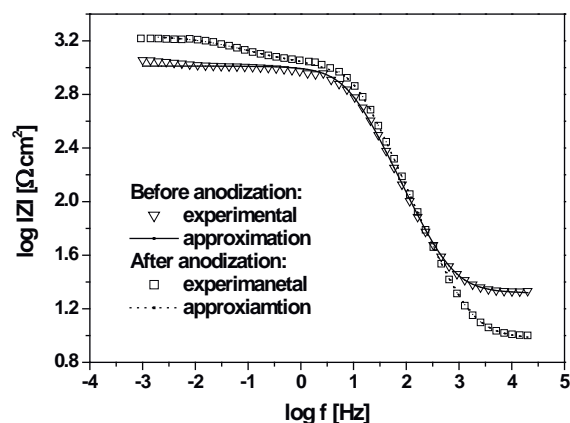


Fig. 5. Comparison of Bode diagrams in the form of log |Z| = f (log f) for the Ti13Zr13Nb alloy before and after the anodization, registered at E<sub>cor</sub> in PSS of 0.9% NaCl at 37°C

The phase-angle Bode diagrams for the Ti13Zr13Nb alloy before and after anodization are shown in Figure 6. For the self-passivated Ti13Zr13Nb alloy only one time constant is

TABLE 2

Summary of the parameters obtained using the CPE model shown in Fig. 4a to approximate the experimental EIS data for the Ti13Zr13Nb alloy before anodization in 0.9 % NaCl solution at 37°C

Ti13Zr13Nb alloy	R <sub>s</sub> [Ω cm <sup>2</sup> ]	R <sub>ox</sub> [kΩ cm <sup>2</sup> ]	CPE-T <sub>dl</sub> [F cm <sup>-2</sup> s <sup>φ-1</sup> ]	CPE-φ <sub>dl</sub>	C <sub>dl</sub> [μF cm <sup>-2</sup> ]
Before anodization	20.69 ±0.02	1.01 ±0.01	0.73·10 <sup>-5</sup> ±(0.05)·10 <sup>-5</sup>	0.877 ±0.008	2.13 ±0.43

TABLE 3

Summary of the parameters obtained using the two-CPE model shown in Fig. 4b to approximate the experimental EIS data for the Ti13Zr13Nb alloy after anodization in 0.9 % NaCl solution at 37°C.

Ti13Zr13Nb alloy	R <sub>s</sub> [Ω cm <sup>2</sup> ]	R <sub>t</sub> [kΩ cm <sup>2</sup> ]	CPE-T <sub>t</sub> [F cm <sup>-2</sup> s <sup>φ-1</sup> ]	CPE-φ <sub>t</sub>	R <sub>b</sub> [Ω cm <sup>2</sup> ]	CPE-T <sub>b</sub> [F cm <sup>-2</sup> s <sup>φ-1</sup> ]	CPE-φ <sub>b</sub>	C <sub>dl</sub> [μF cm <sup>-2</sup> ]
After anodization	9.41 ±0.09	1.03 ±0.01	1.87·10 <sup>-5</sup> ±(3.85)·10 <sup>-7</sup>	0.945 ±0.004	707 ±18	0.0020 ±0.0001	0.594 ±0.012	131 ±26

present in the circuit. This is a typical impedance spectrum for the oxide layer on a titanium substrate [15]. One time constant in the circuit can suggest that the corrosion process proceeds by one step via anodic dissolution.

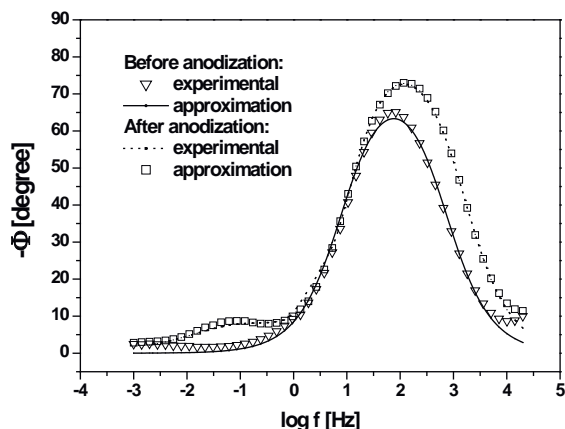


Fig. 6. Phase-angle Bode diagrams for the Ti13Zr13Nb alloy before and after anodic oxidation registered at  $E_{cor}$  in PSS of 0.9% NaCl at 37°C

The appearance of the second time constant in the circuit in Fig. 6 for the alloy after anodization indicates the porous surface. The higher values of phase angles close to  $-90^\circ$  are observed for the electrode with the TiO<sub>2</sub> SWNTs on the surface. They are typical of a capacitive behavior corresponding to the material covered with the oxide layer with a high corrosion resistance, even in a chloride-containing solutions being well-known to cause pitting.

#### 4. conclusions

On the basis of the carried out studies by SEM, STEM, and GIXD it was found that surface modification of the Ti13Zr13Nb implant alloy using anodic oxidation allows to obtain the nanotubular oxide structures having an inner diameter of single-wall nanotubes from 10 to 32 nm. EIS studies of the modified alloy showed the typical behavior of impedance for titanium coated with porous oxide layer. Surface modification of the Ti13Zr13Nb alloy increases its corrosion resistance in a physiological saline solution as compared to the alloy surface covered with the self-passivated

oxide film. The obtained results suggest that the proposed method of surface modification by anodization is promising for better osseointegration of the Ti13Zr13Nb implants.

#### acknowledges

The author received a grant for the project DoktoRIS - Scholarship program for innovative Silesia co-financed by the European Union under the European Social Fund

#### REFERENCES

- [1] S. John Mary, S. Rajendran, *Zastita Materijala* **53**, 109-113, (2012).
- [2] S. Grigorescu, C. Ungureanu, R. Kirchgeorg, P. Schmuki, I. Demetrescu, *Appl. Surf. Sci.* **270**, 190-196, (2013).
- [3] S. Sobieszczyk, *Adv. Mater. Sci.* **9**, 25-41, (2009).
- [4] A.W. Tan, B. Pinguan-Murphy, R. Ahmad, S.A. Akbar, *Ceram. Int.* **38**, 4421-4435, (2012).
- [5] W. Yu, J. Qiu, R. Ahmad, L. Xu, *Biomed. Mater.* **4**, 1-6, (2009).
- [6] V.S. Saji, H.C. Choe, *Corros. Sc.* **51**, 1658-1663, (2009).
- [7] S. Minagar, C. Berndt, J. Wang, E. Ivanova, C. Wen, *Acta Biomater.* **8**, 2875-2888, (2012).
- [8] ASTM G 102-89 (2004). Standard Practice for Calculation of Corrosion Rates and Related Information from Electrochemical Measurements.
- [9] User manual for frequency response analysis (FRA) for Windows version 4.9, Eco Chemie B.V., Kanaalweg, Utrecht, The Netherlands, 2001.
- [10] B.A. Boukamp, *Solid State Ionics* **20**, 31-44, (1986).
- [11] B.A. Boukamp, *Solid State Ionics* **18-19**, 136-140, (1986).
- [12] A. Lasia, *Electrochemical impedance spectroscopy and its applications*, in: *Modern aspects of electrochemistry*, Vol.32, (Eds: B.E. Conway, J. Bockris, and E.E. White), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999.
- [13] A. Smółka, K. Rodak, G. Dercz, W. Simka, K. Dudek, B. Łosiewicz, *Acta Phys. Pol., A* **125**, 4, 932-935 (2014).
- [14] *Atlas of Eh-pH diagrams, Intercomparison of thermodynamic databases*, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Naoto TAKENO, 2005.
- [15] W-q. Yu, J. Qiu, F-q. Zhang, *Colloids Surf. B* **84**, 400-405, (2011).
- [16] G.J. Brug, A.L.G. van den Eeden, M. Sluyters-Rehabach, J.H. Sluyters, *J. Electroanal. Chem.* **176**, 275-295, (1984).
- [17] L.T. Duarte, S.R. Biaggio, R.C. Rocha-Filho, N. Bocchi, *Corros. Sci.* **72**, 35-40, (2013).

Received: 15 September 2015.

# Electrochemical Formation of Second Generation TiO<sub>2</sub> Nanotubes on Ti13Nb13Zr Alloy for Biomedical Applications

A. STRÓŻ<sup>a,\*</sup>, G. DERCZ<sup>a</sup>, B. CHMIELA<sup>b</sup>, D. STRÓŻ<sup>a</sup> AND B. ŁOSIEWICZ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Materials Science, University of Silesia, 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland

<sup>b</sup>Institute of Materials Science, Silesian University of Technology, Z. Krasińskiego 8, 40-019 Katowice, Poland

The aim of this study was to obtain the second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on the Ti13Nb13Zr alloy. Anodic oxidation of the alloy under study was carried out in 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> electrolyte under voltage–time conditions of 20 V for 120 min. The morphological parameters of the obtained nanotubes of second generation such as the length ( $L$ ), internal ( $D_i$ ) and outer ( $D_o$ ) diameter of nanotube were determined. It was found that the anodic oxidation of the Ti13Nb13Zr alloy conducted under proposed conditions allowed to obtain the single-walled nanotubes of the following geometrical parameters: the internal diameter 61 nm, outer diameter 103 nm, and the length 3.9  $\mu$ m. The total surface area of the single-walled nanotubes was equal to 4.1  $\mu$ m<sup>2</sup>, and the specific surface area per cm<sup>2</sup> ( $A_s$ ) was estimated to be 15.6 cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>. Formation mechanism, structure and optimal morphological parameters of the obtained single-walled nanotubes on the Ti13Nb13Zr alloy have been discussed in detail.

DOI: [10.12693/APhysPolA.130.1079](https://doi.org/10.12693/APhysPolA.130.1079)

PACS/topics: 87.85.jj, 81.07.De, 82.47.–a

## 1. Introduction

Surface modification of the Ti13Nb13Zr alloy expands the scope of the applicability of this alloy in medicine, particularly in the implantology [1–3]. In order to improve the biological activity of the Ti13Nb13Zr alloy and to increase its biocompatibility as well as ability to connect the bones and the implant, the surface of biomaterial should be subjected to modifications [1–4]. One of the most popular, easy-to-use electrochemical method of surface modification of titanium and its alloys is anodization. By applying the appropriate potential–current conditions, time, type and concentration of the electrolyte, the oxide layer on the surface of Ti and its alloys can be formed using this method [5–8]. Electrochemical oxidation allows to produce TiO<sub>2</sub> nanotubes of various parameters such as diameter, length, and wall thickness [7, 8]. This type of layers is recently used in orthopaedics, dentistry, and can also act as a drug delivery system in a precise place without oral supplementation [9, 10]. Depending on the used electrolyte the TiO<sub>2</sub> nanotubes belonging to one of the four generations can be produced [4, 7, 9, 10]. The purpose of the present study is to investigate the self-organized formation of nanotubular oxide layers of the Ti13Nb13Zr implant alloy in the electrolyte based on ammonia sulfate with addition of ions fluorine.

## 2. Experimental

The tested samples of the Ti13Nb13Zr (wt%) alloy in the form of disks were cut from the rod of 0.9 mm in diameter. The samples were ground with 1200 and 2500# grit silicon carbide paper and then polishing using OP-S suspension, sonicated for 20 min using nanopure water

(Milli-Q, 18.2 M $\Omega$ cm<sup>2</sup>, < 2 ppb total organic carbon). Anodic oxidation was performed at room temperature in 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution with 2 wt% content of NH<sub>4</sub>F. Value of solution pH was 5.3. The time and voltage of anodization was 120 min and 20 V, respectively. Anodization process was carried out using a Kikusui PWR800H Regulated DC Power Supply. The morphology and structure of the formed TiO<sub>2</sub> nanotubes layers was examined using a scanning electron microscopy with field emission HITACHI HD-2300A (FE-SEM) and the grazing incidence X-ray diffraction (GIXD) on the X'Pert Philips PW 3040/60 diffractometer operating at 30 mA and 40 kV, which was equipped with a vertical goniometer and an Eulerian cradle, respectively. The GIXD diffraction patterns were registered in  $2\theta$  range from 20° to 90° and 0.05° step for the incident angle  $\alpha = 1.00^\circ$ .

## 3. Results and discussion

Based on preliminary review of the literature and own research in this work a new composition of the electrolyte with a higher content of fluoride ions was proposed. Addition of ions is responsible for the production of more uniform nanotubes of similar diameter as compared with non-uniform nanotubes received so far from other electrolytes with less ions F<sup>-</sup>. In general, the mechanism with schematic diagram of TiO<sub>2</sub> nanotube formation in fluorine-ion based electrolytes as a result of three simultaneous processes was discussed in our previous work [1]. Figure 1 shows the GIXD pattern of the Ti13Nb13Zr alloy after anodization in 1 M NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> solution with 2 wt% NH<sub>4</sub>F, at 20 V for 12 min. X-ray analysis in Fig. 1 revealed the presence of two phases from substrate:  $\alpha$ -Ti and  $\beta$ -Ti. The diffraction pattern shows an amorphous halo which may indicate the presence of amorphous nanotubes in X-ray scale. The phenomenon of the anodic formation of oxide layers has also been reported in the literature [8].

\*corresponding author; e-mail: [agnieszka.stroz@us.edu.pl](mailto:agnieszka.stroz@us.edu.pl)



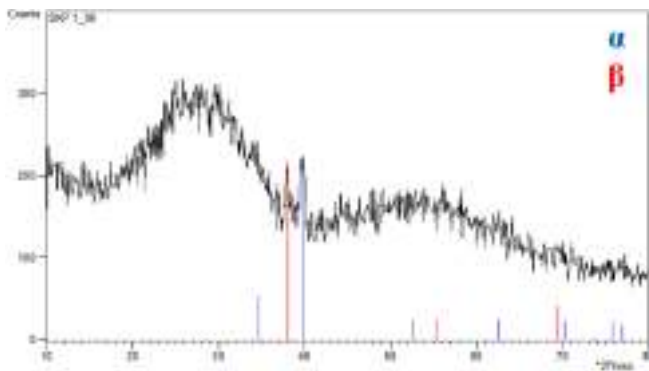


Fig. 1. GIXD pattern of Ti13Nb13Zr after anodization at 20 V for 120 min in 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  with 2 wt%  $\text{NH}_4\text{F}$ .

Based on scanning electron microscopy (SEM) images (Figs. 2 and 3) with selected areas of the Ti13Nb13Zr alloy surface after anodic oxidation, diameter and length of nanotubes were estimated. It was found that under proposed conditions single-walled  $\text{TiO}_2$  nanotubes with an internal diameter in the range of 30–87 nm (Fig. 2a) and an outside diameter in the range of 57 to 148 nm (Fig. 2b), can be obtained.

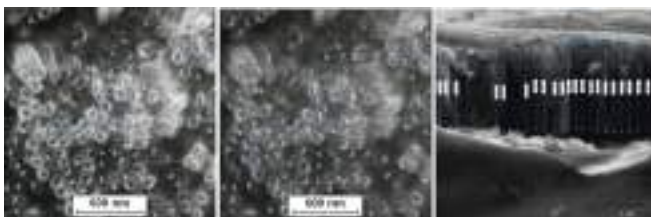


Fig. 2. The field effect SEM (FE-SEM) images with selected area to estimate: left — outer diameter, middle — internal diameter, and right — length of  $\text{TiO}_2$  nanotubes.

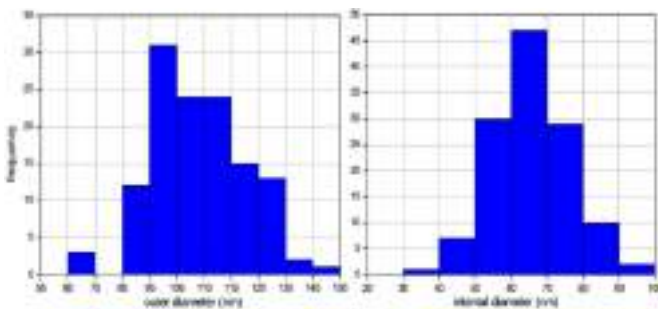


Fig. 3. Histogram of outer and internal diameter distributions of the  $\text{TiO}_2$  nanotubes on the surface of Ti13Zr13Nb alloy after anodization at 20 V for 120 min in 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  with 2 wt%  $\text{NH}_4\text{F}$ .

Empirical distribution histograms of the diameter of the nanotubes is shown in Fig. 3a and b. The average value of the inner and outer diameter of single-walled nanotubes (SWNTs) with having regard to uncertainty of measurement is respectively  $D_i = 61(11)$  nm and

$D_o = 103(16)$  nm. Microscopic observation revealed that the length ( $L$ ) of the obtained SWNTs changes in the range from 3.3 to 4.1  $\mu\text{m}$  (Fig. 2c). The average value of the SWNT length with the consideration of measurement error is  $L = 3.9(0.2)$   $\mu\text{m}$ . The total area ( $A_i$ ) of the nanotubes was calculated according to the following formula [8]:

$$A_i = 2\pi(D_0^2 - D_1^2) + 2\pi L(D_0 + D_1). \quad (1)$$

The first term of the above equation is associated to the areas of the two tube rings. Second term involves the areas of internal and external curved surfaces. The specific surface area ( $A_S$ ) of nanotubes per  $\text{cm}^2$  was estimated by the following term [8]:

$$A_S = nA_i. \quad (2)$$

#### 4. Conclusion






It was found that the anodic oxidation of the Ti13Nb13Zr alloy conducted under proposed conditions allowed to obtain the single-walled nanotubes of the following geometrical parameters: the internal diameter: 61 nm, outer diameter: 103 nm, and the length: 3.9  $\mu\text{m}$ . The total surface area of the SWNTs was equal to 4.1  $\mu\text{m}^2$ , and the specific surface area per  $\text{cm}^2$  ( $A_S$ ) was estimated to be 15.6  $\text{cm}^2/\text{cm}^2$ . The result of the anodization carried out in 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution with 2 wt% content of  $\text{NH}_4\text{F}$  at room temperature at 20 V for 120 min was formation of amorphous  $\text{TiO}_2$  SWNTs. The obtained results of FE-SEM and GIXD studies confirmed the possibility of electrochemical formation of second generation of  $\text{TiO}_2$  nanotubes on Ti13Nb13Zr implant alloy under proposed conditions.

#### References

- [1] A. Smółka, K. Rodak, G. Dercz, K. Dudek, B. Łosiewicz, *Acta Phys. Pol. A* **125**, 932 (2014).
- [2] M. Szklarska, G. Dercz, W. Simka, B. Łosiewicz, *Surf. Interface Anal.* **46**, 698 (2014).
- [3] A. Smółka, G. Dercz, K. Rodak, B. Łosiewicz, *Archiv. Metall. Mater.* **60**, 2681 (2015).
- [4] S. Grigorescu, C. Ungureanu, R. Kirchgeorg, P. Schmuki, I. Demetrescu, *Appl. Surf. Sci.* **270**, 190 (2013).
- [5] J. Lełątko, T. Goryczka, T. Wierzchoń, M. Ossowski, B. Łosiewicz, E. Rówiński, H. Morawiec, *Solid State Phenom.* **163**, 127 (2010).
- [6] M. Freitag, B. Łosiewicz, T. Goryczka, J. Lełątko, *Solid State Phenom.* **183**, 57 (2012).
- [7] S. Grigorescu, V. Pruna, I. Titorencu, V. Jinga, A. Mazare, P. Schmuki, I. Demetrescu, *Bioelectrochemistry* **98**, 39 (2014).
- [8] L. Adnoucha, L. Hamadou, A. Kadri, N. Benbrahim, D. Bradai, *Electrochim. Acta* **133**, 597 (2014).
- [9] A.F. Cipriano, Ch. Miller, H. Liu, *J. Biomed. Nanotechnol.* **10**, 2977 (2014).
- [10] J.A. Lyndon, B.J. Boyd, N. Birbilis, *J. Control. Release* **179**, 63 (2014).

## Article

# In Vitro Bioelectrochemical Properties of Second-Generation Oxide Nanotubes on Ti–13Zr–13Nb Biomedical Alloy

Agnieszka Stróż <sup>1</sup>, Thomas Luxbacher <sup>2</sup>, Karolina Dudek <sup>3</sup>, Bartosz Chmiela <sup>4</sup>, Patrycja Osak <sup>1</sup>  
and Bożena Losiewicz <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Faculty of Science and Technology, Institute of Materials Engineering, University of Silesia in Katowice, 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland
- <sup>2</sup> Anton Paar GmbH, Street 20, 8054 Graz, Austria
- <sup>3</sup> Refractory Materials Center, Institute of Ceramics and Building Materials, Łukasiewicz Research Network, Toszecka 99, 44-100 Gliwice, Poland
- <sup>4</sup> Institute of Materials Science, Silesian University of Technology, Z. Krasieńskiego 8, 40-019 Katowice, Poland
- \* Correspondence: bozena.losiewicz@us.edu.pl; Tel.: +48-32-3497-527

**Abstract:** Surface charge and in vitro corrosion resistance are some of the key parameters characterizing biomaterials in the interaction of the implant with the biological environment. Hence, this work investigates the in vitro bioelectrochemical behavior of newly developed oxide nanotubes (ONTs) layers of second-generation (2G) on a Ti–13Zr–13Nb alloy. The 2G ONTs were produced by anodization in 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution with 2 wt.% of NH<sub>4</sub>F. The physical and chemical properties of the obtained bamboo-inspired 2G ONTs were characterized using scanning electron microscopy with field emission and energy dispersive spectroscopy. Zeta potential measurements for the examined materials were carried out using an electrokinetic analyzer in aqueous electrolytes of potassium chloride, phosphate-buffered saline and artificial blood. It was found that the electrolyte type and the ionic strength affect the bioelectrochemical properties of 2G ONTs layers. Open circuit potential and anodic polarization curve results proved the influence of anodizing on the improvement of in vitro corrosion resistance of the Ti–13Zr–13Nb alloy in PBS solution. The anodizing conditions used can be proposed for the production of long-term implants, which are not susceptible to pitting corrosion up to 9.4 V.

**Keywords:** anodizing; corrosion resistance; oxide nanotubes; Ti–13Zr–13Nb alloy; zeta potential



**Citation:** Stróż, A.; Luxbacher, T.; Dudek, K.; Chmiela, B.; Osak, P.; Losiewicz, B. In Vitro Bioelectrochemical Properties of Second-Generation Oxide Nanotubes on Ti–13Zr–13Nb Biomedical Alloy. *Materials* **2023**, *16*, 1408. <https://doi.org/10.3390/ma16041408>

Academic Editors: Thomas Dippong, Chunguang Yang and Hendro Hermawan

Received: 31 December 2022  
Revised: 4 February 2023  
Accepted: 6 February 2023  
Published: 8 February 2023



Copyright: © 2023 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 (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Innovative biomaterials inspired by nature are the answer to the key challenges of modern medicine. Current scientific trends in medicine concern the use of intelligent bionanomaterials for the needs of dynamically developing regenerative medicine, tissue engineering and targeted therapy [1–3]. The latest generation of bionanomaterials that can give hope to hundreds of thousands of patients waiting in queues for their health and life include oxide nanotubes (ONTs) inspired by the structure of bamboo obtained on titanium and titanium alloys intended for long-term implants [4–21]. Currently, titanium and its alloys are commonly used metallic biomaterials in medicine due to their unique properties, which include high corrosion resistance [1,4–6,11,15,20,22–27], biological inertness [1,11,28], low specific gravity and excellent mechanical properties [1,7,16,24,29–34]. In vitro corrosion resistance of metallic biomaterials affects their functionality and durability. It is also the main factor that determines biocompatibility. According to the fundamental paradigm of metallic biomaterials, which does not apply only to biodegradable metals, the more corrosion-resistant a biomaterial is, the greater its biocompatibility [27]. The Ti–13Zr–13Nb alloy belongs to the newest group of titanium alloys, which do not contain allergenic nickel or aluminum and carcinogenic vanadium [4,5,11–15,18,19,23,32–35]. This bi-phase ( $\alpha + \beta$ ) alloy shows high biotolerance and very good corrosion resistance and is classified as a long-lasting biomaterial [4,5,11–15,18,19,23,32,34]. The biocompatibility of titanium and its

alloys results from the presence of a native oxide layer on its surface, which is characterized by thermodynamic stability and low electronic conductivity. Its thickness ranges from 2 to 10 nm and provides high corrosion resistance [23]. In the biological environment of the human body, in the oxide layer on the surface of titanium and its alloys, processes involving the incorporation of elements from the fluids of cells and tissues surrounding the implant takes place. Moreover, an *in vitro* hemocompatibility study of the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing in 1 M ethylene glycol solution with 4 wt.% of  $\text{NH}_4\text{F}$  revealed the hemolytic index of 0.30 (8) and 0.00 before and after surface modification, respectively [11]. The obtained results confirmed that anodizing of the Ti-13Zr-13Nb biomedical alloy allowed the complete elimination of hemolysis.

To increase the biocompatibility of the Ti-13Zr-13Nb alloy and improve its biological activity, we propose modifying the surface of this alloy using the anodizing method, making it possible to produce self-organized ONTs of various geometry and length. Bamboo-like ONTs layers were obtained on the Ti-13Zr-13Nb alloy using inorganic and organic electrolytes [4,5,12–15,18,19]. The porous layers of ONTs can be additionally modified by enriching them with electrolyte components, e.g., phosphates, giving them bioactivity features. The ONTs can also be saturated with therapeutic agents, bactericides, active substances or tissue-forming hydroxyapatite, thanks to which they can be used in orthopedics, dentistry and intelligent drug delivery systems [10]. The bamboo-like ONTs enable the strengthening of bone functions at the boundary of the implant and bones. In the case of the rough surface of titanium implants, an increase in osteogenic properties such as cell proliferation, protein adsorption and deposition of calcium have been reported, which favor osseointegration [1–3].

As a result of surface modification, the physical properties change, which also affects the chemical properties of the surface. The implant affects the surrounding tissues through its surface. This is due to the interaction of implant surfaces and body fluids, which is often mediated by adsorbed proteins [5,11,20,22–26]. The features of the implant surface, regarding its roughness, topography and surface chemistry, are then “translated” by the protein layer into information that is understandable by the cells.

A sensitive indicator for the actual surface charge of a biomaterial in contact with a biological environment is the zeta potential ( $\zeta$ ) [36–38]. Wettability and surface roughness of ONTs formed on the Ti-13Zr-13Nb alloy implant surfaces are characterized in the literature, while the surface charge is still unavailable [39,40]. Studying the zeta potential of the biocompatible Ti-13Zr-13Nb alloy before electrochemical modification and with vertically oriented ONTs will allow learning the mechanism by which ions will adhere better to smooth surfaces and will prefer a porous structure. The technique of streaming potential is based on the phenomenon of creating an electric field when the electrolyte flows, which remains tangential to the stationary, charged surface of the tested material. The  $\zeta$  value is calculated from the generated streaming potential. The local surface charge is related to the surface roughness of ONTs in the nanoscale. On the edges of ONTs with different internal and external diameters, there is a high surface charge density, which is the binding site for monovalent and divalent ions, as well as proteins mediating osteoblast adhesion [39,40]. Despite this, there is a lack of data in the literature regarding this important bioelectrochemical property of charged solid–liquid interfaces for the Ti-13Zr-13Nb alloy in body fluids. Therefore, the main purpose of this work was an evaluation of the anodizing effect on  $\zeta$  and *in vitro* corrosion resistance of the Ti-13Zr-13Nb alloy in artificial body fluid. This work brings a new contribution to the description of the relationship between the new anodizing conditions and *in vitro* bioelectrochemical properties of the latest generation Ti-13Zr-13Nb alloy, which has been intensively researched in recent years due to its unique properties.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Substrate Treatment

The material under study was Ti-13Zr-13Nb (wt.%) alloy (BIMO TECH, Wrocław, Poland). Disc-shaped samples with a thickness of 5 mm were cut from a wire with a

diameter of 20 mm and a length of 1 m. A specification covering chemical, mechanical and metallurgical requirements for wrought Ti–13Nb–13Zr alloy for surgical implant applications is provided in standard ASTM F1713-08(2021)e1 [41]. The samples were subjected to one-sided wet grinding on a metallographic grinding and polishing machine Forcipol 202 (Metkon Instruments Inc., Bursa, Turkey) at 250 rpm of the grinding wheel with soft start and soft stop. SiC abrasive papers of P600, P1200 and P3000 gradations (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) were used. The ground samples with a mirror-like surface were rinsed thoroughly under tap water and sonicated for 20 min in acetone (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland) and then in ultrapure water with resistivity of 18.2 M $\Omega$  cm (Milli-Q Advantage A10 Water Purification System, Millipore SAS, Molsheim, France). The cleaning procedure in ultrapure water was repeated twice with a change of water.

### 2.2. Production of ONTs on Ti–13Zr–13Nb Alloy

A detailed method of preparing anodes was described in our previous work [10]. The self-passive oxide layer on the anode surface was removed immediately before electrochemical oxidation by dissolving in 25% v/v HNO<sub>3</sub> (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland) for 10 min at room temperature. The depassivated anodes were cleaned with Milli-Q water in an ultrasonic bath for 20 min.

To produce the ONTs layers, the prepared anodes were subjected to one-step anodizing. Electrochemical oxidation was carried out in 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution with 2 wt.% of NH<sub>4</sub>F at 20 V for 120 min at room temperature. Ammonium sulfate ( $\geq 99.0\%$  purity) and ammonium fluoride ( $\geq 99.99\%$  trace metals basis) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI, USA). The mechanism of obtaining 2G ONTs layers on the surface of the Ti–13Zr–13Nb alloy under the applied anodizing conditions was described in detail in our earlier work [13]. Anodizing was conducted in a two-electrode system in which the anode was a sample tested in a Teflon holder, while the 4 cm<sup>2</sup> platinum mesh served as a counter electrode. The geometric surface of the anode subjected to electrochemical oxidation was 0.64 cm<sup>2</sup>. The distance between the cathode and anode was 25 mm. After anodizing, each anode was immersed for 5 min in Milli-Q water subjected to vigorous agitation.

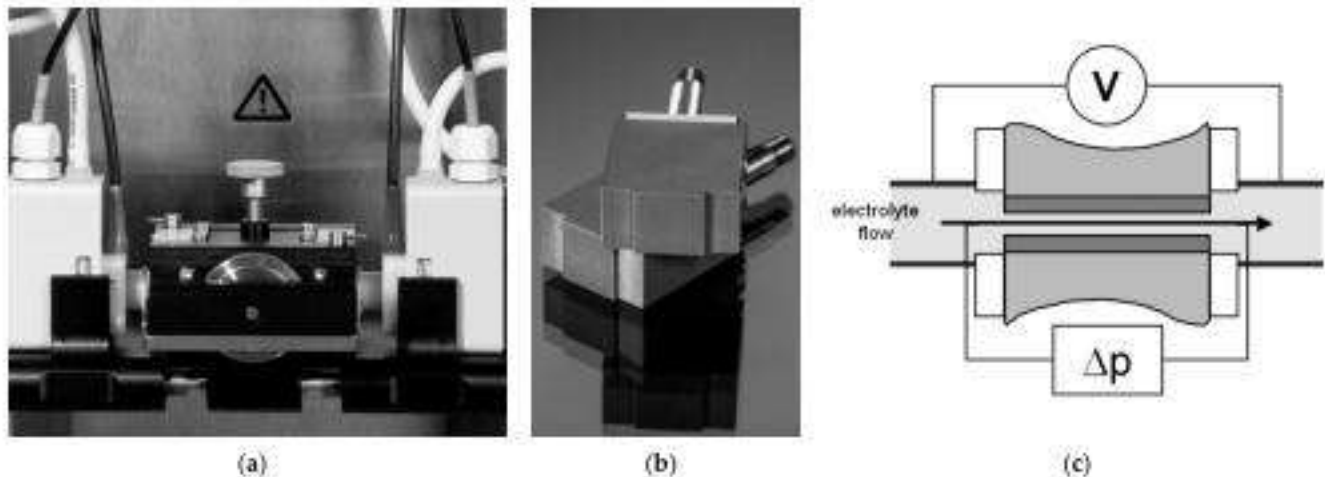
### 2.3. Physicochemical Characteristics of ONTs on Ti–13Zr–13Nb Alloy

Surface morphology and thickness of 2G ONTs layers obtained on the Ti–13Zr–13Nb alloy were examined using a scanning electron microscope with field emission (FE-SEM) Hitachi HD-2300A (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) under low-vacuum conditions of 50 Pa at an accelerating voltage of 15 kV. FE-SEM images were collected by secondary electrons (SE). Before microscopic examinations, a 5 nm chromium layer was deposited on the surface of the tested samples using an ion sputtering machine Quorum Q150T ES equipment (Quorum Technologies, East Sussex, UK) with argon as the ion extracting source. Local chemical composition with the surface distribution of elements was performed using an Energy Dispersive Spectrometer (EDS, Oxford Instruments, Abingdon, UK).

### 2.4. In Vitro Surface Characteristics of ONTs on Ti–13Zr–13Nb Alloy in Body Fluids

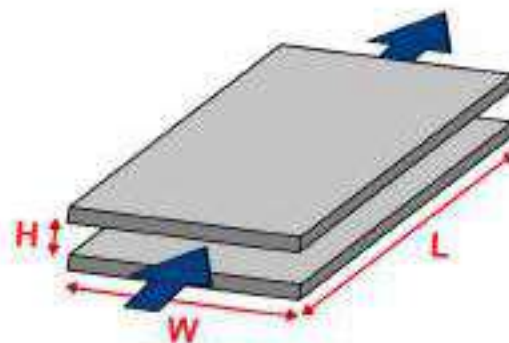
The surface zeta potential for the non-anodized and anodized Ti–13Zr–13Nb alloy was measured in aqueous electrolytes with different ionic strengths. The following solutions were applied: KCl (0.001 mol L<sup>-1</sup>) as the background electrolyte, PBS (0.001 mol L<sup>-1</sup> and 0.01 mol L<sup>-1</sup>) [42] and artificial blood (0.01 mol L<sup>-1</sup>) [43] in a wide pH range from over 3 to 9 at 37(2) °C. The pH of these aqueous electrolytes was adjusted with 0.05 mol L<sup>-1</sup> HCl and 0.05 mol L<sup>-1</sup> NaOH, respectively. Streaming current measurements were performed with an electrokinetic analyzer SurPASS 3 (Anton Paar GmbH, Graz, Austria) for surface testing of materials with automatic  $\zeta$  analysis. The Adjustable Gap Cell shown in Figure 1a was used. During the measurement of  $\zeta$ , a pair of the same samples were used, which were fixed in the holders with a cross-section of 10 × 10 mm using double-sided adhesive tape (Figure 1b). The sample holders were inserted into the Adjustable Gap Cell in such

a way that the tested surfaces of the discs faced each other. Both tested surfaces were located at a distance of about 100  $\mu\text{m}$ . The SurPASS 3 instrument enabled the use of both the classic streaming potential method and the streaming current method for direct analysis of the surface zeta potential. The surface conductance of the investigated sample influenced the surface zeta potential of tested surfaces evaluated from streaming potential measurements. In turn, the streaming current method required that the geometry of the flow channel be known (Figure 1c). The  $\zeta$  of planar samples was preferably determined from the measurement of the streaming current due to their electrical conductivity.



**Figure 1.** Adjustable Gap Cell mounted between electrodes (a); Sample holder (10 × 10 mm, center) (b); Measuring principle (c).

Scheme of the rectangular slit channel between adjacent solid samples with a planar surface indicating its dimensions is presented in Figure 2.  $L$ ,  $W$  and  $H$  stand for the length, width and height of the flow channel, respectively. The blue arrows indicate the direction of electrolyte flow during the  $\zeta$  measurement.



**Figure 2.** Scheme of the rectangular slit channel between adjacent solid samples with a planar surface.  $L$ ,  $W$  and  $H$  are the length, width and height of the flow channel, respectively.

The fundamental Helmholtz–Smoluchowski dependence for evaluating the  $\zeta$  from streaming current measurements is given by Equation (1), which relates electrokinetic phenomena like the streaming potential and the streaming current to the zeta potential [39,40]:

$$\zeta = \frac{dI_{str}}{d\Delta p} \cdot \frac{\eta}{\epsilon_{rel} \cdot \epsilon_0} \cdot \frac{L}{A} \quad (1)$$

In Equation (1), the measured streaming current coupling coefficient  $dI_{str}/d\Delta p$  is related to the cell constant  $L/A$  of the flow channel, which is the gap between adjacent solid samples. As shown schematically in Figure 2,  $L$  denotes the length of the rectangular

slit channel formed between two planar surfaces and  $A$  is its cross-section,  $A = W \times H$ , with  $W$  denoting channel width and  $H$  gap height. In Equation (1),  $\eta$  is the viscosity of the electrolyte,  $\epsilon_{rel}$  is related to the dielectric coefficient of the electrolyte and  $\epsilon_0$  denotes the vacuum permittivity. For dilute aqueous solutions,  $\eta$  and  $\epsilon_{rel}$  of water were used. The application of Equation (1) requires a thorough knowledge of the flow channel geometry, defined by the  $L/A$  cell constant. In case of the rectangular slot channel, the  $L$  and  $W$  parameters are determined by the size of the solid sample. The value of the parameter  $H$ , which is the gap height, can be calculated based on the measured volume flow rate of electrolyte passing through the flow channel driven by the applied differential pressure.

### 2.5. In Vitro Corrosion Resistance of ONTs on Ti-13Zr-13Nb Alloy in PBS

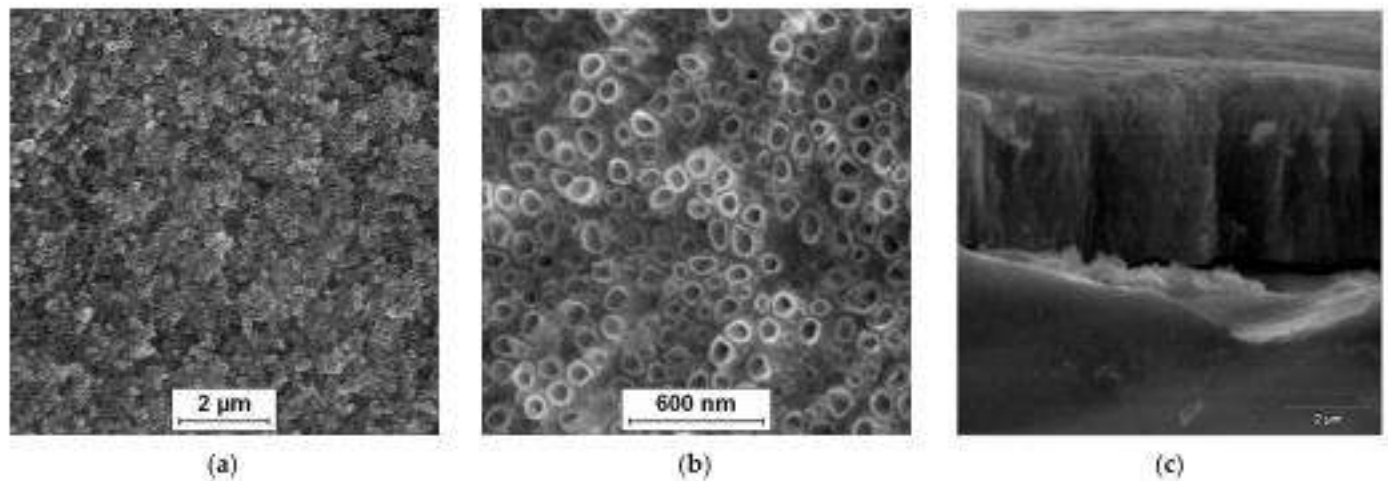
In vitro corrosion resistance measurements of the non-anodized Ti-13Zr-13Nb alloy with 2G ONTs layers were conducted in PBS at 37(2) °C using the method of open circuit potential (OCP) and anodic polarization curves. For the preparation of PBS containing 8.0 g L<sup>-1</sup> NaCl, 0.2 g L<sup>-1</sup> KCl, 1.42 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.24 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [42] analytically pure reagents (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland) and Milli-Q water were used. The pH of the PBS solution was adjusted to 7.4(1) using 4% NaOH and 1% C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>. Prior to each measurement, a fresh portion of PBS was deaerated using an Ar flow (UHP Ar, 99.999%) for 20 min. Corrosion behavior of the tested electrodes was characterized in a single-chamber electrochemical cell using a conventional three-electrode system. The cathode was the Ti-13Zr-13Nb alloy without and with the ONTs layer. The anode was platinum foil with dimensions of 40 × 20 × 2 mm. The reference electrode was the saturated calomel electrode (SCE) immersed in PBS electrolyte using Luggin capillary. Open circuit potential ( $E_{OC}$ ) was stabilized for 2 h. Then, the anodic polarization curves in the range of potentials from  $E_{OC}$  minus 150 mV to 9.4 V were registered at the polarization rate of  $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$ . All electrochemical tests were conducted using the Autolab/PGSTAT20 computer-controlled electrochemical system (Metrohm Autolab B.V., Utrecht, The Netherlands) equipped with the General Purpose Electrochemical System software.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. FE-SEM/EDS Studies of ONTs on Ti-13Zr-13Nb Alloy

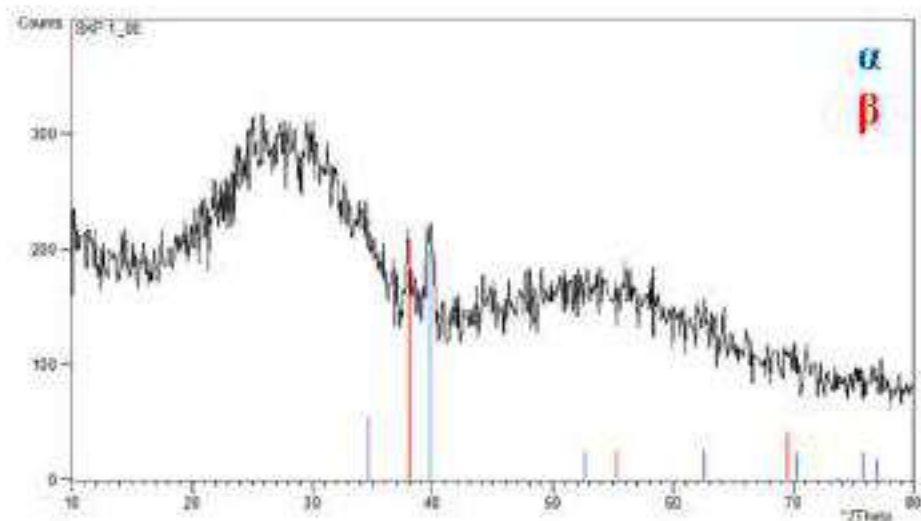
The surface morphology of the Ti-13Zr-13Nb alloy after anodizing in 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution with 2 wt.% of NH<sub>4</sub>F at 20 V for 120 min can be observed in Figure 3. The SE FE-SEM image in Figure 3a presents the on-top general view of the 2G ONTs layer. Figure 3b shows the surface morphology of the obtained bamboo-like ONTs in more detail. Oxide nanotubes with a circular cross-section and single walls are evenly distributed over the observed surface and arranged vertically. Bundles of ONTs that grew in local areas corresponding to the presence of  $\alpha$  and  $\beta$  phases are also visible [15]. The multi-step process of 2G ONTs layer formation on the surface of the Ti-13Zr-13Nb alloy in aqueous solutions containing fluoride ions was discussed in detail in our earlier work [13].

Figure 3c presents an exemplary SE FE-SEM image of the mechanically scratched region of the 2G ONTs layer formed on the Ti-13Zr-13Nb substrate. The top view of the mechanically fractured oxide layer reveals micro-areas with invisible and visible bamboo-like nanotubes, which form an ordered matrix of vertically oriented ONTs. The high degree of ordering of smooth-walled ONTs may increase the corrosion resistance of the Ti-13Zr-13Nb alloy in body fluids [4,5,11]. The inner diameter, outer diameter and length of the obtained 2G ONTs layer were determined based on the FE-SEM images recorded from the selected areas of the Ti-13Zr-13Nb alloy surface in our preliminary results [14]. Empirical distribution histograms of the ONTs' diameters allowed determining the average values of the morphological parameters. It was found that under the proposed conditions, bamboo-like ONTs with an inner diameter of 61(11) nm and an outer diameter of 103(16) nm were obtained. The average value of 2G ONTs length was 3.9(2)  $\mu\text{m}$ , and the specific surface area per cm<sup>2</sup> was equal to 15.6 cm<sup>2</sup> cm<sup>-2</sup>.



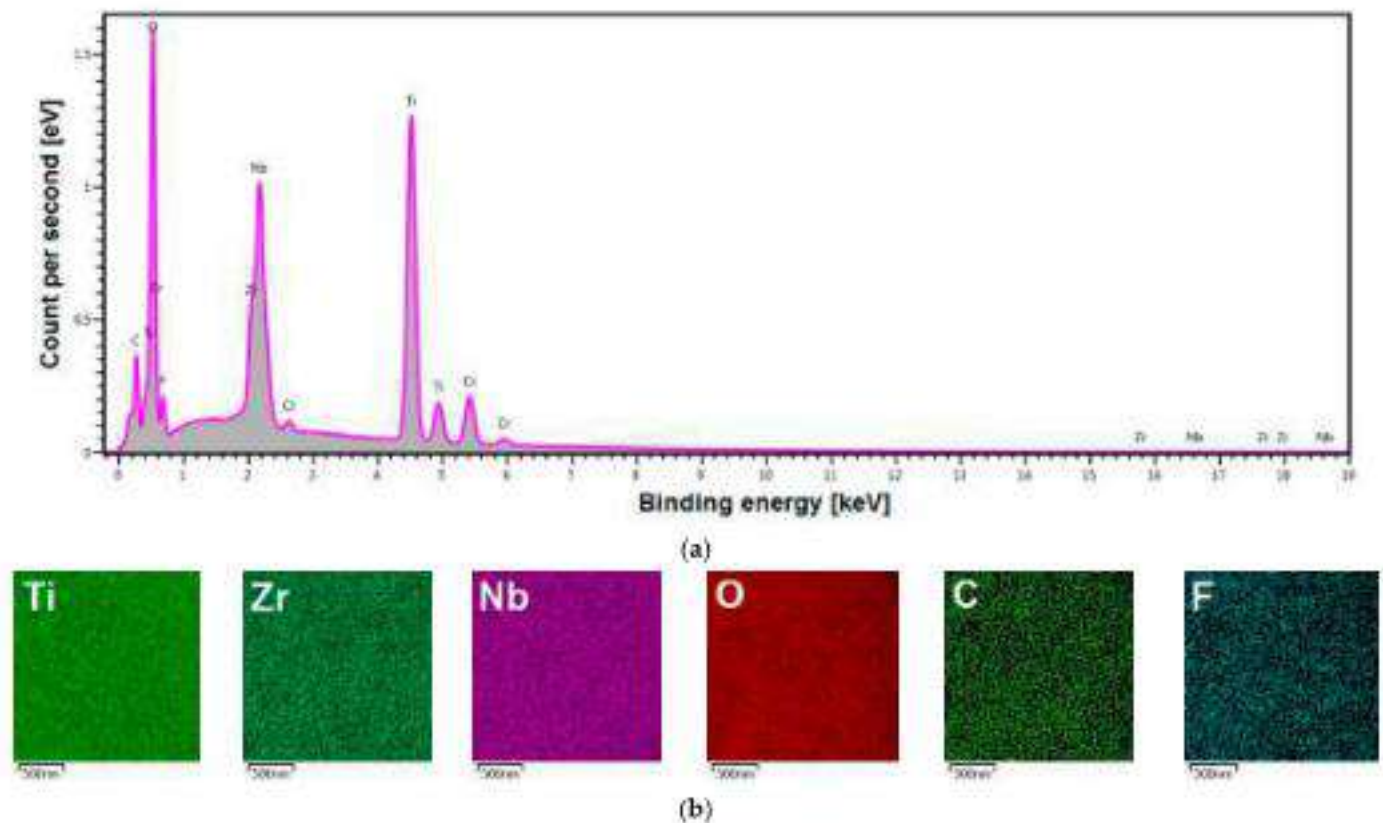
**Figure 3.** SE FE-SEM image of the Ti-13Zr-13Nb alloy after anodizing in 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution with 1 wt.% of  $\text{NH}_4\text{F}$  at 20 V for 120 min: (a) On-top general view of 2G ONTs layer; (b) View of 2G ONTs layer in a selected micro-region; (c) Fracture of 2G ONTs layer [14].

The X-ray structural investigations of the 2G ONTs layer obtained in 1 M  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  solution with 2 wt.%  $\text{NH}_4\text{F}$  on the Ti-13Zr-13Nb alloy surface were carried out in the previous work [14]. The grazing incidence X-ray diffraction (GIXD) results shown in Figure 4 revealed the presence of  $\alpha$ -Ti and  $\beta$ -Ti phases for the bi-phase Ti-13Zr-13Nb alloy substrate and an amorphous halo related to the 2G ONTs layer.



**Figure 4.** GIXD pattern of Ti-13Zr-13Nb after anodization in 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  with 2 wt.%  $\text{NH}_4\text{F}$  [14].

A new generation of biomedical titanium alloy was selected for research in this work. By eliminating toxic elements such as vanadium, aluminum and nickel from the composition of the titanium alloy, the appropriate requirements for medical implant applications were ensured [32]. The chemical composition of the Ti-13Zr-13Nb alloy was investigated in our previous work [15]. The results of the analysis of the local chemical composition of the Ti-13Zr-13Nb alloy with the obtained 2G ONTs layer are shown in Figure 5.



**Figure 5.** Local chemical composition of the Ti-13Zr-13Nb alloy with the 2G ONTs layer: (a) Energy dispersive spectrum in the micro-region; (b) EDS maps of elements distribution (Ti, Zr, Nb, O, C, F) in the micro-region.

A representative energy dispersive spectrum in the micro-region on the surface of the anodized Ti-13Zr-13Nb alloy shows the relationship between the count per second and the binding energy (Figure 5a). Peaks from Ti, Zr and Nb alloying elements are visible. The presence of an oxygen-derived peak of high intensity in the EDS spectrum in Figure 5a testifies that, on the surface of the tested biomaterial, an oxide layer is present. The obtained EDS spectrum also reveals the trace amounts of the elements included in the electrolyte used for anodizing (F, Cl), an ultra-thin layer applied to improve the conductivity of the tested sample (Cr) or impurities (C).

Figure 5b show the corresponding distribution maps of chemical elements in the micro-region. EDS distribution maps for individual elements have been recorded in different colors, which allows distinguishing the location of elements such as Ti, Zr, Nb, O, C and F. The obtained EDS distribution maps show that all identified elements are evenly distributed on the surface in the studied micro-region, and C and F occur in small amounts.

### 3.2. *In Vitro* Bioelectrochemical Characteristics in Body Fluids

The zeta potential is related to the surface charge at the biomaterial | electrolyte interface, and its knowledge allows for characterizing surface properties and designing new biomaterials. To determine the  $\zeta$  parameter for the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing, the measurement of streaming current was performed alternatively in both flow directions. Figure 6 shows exemplary pressure ramps as streaming current vs. differential pressure for the Ti-13Zr-13Nb alloy after anodizing at different pH of the electrolyte. One can see that the dependence representing the streaming current on the applied differential pressure is strictly linear, and the linear regression coefficients take values higher than  $R^2 = 0,99$ .



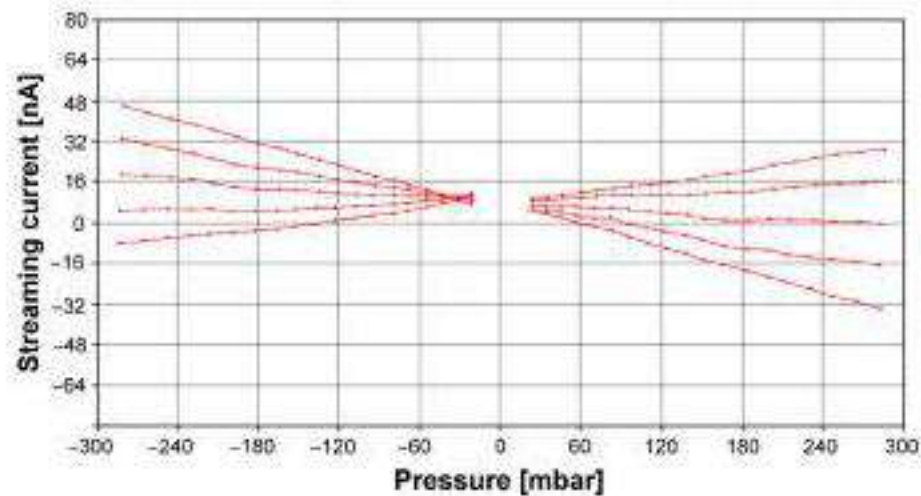


Figure 6. Streaming current vs. differential pressure for the Ti-13Zr-13Nb alloy after anodizing at various pH of the electrolyte.

Figure 7 shows the flow behavior of electrolytes passing through the gap between exemplary sample surfaces for the Ti-13Zr-13Nb alloy after anodizing expressed as volume flow rate vs. differential pressure. For all series of measurements, a linear dependence that indicated laminar flow behavior was found.

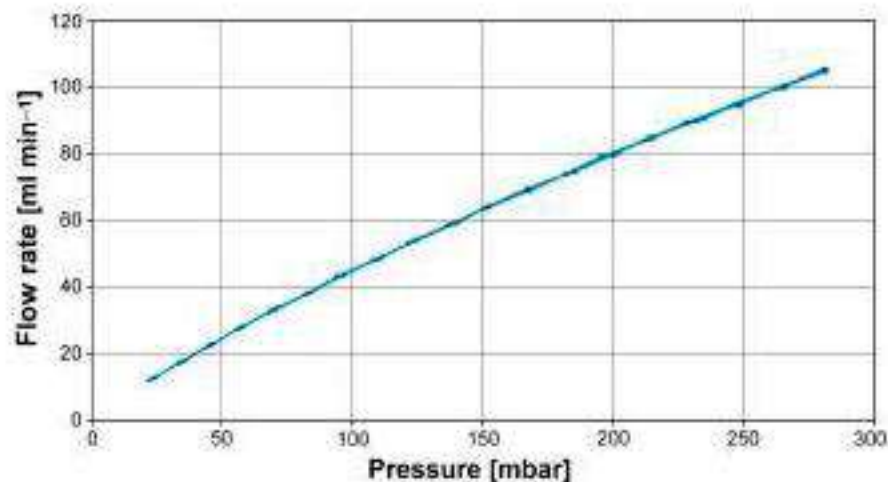


Figure 7. Flow rate vs. differential pressure for the Ti-13Zr-13Nb alloy after anodizing.

The determined zeta potential for the Ti-13Zr-13Nb alloy with and without the ONTs layer in the presence of the inert aqueous solution of  $0.001 \text{ mol L}^{-1}$  KCl was compared. Figure 8 shows the dependence of electrolyte pH in the range of pH 3–9 on zeta potential, where the corresponding isoelectric points (IEPs) were found. Note that the pH was first changed to low pH by starting close to pH 6 (the native pH of a freshly prepared KCl solution) and adding acid.

The measuring cell was then rinsed with Milli-Q water, thereby keeping the Ti-13Zr-13Nb alloy disks mounted. Afterward, the electrolyte was exchanged, and the titration proceeded to high pH. Note the coincidence of repetitive measurements close to pH 6, which indicates the stability of the Ti-13Zr-13Nb alloy surfaces in the presence of the aqueous solution in the pH range investigated. For the polished Ti-13Zr-13Nb alloy disks, a pH dependence on zeta potential with an IEP 4.2 typical for surfaces with little or no functional groups was found [44]. We assumed a native oxide layer present on the Ti-13Zr-13Nb substrate whose thickness was in the nanometer range [23]. This behavior was also found, e.g., for gold, stainless steel or polymer surfaces [44]. The growth of the ONTs on the Ti-13Zr-13Nb

substrate is approved by the significant shift of the IEP to pH 5.4 and renders the surface of the anodized sample amphoteric. It was revealed that the 2G ONTs on the Ti-13Zr-13Nb substrate represent the amorphous oxide phase [14].

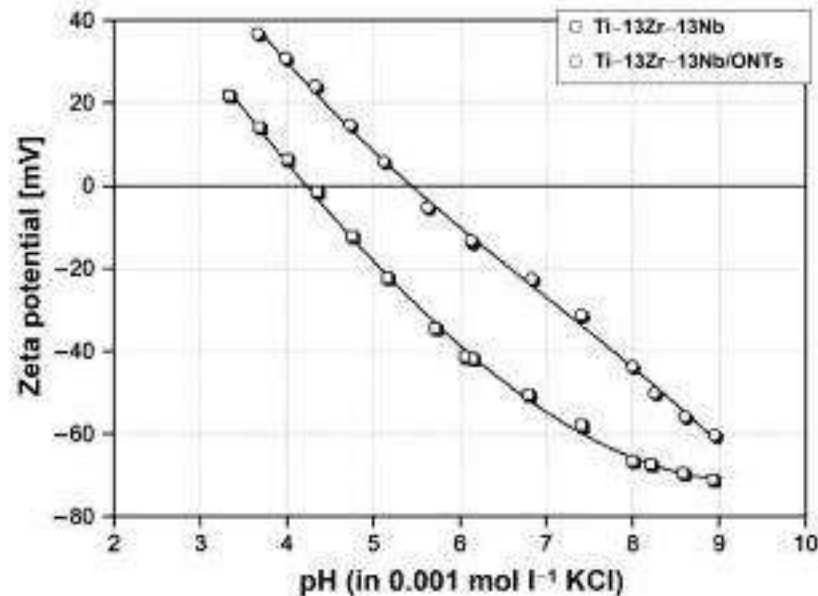


Figure 8. Dependence of electrolyte pH on zeta potential for the Ti-13Zr-13Nb alloy without and with the ONTs layer in 0.001 mol l<sup>-1</sup> KCl.

In the next step, the effect of different buffer solutions on the zeta potential of the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing was compared. Figure 9 shows the zeta potential at pH 7.4 for the tested materials in the presence of 0.001 mol L<sup>-1</sup> KCl, 0.001 mol L<sup>-1</sup> PBS, 0.01 mol L<sup>-1</sup> PBS and 0.01 mol L<sup>-1</sup> artificial blood, respectively. When exchanging the inert 1:1 electrolyte by PBS with comparable ionic strength, a significant increase in the negative  $\zeta$  for the Ti-13Zr-13Nb/ONTs sample while the zeta potential remains almost unaffected for the Ti-13Zr-13Nb sample within the experimental error was found. We thus assumed a strong interaction of phosphate ions with the amorphous oxide surface.

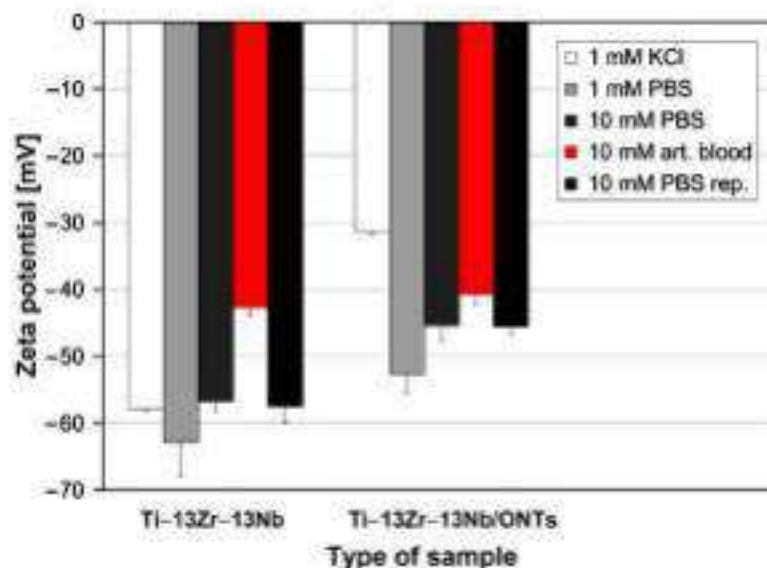


Figure 9. Zeta potential at pH 7.4 for the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing in the presence of different buffer solutions, where the number of experiments for the error bars was  $n = 3$ .

By further increasing the ionic strength of PBS to  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ , a decrease in the zeta potential for samples Ti-13Zr-13Nb and Ti-13Zr-13Nb/ONTs was noted, which follows the prediction of the model of the double layer. Increasing ionic strength compresses the diffuse layer of surface-charge compensation counter-ions and thus reduces the magnitude of the zeta potential. This prediction assumes the absence of selective interaction between the electrolyte ions with the solid surface. An explanation for this observation is simply a smaller slope of the dependence of (negative) zeta potential on the ionic strength [44]. However, when exchanging the PBS buffer with artificial blood, thereby maintaining the ionic strength, a decrease in the negative zeta potential for all samples was found. This decrease is higher for the Ti-13Zr-13Nb sample (25%) as compared to the sample Ti-13Zr-13Nb/ONTs (10%). It was concluded that the complex ions contained in artificial blood have a stronger affinity to hydrophobic surfaces than to more hydrophilic ones.

After completing the analysis in artificial blood, the disk samples were kept mounted in the Adjustable Gap Cell and rinsed with Milli-Q water. The repetitive measurement in the presence of  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  PBS for samples Ti-13Zr-13Nb and Ti-13Zr-13Nb/ONTs confirmed that the adsorption of complex ions contained in artificial blood was fully reversible.

Since the zeta potential at pH 7.4 was negative for all samples and to determine the IEP, as a final measurement step, another titration starting at physiological pH and proceeding towards low pH was performed. Figure 10 shows the results, which confirm that the complex ions contained in the simulated body fluid (SBF) adsorb on the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing and shift the IEP to low pH.

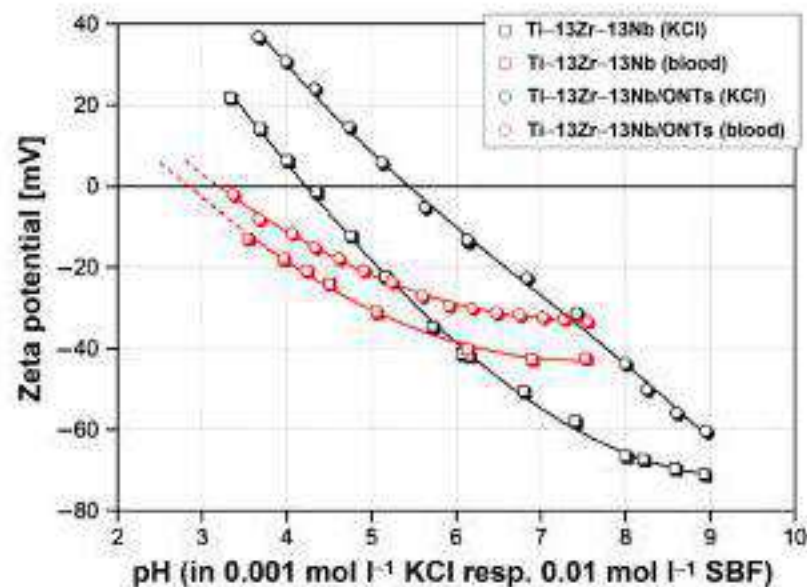


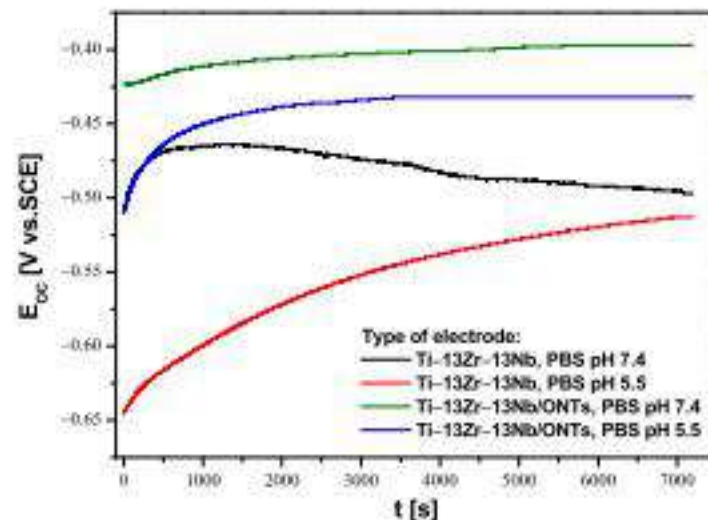
Figure 10. Dependence of electrolyte pH on zeta potential for the Ti-13Zr-13Nb alloy without and with the ONTs layer in  $0.001 \text{ mol L}^{-1}$  KCl and  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  simulated body fluid (SBF).

It is interesting to note that the effect of SBF is smaller for unoxidized Ti-13Zr-13Nb alloy. After finishing the pH titration, the sample disks were rinsed with Milli-Q water, and measurements were repeated for both types of samples in the presence of  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  PBS in order to investigate whether the adsorption of complex ions was reversible or permanent. The corresponding zeta potential at pH 7.4 is shown in Figure 9.

### 3.3. In Vitro Open Circuit Potential Characteristics in Body Fluids

The open circuit potential ( $E_{OC}$ ) parameter was used to determine the initial in vitro corrosion resistance of the Ti-13Zr-13Nb electrode before and after anodizing under conditions similar to those in the human body. Due to the fact that inflammation occurs immediately after implantation, which is associated with a decrease in pH in the acidic

direction in the tissues surrounding the implant, electrochemical  $E_{OC}$  measurements were carried out in the PBS electrolyte at physiological and acidic pH. Changes in pH affect the risk of reduced corrosion resistance of the implant. Therefore, the OCP method was used to assess the protective properties of the obtained 2G ONTs layers on the Ti–13Zr–13Nb alloy. Figure 11 shows the course of  $E_{OC}$  for the Ti–13Zr–13Nb electrode without and with 2G ONTs layer for 2 h of immersion in PBS with pH 7.4 and 5.5 at 37 °C.



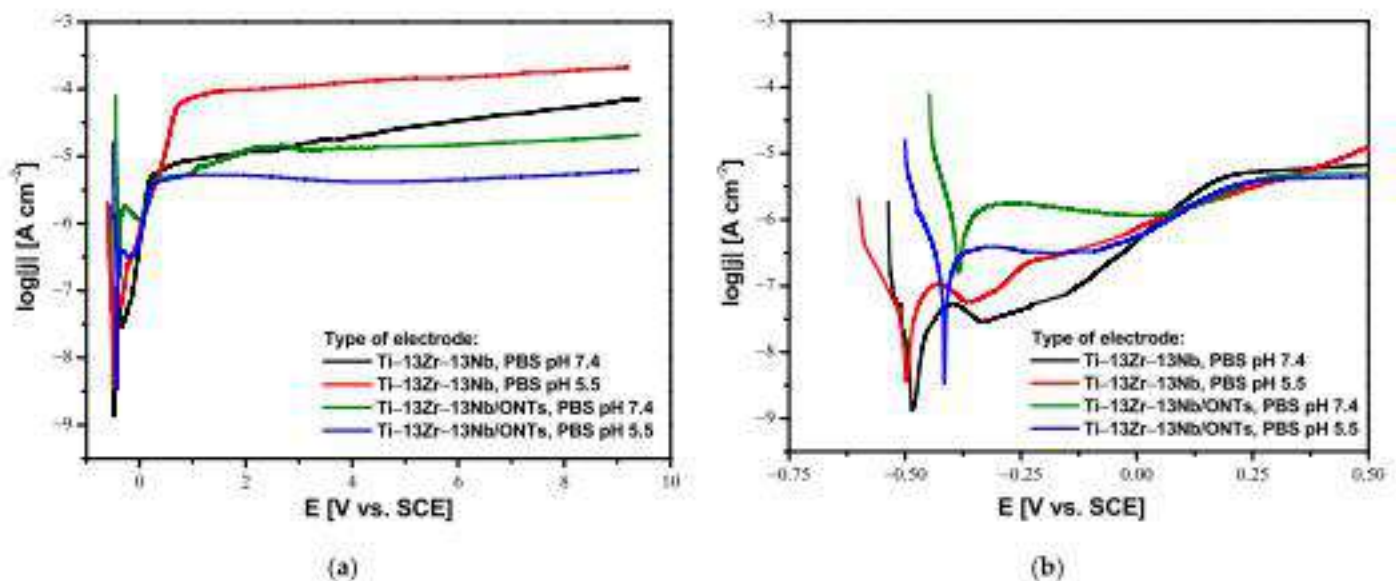
**Figure 11.** Open circuit potential ( $E_{OC}$ ) in the function of immersion time ( $t$ ) for the Ti–13Zr–13Nb electrode without and with 2G ONTs layer in PBS at 37 °C.

The ionic–electron equilibrium at the interfacial boundary between the electrode surface and electrolyte was reached after 7200 s of immersion. It should be noted that  $E_{OC}$  stabilized more slowly on the non-oxidized Ti–13Zr–13Nb electrode in both neutral and acidic PBS. This phenomenon is probably related to the self-passivation of the Ti–13Zr–13Nb electrode surface after immersion in the electrolyte and the thickening of the ultrathin oxide film [23]. In the presence of 2G ONTs layers with protective properties,  $E_{OC}$  stabilization occurred faster. The stabilized  $E_{OC}$  value, treated in further studies as an approximate value of corrosion potential ( $E_{cor}$ ), was negative for all tested electrodes. The non-anodized Ti–13Zr–13Nb electrode showed lower corrosion resistance in PBS in comparison to the Ti–13Zr–13Nb/ONTs electrode in both neutral and acidic electrolytes. Such changes in the  $E_{OC}$  indicate a decrement in the thermodynamic tendency to the corrosion of anodized Ti–13Zr–13Nb electrode. The lowest corrosion resistance was demonstrated by the non-anodized Ti–13Zr–13Nb electrode in PBS of pH 5.5, for which the average value of  $E_{OC}$  was  $-0.513(30)$  V. It means that the increase in the content of aggressive chloride ions in the electrolyte accelerated the corrosion processes. The highest average  $E_{OC}$  of  $-0.397(19)$  V was determined for the Ti–13Zr–13Nb/ONTs electrode in PBS of pH 7.4, which indicates that the obtained 2G ONTs layer has stronger barrier properties as compared to the native oxide layer. These results confirm that the application of the anodizing process under the conditions used can significantly improve the corrosion resistance of the Ti–13Zr–13Nb electrode in body fluids.

### 3.4. In Vitro Susceptibility to Pitting Corrosion in Body Fluids

Analysis of the anodic polarization curves shown in the semi-log form in Figure 12 revealed a similar course for all investigated electrodes with apparent passive anodic behavior. A shift towards cathode potentials for both Ti–13Zr–13Nb and Ti–13Zr–13Nb/ONTs electrodes in acidic PBS is observed as compared to physiological PBS. The reason for this is a decrease in the corrosion resistance caused by an increase in the aggressiveness of the corrosive environment. On the other hand, it can be seen that the production of the 2G ONTs layers by anodizing caused the desired shift of the  $\log |j| = f(E)$  curves towards

anodic potentials in both physiological and acid PBS in comparison with the non-anodized Ti-13Zr-13Nb electrode. In the range of potentials corresponding to the cathode branch with values lower than  $E_{\text{cor}}$ , the tested electrodes are resistant to corrosion. At potentials equal to  $E_{\text{cor}}$ , oxidation processes begin at the anode branch. The higher passive current densities of the order of  $10^{-4} \text{ A cm}^{-2}$  were observed for the Ti-13Zr-13Nb electrode in PBS of pH 5.5, which means the highest corrosion rate among the tested electrodes. The decrease in anodic current densities for the anodized Ti-13Zr-13Nb electrode in both PBS of pH 7.4 and 5.5 is associated with the presence of 2G ONTs layers which are characterized by greater stability as compared to the self-passive oxide layer on the Ti-13Zr-13Nb electrode surface.



**Figure 12.** Anodic polarization curves for the Ti-13Zr-13Nb electrode without and with 2G ONTs layer in physiological and acidic PBS at 37 °C: (a) In the whole range of tested potentials; (b) The inset in the range of potentials corresponding to the cathode-anode transition.

It is worth noting that the Ti-13Zr-13Nb alloy, both before and after anodizing, did not show susceptibility to pitting corrosion because, in the range of the tested potentials up to 9.4 V, there was no breakdown of the oxide layers to the substrate. Registration of anode polarization curves for potentials above 9.4 V was impossible due to the limitations of the apparatus. The obtained results prove the excellent corrosion resistance of the tested biomaterials in environments containing chlorides, which can be proposed for the production of long-term implants. Compared to conventional steel biomaterials, the Ti-13Zr-13Nb alloy, both before and after anodizing, shows exceptional electrochemical properties in PBS solution [42]. An anodic behavior study of different types of stainless steel in PBS solution revealed that drastically lower breakdown potential ( $E_{\text{bd}}$ ) values were observed. At the  $E_{\text{bd}}$  of 0.208 V for AISI 304L and 0.559 V for AISI 316L austenitic stainless steels, as well as 1.120 V for 2205 duplex stainless steel, a sharp increase in current density on anodic polarization curves was observed, indicating much easier destruction of the oxide layer.

#### 4. Conclusions

The obtained results confirm that the proposed conditions of anodizing for Ti-13Zr-13Nb alloy allow for obtaining bamboo-like 2G ONTs layers. It was found that the effect of electrolyte pH on the zeta potential of the examined surfaces occurred. In a neutral aqueous KCl solution, the 2G ONTs layer moves the isoelectric point from 4.2 for the non-anodized Ti-13Zr-13Nb alloy, which is typical for the surface without a functional group to pH of 5.4, which is characteristic for amorphous oxide phase. Comparison of the influence of different

electrolytes such as KCl, PBS and artificial blood on the zeta potential at pH of 7.4 for the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing revealed a strong reaction of calcium anions with amorphous surfaces. The complex ions contained in artificial blood have demonstrated a stronger affinity to the hydrophobic surface before anodizing than the hydrophilic one after electrochemical oxidation. The increase in corrosion resistance of the anodized Ti-13Zr-13Nb electrode in PBS as compared with the non-anodized Ti-13Zr-13Nb electrode was due to the presence of a stable 2G ONTs layer. For both types of electrodes, no susceptibility to pitting corrosion up to 9.4 V was found in potentiodynamic studies.

Knowledge of the surface charge of the biomaterial is of fundamental importance for predicting the biological response of the organism to the implant, especially immediately after the implantation procedure. However, the zeta potential method used in these in vitro studies could not be used in vivo due to technical limitations. Moreover, determination of the breakdown potential of the 2G ONTs layer on the Ti-13Zr-13Nb alloy in PBS was not possible due to the technical limitations of the potentiostat to the tested potential range of 10 V.

The conducted research encourages further research on surface modification of the biomedical Ti-13Zr-13Nb alloy by anodizing in new electrochemical conditions. In the near future, in vitro and in vivo biological tests are planned, which will make it possible to obtain the CE certificate required to implement the developed surface modification technology. Knowledge about the kinetics of drug release from the obtained ONTs will facilitate the future development of personalized implants that are carriers of tissue-forming and therapeutic substances, supporting the process of osseointegration of the implant in the human body.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.L.; methodology, B.L., A.S. and T.L.; investigation, A.S., T.L., K.D., B.C. and P.O.; formal analysis, B.L., A.S., T.L., K.D., B.C. and P.O.; writing—original draft preparation, B.L., A.S., T.L. and P.O.; writing—review and editing, B.C. and K.D.; visualization, A.S., T.L., K.D., B.C. and P.O.; funding acquisition, B.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Anene, F.; Jaafar, C.A.; Zainol, I.; Hanim, M.A.; Suraya, M. Biomedical materials: A review of titanium based alloys. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part C J. Mech. Eng. Sci.* **2020**, *235*, 3792–3805. [\[CrossRef\]](#)
2. *Ti-Based Biomaterials*; MDPI AG: Basel, Switzerland, 2020.
3. *Titanium in Medical and Dental Applications*; Elsevier BV: Amsterdam, The Netherlands, 2018.
4. Ossowska, A.; Zieliński, A.; Supernak, M. Formation of High Corrosion Resistant Nanotubular Layers on Titanium Alloy Ti13Nb13Zr. *Solid State Phenom.* **2011**, *183*, 137–142. [\[CrossRef\]](#)
5. Smolka, A.; Dercz, G.; Rodak, K.; Losiewicz, B. Evaluation of corrosion resistance of nanotubular oxide layers on the Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution. *Arch. Metall. Mater.* **2015**, *60*, 2681–2686. [\[CrossRef\]](#)
6. Ainouche, L.; Hamadou, L.; Kadri, A.; Benbrahim, N.; Bradai, D. Interfacial barrier layer properties of three generations of TiO<sub>2</sub> nanotube arrays. *Electrochim. Acta* **2014**, *133*, 597–609. [\[CrossRef\]](#)
7. Luz, A.R.; de Souza, G.B.; Lepienski, C.M.; Siqueira, C.J.M.; Kuromoto, N.K. Tribological properties of nanotubes grown on Ti-35Nb alloy by anodization. *Thin Solid Film.* **2018**, *660*, 529–537. [\[CrossRef\]](#)
8. Sarraf, M.; Zalnezhad, E.; Bushroa, A.R.; Hamouda, A.M.S.; Rafieerad, A.R.; Nasiri-Tabrizi, B. Effect of microstructural evolution on wettability and tribological behavior of TiO<sub>2</sub> nanotubular arrays coated on Ti-6Al-4V. *Ceram. Int.* **2015**, *41*, 7952–7962. [\[CrossRef\]](#)
9. Stróż, A.; Goryczka, T.; Losiewicz, B. Electrochemical formation of self-organized nanotubular oxide layers on niobium (Review). *Curr. Nanosci.* **2019**, *15*, 42–48. [\[CrossRef\]](#)

10. Losiewicz, B.; Stróż, A.; Osak, P.; Maszybrocka, J.; Gerle, A.; Dudek, K.; Balin, K.; Lukowiec, D.; Gawlikowski, M.; Bogunia, S. Production, Characterization and Application of Oxide Nanotubes on Ti-6Al-7Nb Alloy as a Potential Drug Carrier. *Materials* **2021**, *14*, 6142. [[CrossRef](#)]
11. Stróż, A.; Losiewicz, B.; Zubko, M.; Chmiela, B.; Balin, K.; Dercz, G.; Gawlikowski, M.; Goryczka, T. Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications. *Mater. Charact.* **2017**, *132*, 363–372. [[CrossRef](#)]
12. Stróż, A.; Dercz, G.; Chmiela, B.; Losiewicz, B. Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy with potential use as bone implant. *AIP Conf. Proc.* **2019**, *2083*, 030004. [[CrossRef](#)]
13. Smolka, A.; Rodak, K.; Dercz, G.; Dudek, K.; Losiewicz, B. Electrochemical Formation of Self-Organized Nanotubular Oxide Layers on Ti13Zr13Nb Alloy for Biomedical Applications. *Acta Phys. Pol.* **2014**, *125*, 932–935. [[CrossRef](#)]
14. Stróż, A.; Dercz, G.; Chmiela, B.; Stróż, D.; Losiewicz, B. Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for biomedical applications. *Acta Phys. Pol.* **2016**, *130*, 1079–1080. [[CrossRef](#)]
15. Losiewicz, B.; Skwarek, S.; Stróż, A.; Osak, P.; Dudek, K.; Kubisztal, J.; Maszybrocka, J. Production and Characterization of the Third-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Alloy. *Materials* **2022**, *15*, 2321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Durdu, S.; Cihan, G.; Yalcin, E.; Altinkok, A. Characterization and mechanical properties of TiO<sub>2</sub> nanotubes formed on titanium by anodic oxidation. *Ceram. Int.* **2021**, *47*, 10972–10979. [[CrossRef](#)]
17. Ossowska, A.; Olive, J.-M.; Zielinski, A.; Wojtowicz, A. Effect of double thermal and electrochemical oxidation on titanium alloys for medical applications. *Appl. Surf. Sci.* **2021**, *563*, 150340. [[CrossRef](#)]
18. Ossowska, A.; Zieliński, A.; Olive, J.-M.; Wojtowicz, A.; Szweida, P. Influence of Two-Stage Anodization on Properties of the Oxide Coatings on the Ti-13Nb-13Zr Alloy. *Coatings* **2020**, *10*, 707. [[CrossRef](#)]
19. Handzlik, P.; Gutkowski, K. Synthesis of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy by the electrochemical method. *J. Porous Mater.* **2019**, *26*, 1631–1637. [[CrossRef](#)]
20. Stepień, M.; Handzlik, P.; Fitzner, K. Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on Ti6Al7Nb alloy and their interaction with the simulated body fluid. *J. Solid State Electrochem.* **2016**, *20*, 2651–2661. [[CrossRef](#)]
21. Wu, S.; Wang, S.; Liu, W.; Yu, X.; Wang, G.; Chang, Z.; Wen, D. Microstructure and properties of TiO<sub>2</sub> nanotube coatings on bone plate surface fabrication by anodic oxidation. *Surf. Coat. Technol.* **2019**, *374*, 362–373. [[CrossRef](#)]
22. Losiewicz, B.; Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Stach, S. Effect of autoclaving time on corrosion resistance of sandblasted Ti G4 in artificial saliva. *Materials* **2020**, *13*, 4154. [[CrossRef](#)]
23. Szklarska, M.; Dercz, G.; Simka, W.; Losiewicz, B. A.c. impedance study on the interfacial properties of passivated Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution. *Surf. Interface Anal.* **2014**, *46*, 698–701. [[CrossRef](#)]
24. Aniolek, K.; Losiewicz, B.; Kubisztal, J.; Osak, P.; Stróż, A.; Barylski, A.; Kaptacz, S. Mechanical properties, corrosion resistance and bioactivity of oxide layers formed by isothermal oxidation of Ti-6Al-7Nb alloy. *Coatings* **2021**, *11*, 505. [[CrossRef](#)]
25. Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Ratajczak, P.; Losiewicz, B. Long-Term Assessment of the In Vitro Corrosion Resistance of Biomimetic ACP Coatings Electrodeposited from an Acetate Bath. *J. Funct. Biomater.* **2021**, *12*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dudek, K.; Dulski, M.; Losiewicz, B. Functionalization of the NiTi Shape Memory Alloy Surface by HAP/SiO<sub>2</sub>/Ag Hybrid Coatings Formed on SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> Glass Interlayer. *Materials* **2020**, *13*, 1648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Tanji, A.; Feng, R.; Lyu, Z.; Sakidja, R.; Liaw, P.K.; Hermawan, H. Passivity of AlCrFeMnTi and AlCrFeCoNi high-entropy alloys in Hanks' solution. *Corros. Sci.* **2023**, *210*, 110828. [[CrossRef](#)]
28. Costa, B.C.; Tokuhara, C.; Rocha, L.A.; Oliveira, R.C.; Lisboa-Filho, P.N.; Pessoa, J. Vanadium ionic species from degradation of Ti-6Al-4V metallic implants: In vitro cytotoxicity and speciation evaluation. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *96*, 730–739. [[CrossRef](#)]
29. Osak, P.; Maszybrocka, J.; Zubko, M.; Rak, J.; Bogunia, S.; Losiewicz, B. Influence of Sandblasting Process on Tribological Properties of Titanium Grade 4 in Artificial Saliva for Dentistry Applications. *Materials* **2021**, *14*, 7536. [[CrossRef](#)]
30. Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Losiewicz, B. Effect of amorphous calcium phosphate coatings on tribological properties of titanium grade 4 in protein-free artificial saliva. *Biotribology* **2022**, *32*, 100219. [[CrossRef](#)]
31. Zhang, S.; Qin, J.; Yang, C.; Zhang, X.; Liu, R. Effect of Zr addition on the microstructure and tribological property of the anodization of Ti-6Al-4V alloy. *Surf. Coat. Technol.* **2018**, *356*, 38–48. [[CrossRef](#)]
32. Schneider, S.G.; Nunes, C.A.; Rogero, S.P.; Higa, O.Z.; Bressiani, J.C. Mechanical properties and cytotoxic evaluation of the Ti-13Nb-13Zr alloy. *Biomecânica* **2000**, *8*, 84–87. [[CrossRef](#)]
33. Lee, T. Variation in Mechanical Properties of Ti-13Nb-13Zr Depending on Annealing Temperature. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 7896. [[CrossRef](#)]
34. Davidson, J.A.; Kovacs, P. New Biocompatible, Low Modulus Titanium Alloy for Medical Implants. U.S. Patent No. 5,169,597, 8 December 1992.
35. Lee, M.; Kim, I.-S.; Moon, Y.H.; Yoon, H.S.; Park, C.H.; Lee, T. Kinetics of Capability Aging in Ti-13Nb-13Zr Alloy. *Crystals* **2020**, *10*, 693. [[CrossRef](#)]
36. ISO 13099-1:2012; Colloidal Systems—Methods for Zeta Potential Determination—Part 1: Electroacoustic and Electrokinetic Phenomena. International Organization for Standardization (ISO): Geneva, Switzerland, 2012.
37. ISO 13099-2:2012; Colloidal Systems—Methods for Zeta Potential Determination—Part 2: Optical Methods. International Organization for Standardization (ISO): Geneva, Switzerland, 2012.

38. ISO 13099-3:2012; Colloidal Systems—Methods for Zeta Potential Determination—Part 3: Acoustic Methods. International Organization for Standardization (ISO): Geneva, Switzerland, 2012.
39. Lorenzetti, M.; Gongadze, E.; Kulkarni, M.; Junkar, I.; Igljić, A. Electrokinetic Properties of TiO<sub>2</sub> Nanotubular Surfaces. *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, *11*, 378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Lorenzetti, M.; Luxbacher, T.; Kobe, S.; Novak, S. Electrokinetic behaviour of porous TiO<sub>2</sub>-coated implants. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26*, 191. [[CrossRef](#)]
41. ASTM F1713-08(2021)e1; Standard Specification for Wrought Titanium-13Niobium-13Zirconium Alloy for Surgical Implant Applications (UNS R58130). ASTM: West Conshohocken, PA, USA, 2021.
42. Gudić, S.; Nagode, A.; Šimić, K.; Vrsalović, L.; Jozić, S. Corrosion Behavior of Different Types of Stainless Steel in PBS Solution. *Sustainability* **2022**, *14*, 8935. [[CrossRef](#)]
43. Liu, L.; Qiu, C.L.; Chen, Q.; Zhang, S.M. Corrosion behavior of Zr-based bulk metallic glasses in different artificial body fluids. *J. Alloys Compd.* **2006**, *425*, 268–273. [[CrossRef](#)]
44. Ferraris, S.; Cazzola, M.; Peretti, V.; Stella, B.; Spriano, S. Zeta Potential Measurements on Solid Surfaces for in Vitro Biomaterials Testing: Surface Charge, Reactivity upon Contact with Fluids and Protein Adsorption. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2018**, *6*, 60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



## Article

# Production and Characterization of the Third-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Alloy

Bożena Losiewicz <sup>1,\*</sup>, Sandra Skwarek <sup>1</sup>, Agnieszka Stróż <sup>1</sup>, Patrycja Osak <sup>1</sup>, Karolina Dudek <sup>2</sup>, Julian Kubisztal <sup>1</sup> and Joanna Maszybrocka <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Science and Technology, Institute of Materials Engineering, University of Silesia in Katowice, 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland; sandraskwarek99@gmail.com (S.S.); agnieszka.stroz@us.edu.pl (A.S.); patrycja.osak@us.edu.pl (P.O.); julian.kubisztal@us.edu.pl (J.K.); joanna.maszybrocka@us.edu.pl (J.M.)

<sup>2</sup> Refractory Materials Division, Institute of Ceramics and Building Materials, Łukasiewicz Research Network, Toszecka 99, 44-100 Gliwice, Poland; k.dudek@icimb.pl

\* Correspondence: bozena.losiewicz@us.edu.pl; Tel.: +48-32-3497-527

**Abstract:** In the group of vanadium-free titanium alloys used for applications for long-term implants, the Ti-13Zr-13Nb alloy has recently been proposed. The production of a porous layer of oxide nanotubes (ONTs) with a wide range of geometries and lengths on the Ti-13Zr-13Nb alloy surface can increase its osteoinductive properties and enable intelligent drug delivery. This work concerns developing a method of electrochemical modification of the Ti-13Zr-13Nb alloy surface to obtain third-generation ONTs. The effect of the anodizing voltage on the microstructure and thickness of the obtained oxide layers was conducted in 1 M C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> + 4 wt% NH<sub>4</sub>F electrolyte in the voltage range 5–35 V for 120 min at room temperature. The obtained third-generation ONTs were characterized using SEM, EDS, SKP, and 2D roughness profiles methods. The preliminary assessment of corrosion resistance carried out in accelerated corrosion tests in the artificial atmosphere showed the high quality of the newly developed ONTs and the slight influence of neutral salt spray on their micromechanical properties.

**Keywords:** anodizing; biomaterials; corrosion resistance; oxide nanotubes; Ti-13Zr-13Nb alloy



**Citation:** Losiewicz, B.; Skwarek, S.; Stróż, A.; Osak, P.; Dudek, K.; Kubisztal, J.; Maszybrocka, J. Production and Characterization of the Third-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Alloy. *Materials* **2022**, *15*, 2321. <https://doi.org/10.3390/ma15062321>

Academic Editor: Chao Xu

Received: 24 February 2022

Accepted: 16 March 2022

Published: 21 March 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 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 (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The long-term implant market mainly includes the commercially pure titanium (Cp Ti) and Ti-6Al-4V two-phase ( $\alpha + \beta$ ) alloy [1–9]. However, the use of toxic alloying additives such as Al and V has been shown to pose a health risk to patients due to their harmful properties, including the induction of allergies, inflammation, Alzheimer's disease, neuropathy, and more [4,10]. Titanium-based implants containing toxic vanadium are gradually being replaced by vanadium-free titanium alloys containing more biocompatible alloying additives in the form of Mo, Nb, Zr, and Ta, which can also stabilize the  $\beta$  structure in titanium [11–15].

In the group of vanadium-free titanium alloys for long-term implants, the Ti-13Zr-13Nb two-phase ( $\alpha + \beta$ ) alloy has recently been proposed, which reveals the self-passivation ability, high biocompatibility, and corrosion resistance in the human body [5,15]. The use of alloying elements such as Nb and Zr influences the stabilization of the  $\beta$  phase and the reduction of Young's modulus, preventing the shielding effect [4]. The elastic modulus for the Ti-13Zr-13Nb alloy of 79 GPa is closer to that for the bone with a viscoelastic composite microstructure (10–30 GPa) compared to the Ti-6Al-4V alloy (110 GPa) [5]. The mechanical properties of the Ti-13Zr-13Nb alloy and oxide nanotubes formed on its surface by anodizing can be characterized using the nanoindentation method [16,17]. Specifically, knowledge about Young's modulus to resist deformation should be important to the intelligent drug delivery systems. However, there are limitations to the use of

the heat treatment of Ti-13Nb-13Zr alloy through the capability aging (CA) treatment recommended by the ASTM standard, which allows for the evolution of the microstructure and changes in mechanical compatibility [18]. Mechanical strength and Young's modulus increase with increasing CA time, whereas ductility decreases due to the decomposition of  $\alpha'$  martensite into the  $(\alpha + \beta)$  structure, especially with hard  $\alpha$  precipitates. The authors suggest the intrinsic limit of the static heat treatment of the Ti-13Zr-13Nb alloy, which is a disadvantageous phenomenon for biomedical applications requiring high strength and a low Young's modulus. Thus, other processing methods are sought that can provide mechanical reinforcement without precipitation of the hard  $\alpha$  phase.

Currently, intensive research is carried out to develop innovative surface modification methods of the biomedical Ti-13Zr-13Nb alloy to increase its bioactivity, biocompatibility, and long-term stability [15–41]. Electrochemical modification can carry out additional functionalization of the Ti-13Zr-13Nb alloy surface, increasing its osteoinductive properties for applications in regenerative medicine and intelligent drug delivery systems [29]. Innovative methods of obtaining multifunctional chitosan-based coatings on the smooth and porous surface of the Ti-13Zr-13Nb alloy using the electrophoretic deposition method (EPD) have been developed [18]. It has been reported that composite chitosan-copper nanoparticles obtained by a one-step EPD with the addition of a dispersing agent reveal strong adhesion, high corrosion resistance, and improved mechanical and antimicrobial properties [20]. Composite chitosan-nanosilver coatings obtained by cataphoretic deposition are characterized by increased surface bioactivity and antibacterial properties [21]. Many efforts have also been made by Barański and co-authors towards the development of EPD technology for the production of nanohydroxyapatite-based coatings with a chemical composition similar to that of the surrounding tissues and showing antibacterial activity [22–27]. The addition of nanosilver and nanocopper dispersed in the nanohydroxyapatite coatings on the Ti-13Zr-13Nb substrate increases corrosion resistance and hydrophilicity. Both nanometals together effectively kill bacteria and inhibit biofilm growth. The nanocopper improves the mechanical stability of nanohydroxyapatite coatings. Bioactive calcium-phosphate coatings containing oxide layers formed during the micro-arc oxidation process on the Ti-13Zr-13Nb alloy produced by the selective laser melting are also obtained [28,29]. The porous Ti-13Zr-13Nb scaffold with designed porosity and no harmful effects is also developed using powder metallurgy with and without space holders and SLM methods. Electrochemical oxidation, gaseous oxidation, and chemical oxidation, as well as hydroxyapatite deposition, are applied to its surface modification [30]. The obtained coatings of high-performance structures can support the regeneration process by stimulating the reconstruction of the tissues surrounding the implant, limiting the occurrence of inflammation and of the risk of releasing harmful metal ions from the implant surface to the body. They can also be a source of tissue-forming elements and act as a carrier of medicinal substances.

A self-passive oxide layer on the Ti-13Zr-13Nb alloy surface and its electrochemical properties play an essential role in the long-term implantation [15]. The biocompatible properties of the Ti-13Nb-13Zr alloy can be additionally improved by creating a porous oxide layer on its surface using electrochemical methods [31–41]. Obtaining a porous surface of the Ti-13Zr-13Nb alloy enables the development of innovative long-term implants with increased osteoinductive properties. Recently, it was reported that the oxide nanotubes (ONTs) layer on the surface of titanium and its alloys could also be a carrier for drugs delivered to a specific place and enable their controlled release into the body at a specific rate, depending on the size of the nanotubes [12]. Due to their eluting properties, the ONTs can act as micro- or nano-syringes filled with medicinal, bactericidal, or tissue-forming substances. Electrochemical modification of the Ti-13Zr-13Nb alloy surface may significantly improve the effectiveness of implantological treatment. For this reason, Ossowska and co-authors obtained thin hybrid oxide coatings with a crystalline and nanotubular structure, which were on the Ti-13Zr-13Nb alloy in two-stage oxidation consisting of thermal and electrochemical oxidation processes [31,32]. Oxide layers on the Ti-13Zr-13Nb substrate formed in two-stage anodization in phosphoric acid (first stage) and the presence of hydrofluoric

acid (second stage) were also the subject of their research [33]. An attempt was made to oxidize the solid and porous Ti-13Zr-13Nb alloy in  $H_3PO_4$  with the addition of HF to form high corrosion-resistant nanotubular layers [34,35]. The ONTs with controlled morphology, length, and diameter on the Ti-13Nb-13Zr alloy were also obtained by anodizing room temperature in hydrofluoric acid solution [36], in  $(NH_4)_2SO_4 + NH_4F$  solution [37–40], and in ethylene glycol solution with the addition of  $NH_4F$  [41].

Preliminary research has shown that it is possible to produce biocompatible third-generation ONTs on the surface of the Ti-13Nb-13Zr alloy in a 1 M ethylene glycol solution with the addition of 4%  $NH_4F$  by anodizing at 50 V for 80 min at room temperature [41]. The results of structural and microscopic studies confirmed the possibility of obtaining single-wall oxide nanotubes (SWNTs) under the proposed electrochemical oxidation conditions. The morphological parameters of the obtained amorphous SWNTs were determined, such as the length ( $\sim 10 \mu m$ ) and the external (362 nm) and internal (218 nm) diameter of the nanotube. The formed nanotubes consisted of oxides of alloying elements, such as  $TiO_2$ ,  $Nb_2O_5$ ,  $ZrO_2$ , and  $ZrO_x$ . It was revealed that the hemolysis of the Ti-13Nb-13Zr alloy was eliminated, and its ability to osseointegrate was increased by forming an amorphous layer of SWNTs. The quantitative characteristics of the kinetics of the corrosion process of the obtained SWNTs with the simultaneous characterization of the capacitive properties of the system were carried out using the electrochemical impedance spectroscopy method, which showed a slight decrease in its corrosion resistance in saline solution compared to the Ti-13Zr-13Nb alloy.

The present work continues preliminary research on the functionalization of the Ti-13Zr-13Nb alloy surface by obtaining the third-generation SWNTs to develop innovative long-term implants [41]. In this work, new voltage–time conditions for SWNT production on the Ti-13Zr-13Nb alloy by anodizing in a 1 M ethylene glycol solution with the addition of 4%  $NH_4F$  are proposed, which have not been described in the literature. For the first time, a wide range of anodizing voltages from 5 to 35 V for 2 h was used in 1 M  $C_2H_6O_2 + 4 \text{ wt\% } NH_4F$  electrolyte. The increased concentration of  $F^-$  ions, up to 4 wt%, was aimed at increasing their activity in the anodizing process. The physicochemical characteristics of the obtained SWNTs included research on their microstructure, chemical composition, thickness, contact potential difference, and surface roughness. The long-term corrosion resistance of the newly obtained SWNTs and the comparative Ti-13Zr-13Nb substrate to the effect of neutral salt spray (NSS) in a salt chamber was tested. The influence of NSS on the micromechanical properties of the tested materials was assessed in the microhardness measurements.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Substrate Preparation

The substrate was Ti-13Zr-13Nb (wt%) alloy (BIMO TECH, Wrocław, Poland) in 5 mm thick discs with a 15 mm radius. The chemical, mechanical, and metallurgical requirements for wrought Ti-13Zr-13Nb alloy bars and wires to be used in the manufacture of surgical implants are described in ASTM F1713-08(2021)e1 standard [42]. A mirror-like surface of the samples was obtained with a polishing machine at 250 rpm using silicon carbide (SiC) abrasive papers of 600, 1200, 3000, and 5000 gradations (Struers Inc., Cleveland, OH, USA). The polished samples were cleaned in two stages in an ultrasonic bath with acetone (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland) and then with ultrapure water (Milli-Q Advantage A10 Water Purification System, Millipore SAS, Molsheim, France) for 20 min each at room temperature.

### 2.2. Production of SWNTs on Ti-13Zr-13Nb Alloy

The method of preparing the electrodes is described in detail in an earlier work [12]. To remove oxides from the Ti-13Zr-13Nb alloy surface, immediately before anodizing, each electrode with a geometric surface area of  $3.14 \text{ cm}^2$  was immersed in 25% v/v  $HNO_3$  (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland) for 10 min at room tem-

perature and then re-cleaned with Milli-Q water in an ultrasonic bath for 20 min at room temperature.

The SWNTs on the Ti-13Zr-13Nb alloy were produced by one-step anodizing in 1 M  $C_2H_6O_2$  solution with 4 wt% content of  $NH_4F$  at room temperature using a PWR800H high-current power supply (Kikusui Electronics Corporation, Yokohama, Japan). Ethylene glycol (anhydrous, 99.8%) and ammonium fluoride ( $\geq 99.99\%$  trace metals basis) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). The electrochemical oxidation was carried out at a voltage ( $U$ ) in the range of 5–35 V with step 5 V and a time ( $t$ ) for 120 min. A two-electrode system that was used is described in [38]. After anodizing was completed, each anode was placed in vigorously stirred Milli-Q water for 5 min.

### 2.3. Physicochemical Characteristics of SWNTs on Ti-13Zr-13Nb Alloy

To determine the microstructure of the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing, the TESCAN Mira 3 LMU scanning electron microscope (SEM, TESCAN ORSAY HOLDING, Brno-Kohoutovice, Czech Republic) was used. Images were collected by secondary electrons (SE). The measurements were carried out on the samples covered by a chromium layer using Quorum Q150T ES equipment (Quorum Technologies, East Sussex, UK). Chemical composition was analysed using SEM combined with an Energy Dispersive Spectrometer (EDS, Oxford Instruments, Abingdon, UK).

The scanning Kelvin probe (SKP) method was used to determine the thickness of the obtained SWNTs and their local contact potential difference ( $V_{CPD}$ ) in the air using the PAR Model 370 Scanning Electrochemical Workstation (Princeton Applied Research, Oak Ridge, TN, USA). The tip of the tungsten microprobe was held above the sample surface at a distance of approx. 100  $\mu m$ . The SWNTs layers' thickness measurements were carried out in a linear scan mode over a 4000  $\mu m$ -long section, including the exposed substrate and the produced oxide layer. To determine the  $V_{CPD}$ , an area of 1000  $\times$  1000  $\mu m^2$  was scanned. The tip-sample system was considered a capacitor, and the  $V_{CPD}$  was determined from the difference of the work function for the tested sample and the tip, as described in [6].

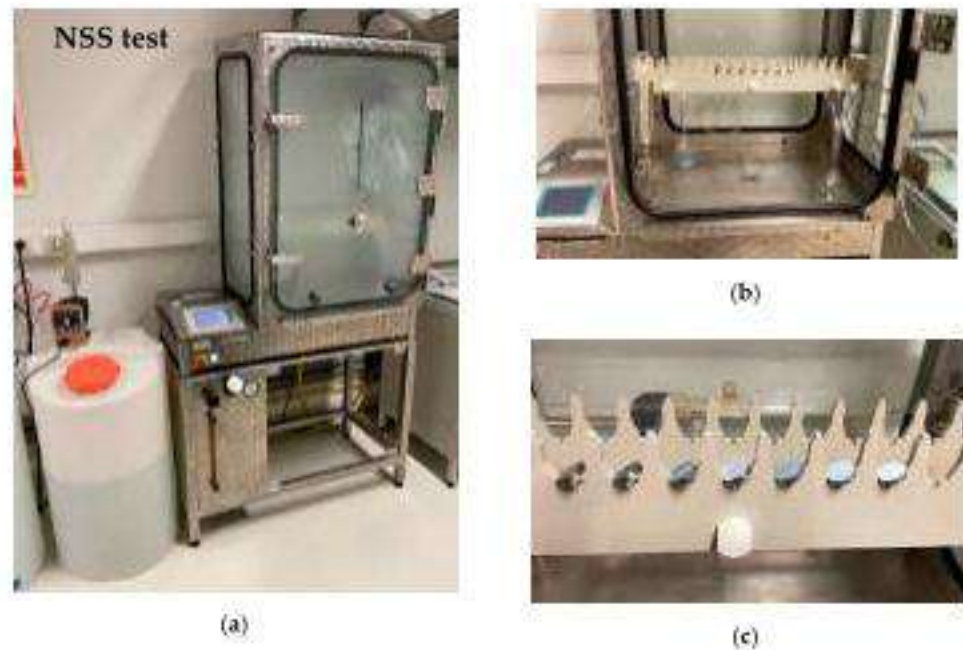
The surface roughness of the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing was studied by the Mitutoyo SurfTest SJ-500/P profilometer (Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). To measure changes in the surface profile, a measuring step of 0.1  $\mu m$  and a speed of 200  $\mu m s^{-1}$ , over a length of approx. 5 mm, were used. The surface texture parameters were registered according to ISO 4287 [43]. The processing and development of the recorded parameters were carried out using the FORMTRACEPAK computer program.

### 2.4. Corrosion Test of SWNTs on Ti-13Zr-13Nb Alloy in Artificial Atmosphere

The SWNTs on the Ti-13Zr-13Nb alloy were tested according to ISO 9227:2017 in the NSS test [44]. The universal HKS 400 salt spray chamber (KÖHLER Automobiltechnik GmbH, Lippstadt, Germany) during the NSS test is shown in Figure 1a. Sodium chloride of recognized analytical grade (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland) and Milli-Q water were used to prepare a 5% NaCl solution.

Two collecting devices were placed in the salt chamber, consisting of glass funnels with feet inserted into flat-bottomed glass flasks with volumes of 500  $cm^3$  (Figure 1b). Funnels with a diameter of 100 mm were used with a collection area of approx. 80  $cm^2$ . The collecting devices were located in the chamber where the test specimens were placed, one near the spray inlet and one away from the inlet. The collecting devices were positioned in such a way that only salt spray was collected and not liquid dripping from the samples or the chamber components.

Before starting the NSS test, the samples were acclimatized for 24 h at a temperature of 25(2)  $^{\circ}C$  and a relative air humidity of 50(5)%. The specimens were placed face up at an angle of 20(5)  $^{\circ}C$  to the vertical in the NSS-resistant holders to prevent the salt spray from falling directly onto the test specimens (Figure 1c).



**Figure 1.** The HKS 400 salt spray chamber during the NSS test according to ISO 9227:2017 [44]: (a) Arrangement of collecting devices in the salt chamber; (b) Method of mounting the test samples in the holder (c).

The operating parameters of the salt chamber are presented in Table 1. The extended uncertainty of the determined parameters was estimated for a confidence level of about 95%.

**Table 1.** Salt spray chamber operating parameters in the NSS test according to ISO 9227-2017 [44].

Parameter	Value
NaCl concentration (collected solution)	52.4(6) g L <sup>-1</sup>
pH (collected solution)	6.6(1)
test temperature	34.8(7) °C
test time	168.0(1) h
average collection rate for a horizontal collecting area of 80 cm <sup>2</sup>	1.4(1) mL h <sup>-1</sup>

After removing the salt chamber, the samples were gently washed with Milli-Q water and air-dried for 24 h. The surface condition of the samples, after the NSS test, was assessed visually.

### 2.5. Micromechanical Properties of SWNTs on Ti-13Zr-13Nb Alloy

The microhardness of the tested samples was measured before and after the NSS test by the Vickers method with a hardness scale of HV = 0.1 using a Wilson<sup>®</sup>-Wolpert<sup>TM</sup> Microindentation Tester 401MVD (Wilson Instruments, LLC, Carthage, TX, USA). A regular, quadrilateral diamond pyramid with a dihedral angle  $\alpha = 136^\circ$  was used as the indenter under load  $F$  perpendicular to the tested sample surface. According to the ISO 6507-1 standard [45], the result of the measurement was the diagonal of the obtained square imprint. The method for checking and calibrating the hardness testers and the diagonal of the measuring system used for the Vickers hardness measurement is available in ISO 6507-2 [46]. The calibration method of reference standards for the indirect checking of Vickers hardness testers for indentations  $\geq 0.020$  mm is described in ISO 6507-3 [47].

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Formation of SWNTs on Ti-13Zr-13Nb Alloy

The current transients corresponding to the anodizing of Ti-13Zr-13Nb electrode in fresh electrolyte of 1 M C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> containing 4 wt% NH<sub>4</sub>F are shown in Figure 2. It can be observed that an increase in the anodizing potential causes an increase in the current density recorded during the electrochemical oxidation process. The shape of the obtained curves is not similar to the current transients observed in the literature for forming ordered titania nanotubes in an ethylene glycol electrolyte without and with the addition of 0.13–1 wt% water in the presence of fluoride ions [48]. In Figure 2, the behavior of the anodic current density as a function of time shows similarity to the current transient observed for the Ti-13Zr-13Nb electrode during anodizing in 0.5 wt% HF [36] and in 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0.5 wt% NH<sub>4</sub>F [37] electrolytes. The typical initial decay and the increase in the anodic current density before reaching the quasi-steady-state value are observed in 1 M C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> electrolyte containing 4 wt% NH<sub>4</sub>F. The inset of Figure 2b for the first 80 s of anodizing shows that the quasi-steady-state conditions are achieved more quickly with increasing anodizing voltage.

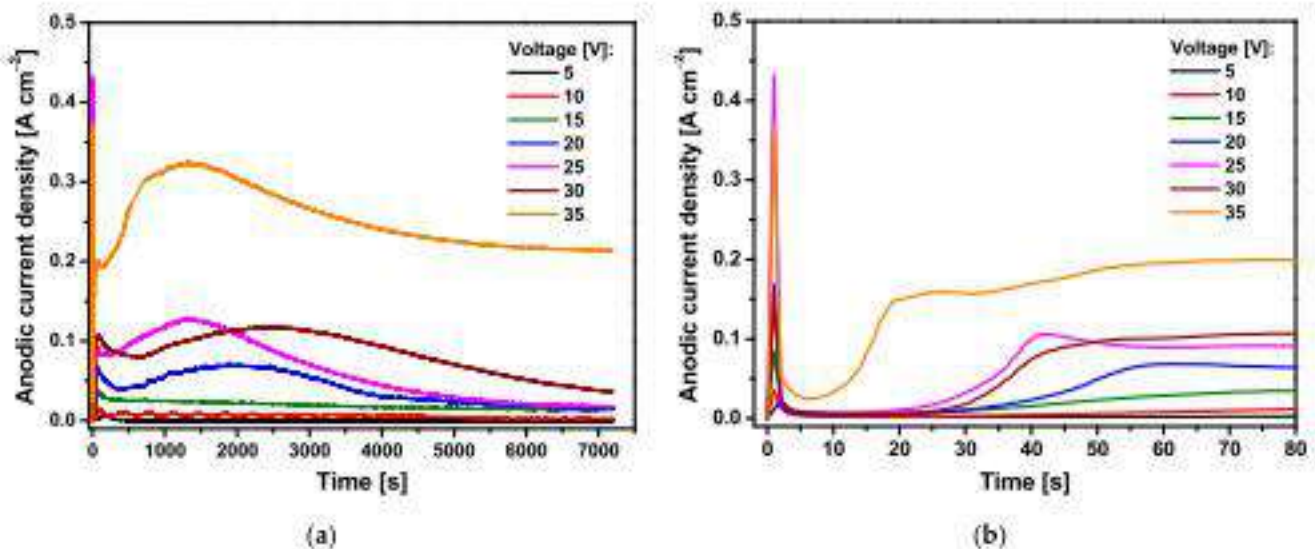
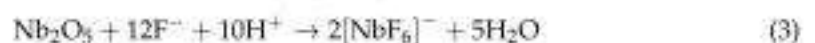
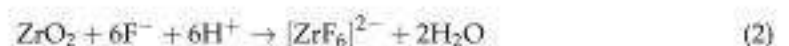
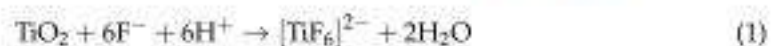


Figure 2. Current transients for the Ti-13Zr-13Nb electrode in 1 M C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> + 4 wt% NH<sub>4</sub>F electrolyte during anodizing for: (a) 7200 s; (b) first 80 s.

Such a course of current transients is related to various stages of the process of pore formation on the surface of the Ti-13Zr-13Nb alloy. In the first anodizing stage, an oxide layer with strong barrier properties is created, the presence of which is evidenced by a decrease in the anodic current density. In the next stage, the oxide surface is locally activated due to the activity of fluoride ions, and the pores formed randomly increase their size. As a result of the growth of pores, the active surface is increased, which causes an increase in the anodic current density. In the last stage, the resulting pores share the available current evenly among themselves, and the process of self-assembly under steady-state conditions takes place.

SWNTs can be produced electrochemically on the surface of the Ti-13Zr-13Nb electrode in 1 M C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> electrolyte in the presence of F<sup>−</sup> ions, which can form water-soluble complexes with Ti, Zr, and Nb according to the Reactions (1)–(3) [11,12,49,50]:



Under the influence of the electric field, the fluoride ions migrate deep into the formed oxide layer.  $F^-$  ions compete with  $O^{2-}$  ions and cause the local dissolution of the oxide layer. Simultaneously, the fluoride ions inhibit the deposition of titanium hydroxides on the oxide layer. Reaction (4) describes the complexation of  $Ti^{4+}$  ions, which migrate to the oxide surface and are ejected at the interface [12,49,50]:



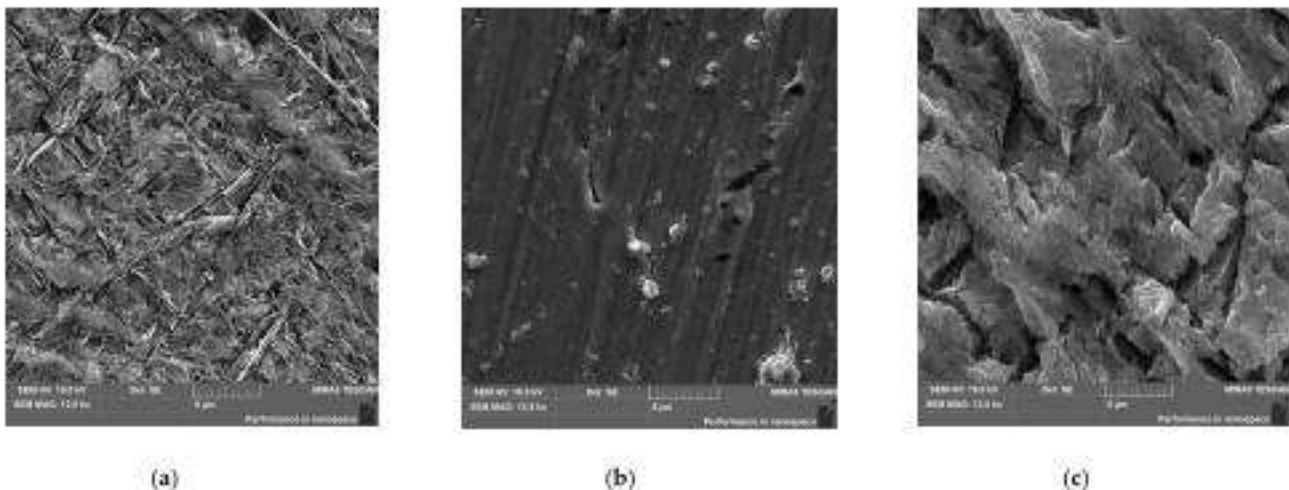
The release of oxygen from water occurs according to Reaction (5) [12,49,50]:



A detailed mechanism of SWNTs formation on titanium and its alloys has been described previously in [12,49,50].

### 3.2. SEM Study of Microstructure

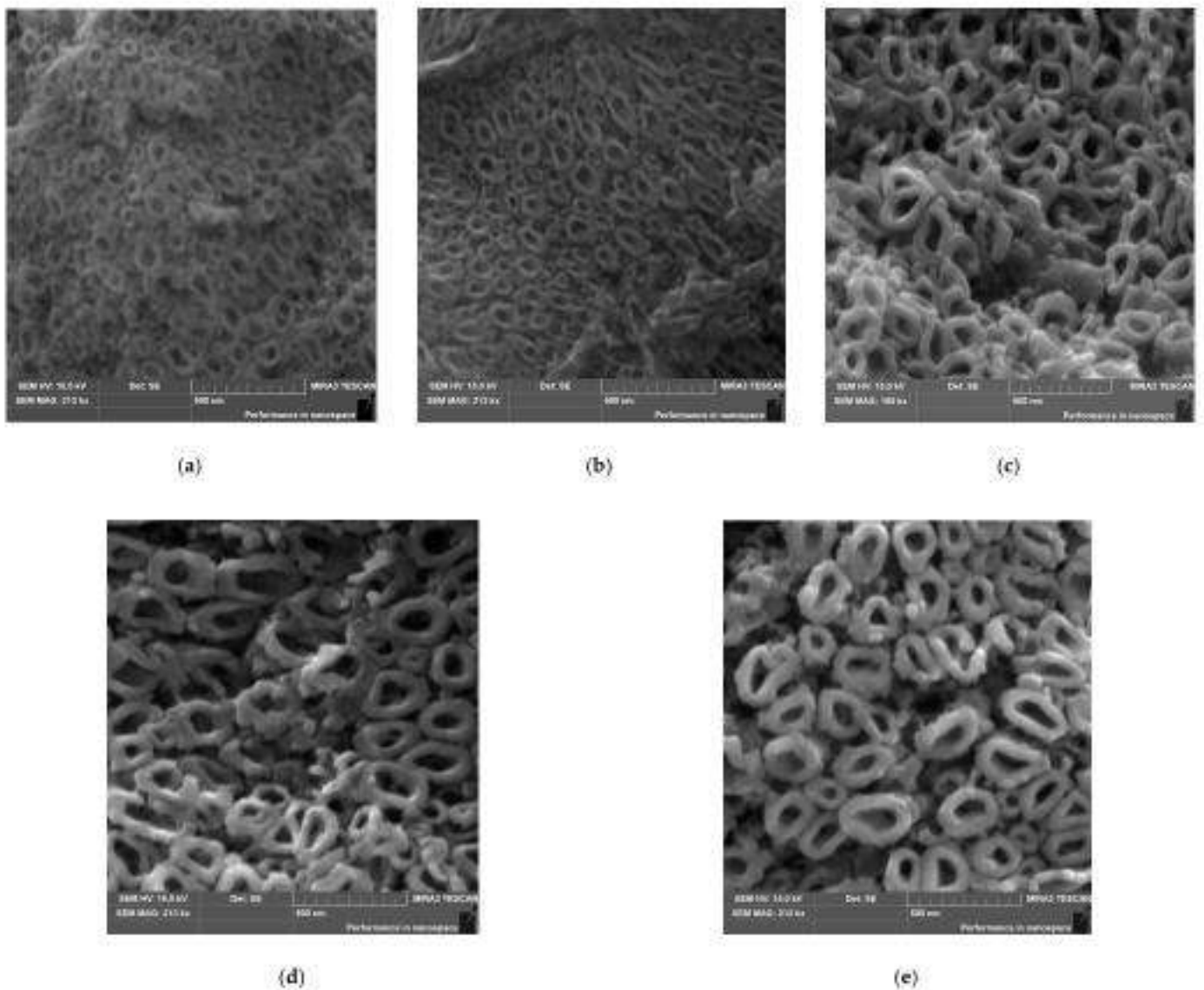
Figure 3a shows an SEM image of the microstructure of the biomedical Ti-13Nb-13Zr alloy before anodizing. The surface of this bi-phase alloy composed of a mixture of  $\alpha$  and  $\beta$  phases was previously etched for a few seconds in the Kroll's reagent consisting of Milli-Q water, hydrofluoric acid, and nitric acid [41]. One can see the typical acicular martensitic  $\alpha'$  laths arranged in various directions and embedded in the  $\beta$  matrix [33].



**Figure 3.** SEM image of the microstructure of the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing in 1 M  $C_2H_6O_2 + 4$  wt%  $NH_4F$  electrolyte: (a) Etched; (b) Anodized at 5 V for 120 min; (c) Anodized at 10 V for 120 min.

The microstructure of the Ti-13Zr-13Nb alloy after anodizing in 1 M  $C_2H_6O_2 + 4$  wt%  $NH_4F$  electrolyte at the lowest voltage of 5 V reveals the presence of the oxide layer, which is characterized by a lack of the nanotubular structure despite the long anodizing time of 120 min (Figure 3b). The poorly developed surface morphology of the thin oxide layer with fine microcracks is visible, reflecting the structure of the polished substrate. Increasing the anodizing voltage to 10 V resulted in obtaining a porous surface of the oxide layer, showing intense cracking and greater thickness (Figure 3c). However, the presence of oxide nanotubes is still not observed.

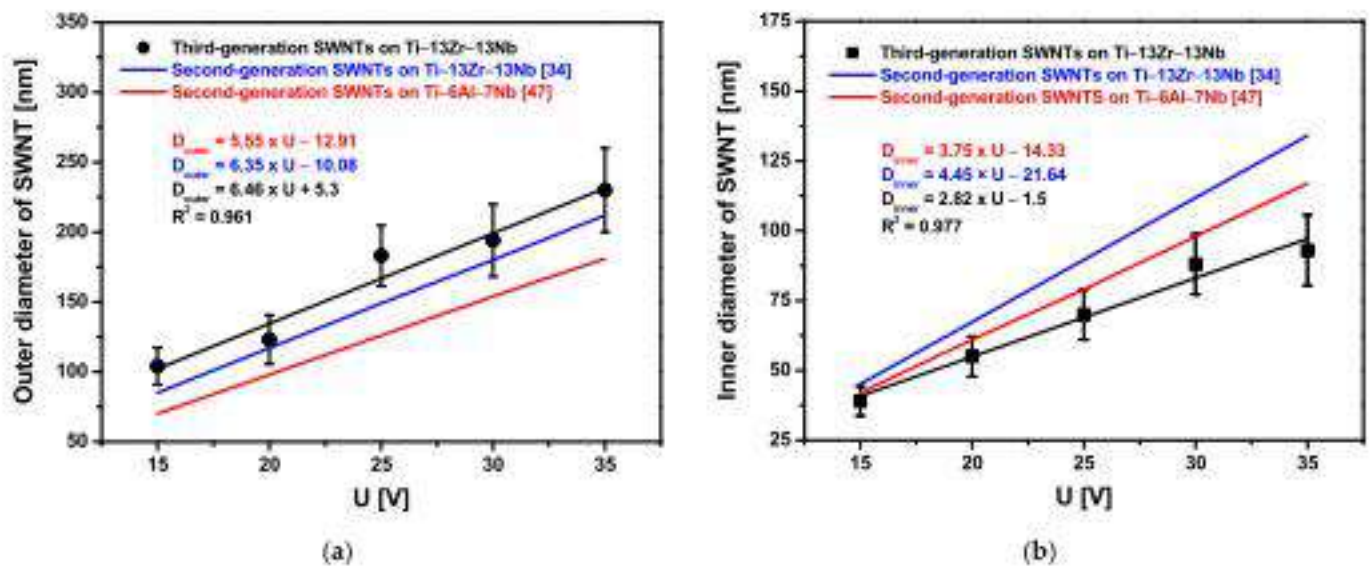
The SEM images of an on-top general view of the Ti-13Zr-13Nb alloy anodized at voltages within the range of 15 to 35 V for 120 min present the microstructure of oxide layers with a parallel arrangement of the SWNTs (Figure 4). The SWNTs with an elliptical cross-sectional shape and smooth walls are evenly distributed over the surface of the oxide layers. The diameter of the obtained third-generation oxide nanotubes and their order increase with the anodizing voltage.



**Figure 4.** SEM image of the microstructure of SWNTs layer formed on the Ti-13Zr-13Nb alloy in 1 M  $C_2H_6O_2 + 4$  wt%  $NH_4F$  electrolyte under anodizing conditions: (a) 15 V for 120 min; (b) 20 V for 120 min; (c) 25 V for 120 min; (d) 30 V for 120 min; (e) 35 V for 120 min.

Based on the SEM images of the microstructure, it was found that the outer diameter ( $D_{outer}$ ) varied from 104(13) nm, for the Ti-13Zr-13Nb alloy anodized at 15 V, to 230(30) nm, for the sample oxidized at 35 V (Figure 5). The inner diameter ( $D_{inner}$ ) changed from 39(5) to 93(13) nm. Both  $D_{outer}$  and  $D_{inner}$  increased linearly with increasing anodizing voltages, with more than twice the growth rate observed for  $D_{outer}$ . The linear equations describing the change of the SWNTs diameters as a function of the anodizing voltage are presented in Figure 5. Comparing these equations with the equations determined for second-generation SWNTs on the Ti-13Zr-13Nb alloy [37] and second-generation SWNTs on the Ti-6Al-7Nb alloy [50] obtained by anodizing for 120 min in 1 M  $(NH_4)_2SO_4 + 0.5$  wt%  $NH_4F$  shows that  $D_{outer}$  growth is the fastest for third-generation SWNTs on the Ti-13Zr-13Nb alloy in 1 M  $C_2H_6O_2 + 4$  wt%  $NH_4F$  electrolyte, whereas  $D_{inner}$  growth is the slowest. The obtained results indicate that the thickest walls characterize third-generation SWNTs on the Ti-13Zr-13Nb alloy. The derived linear equations can be used in the future to obtain SWNTs on the Ti-13Zr-13Nb alloy with the assumed morphological parameters (Figure 5).





**Figure 5.** The oxide nanotube diameter on the Ti-13Zr-13Nb alloy surface as a function of anodizing voltage (U) for 120 min in 1 M C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> + 4 wt% NH<sub>4</sub>F electrolyte: (a) Outer diameter (D<sub>outer</sub>); (b) Inner diameter (D<sub>i</sub>).

Figure 6 shows the thickness (L) of the oxide layers formed on the Ti-13Zr-13Nb alloy surface formed during anodizing in 1 M C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> + 4 wt% NH<sub>4</sub>F electrolyte at U of 5–35 V for 120 min. Measurements were made using the scanning Kelvin probe method on a 4000 μm section, which included the area of the Ti-13Zr-13Nb substrate and the area of the oxide layer. The L of the oxide layer on the Ti-13Zr-13Nb substrate varied from 15.64(71) μm, for the sample anodized at U of 5 V, to 167.52(60) μm, for the sample oxidized at U of 35 V. The obtained results indicate that third-generation SWNTs on the Ti-13Zr-13Nb alloy obtained under the proposed anodizing conditions are much longer than first-generation [36] and second-generation [40] SWNTs on the Ti-13Zr-13Nb alloy. In 0.5% HF electrolyte at an anodizing voltage of 20 V for 120 min, we obtained an L of only 500 nm [36]. In 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> electrolyte under voltage–time conditions of 20 V for 120 min, the L of SWNTs of 3.9 μm was found [40]. In 1 M C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> + 4 wt% NH<sub>4</sub>F electrolyte under the same anodizing conditions, the L of SWNTs is 65.25(74) μm (Figure 6). The obtained results show that using the electrolyte based on ethylene glycol allows obtaining a 130-fold and 16-fold increase in L of third-generation SWNTs compared to SWNTs of the first [36] and second [40] generation, respectively.

Based on the obtained results, it can be concluded that the applied electrochemical oxidation voltage and the electrolyte play a key role in tailoring the third-generation SWNTs layers on the Ti-13Zr-13Nb alloy surface. The total surface area (A<sub>total</sub>) of the obtained SWNTs was calculated according to Equation (6) [12,41,51]:

$$A_{total} = 2\pi(D_{outer}^2 - D_{inner}^2) + 2\pi L(D_{outer} + D_{inner}) \quad (6)$$

Figure 7 shows that A<sub>total</sub> takes the values from 3.78(19) × 10<sup>−7</sup> cm<sup>2</sup>, for the SWNTs layer on the Ti-13Zr-13Nb alloy anodized at 15 V, to 3.39(17) × 10<sup>−6</sup> cm<sup>2</sup>, for the SWNTs layer produced on the sample oxidized at 35 V, which proves a 9-fold increase in A<sub>total</sub> in the tested voltage range. The obtained results indicate that the rise in A<sub>total</sub> ensures a growth in the contact surface between the oxide layer and the tissue, significantly accelerating the osseointegration process [1–5].

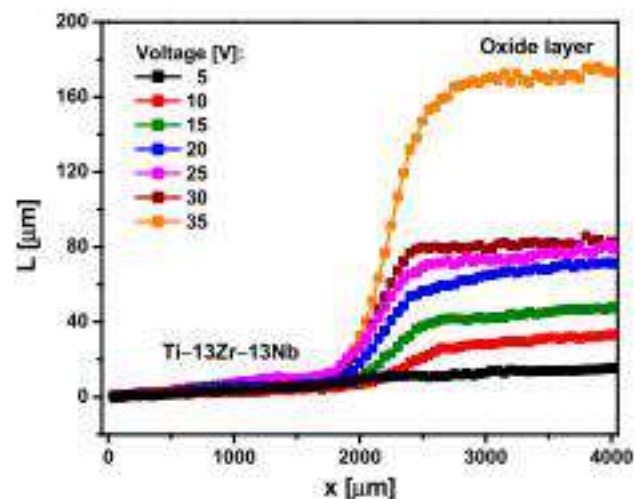


Figure 6. The thickness ( $L$ ) of the oxide layer on the Ti-13Zr-13Nb alloy surface obtained by anodizing in 1 M  $C_2H_6O_2$  + 4 wt%  $NH_4F$  electrolyte at 5–35 V for 120 min, measured over distance  $x$ .

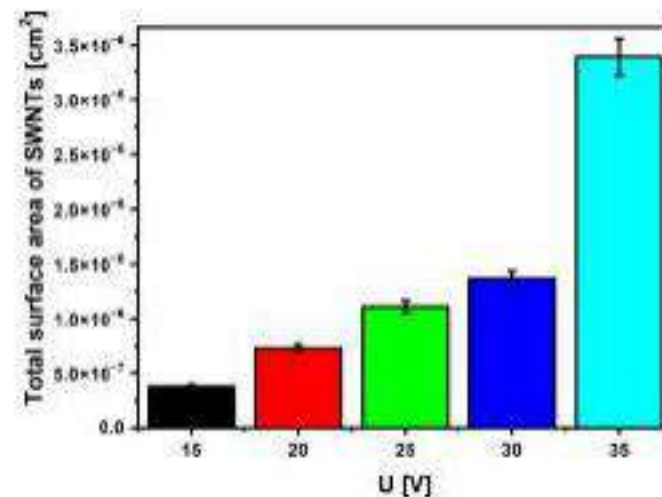


Figure 7. The total surface area ( $A_{total}$ ) of SWNTs on the Ti-13Zr-13Nb alloy surface obtained by anodizing in 1 M  $C_2H_6O_2$  + 4 wt%  $NH_4F$  electrolyte at  $U$  of 15–35 V for 120 min.

The proposed surface functionalization of the Ti-13Zr-13Nb alloy allows obtaining self-organizing SWNTs layers with a wide range of geometries and lengths. The obtained porous SWNTs show a morphology very similar to bone tissue structures. The new, additionally produced top SWNTs layer is designed to accelerate the osseointegration process, reduce the risk of the releasing of harmful compounds from the implant into the body, and the occurrence of inflammation [15–23,25,30–40,48,49]. In line with the latest trends in implantology, the layer of oxide nanotubes can be a carrier for drugs delivered to a specific location and enable their controlled release into the body at a specific rate, depending on the size of the SWNTs [12,29,41]. Oxide nanotubes can also be a carrier for bactericides or tissue-forming substances [23,24,26,27,29].

### 3.3. Chemical Composition of SWNTs on Ti-13Zr-13Nb Alloy

The control analysis of the chemical composition of the commercial Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing was carried out using the EDS method in selected micro-areas. The EDS spectrum for the substrate before oxidation is shown in Figure 8a.

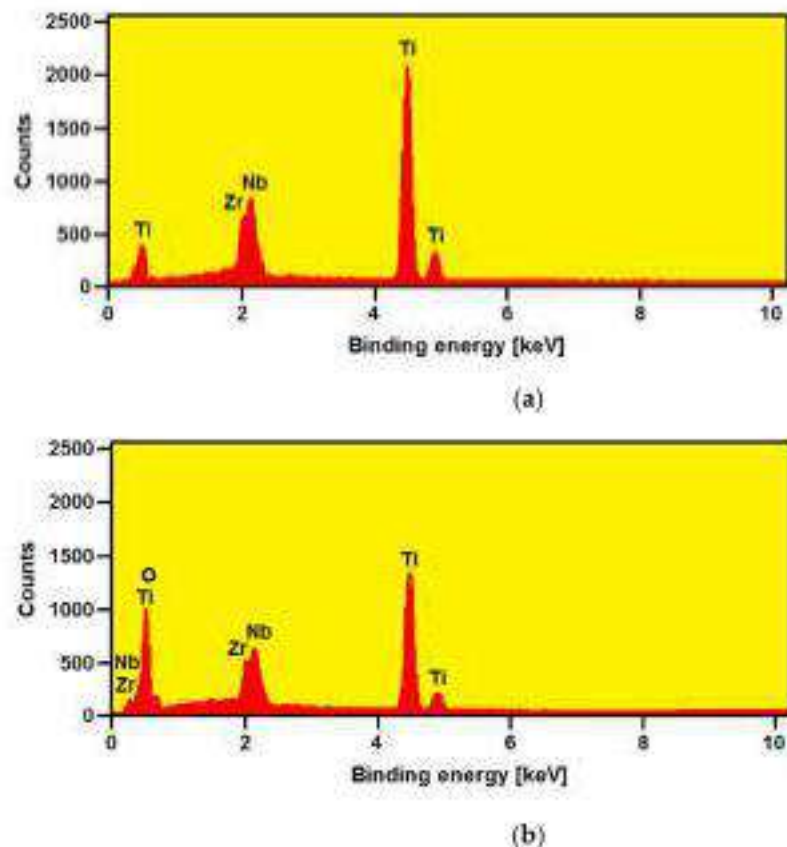


Figure 8. EDS spectrum for the Ti-13Zr-13Nb alloy surface: (a) Before anodizing; (b) After anodizing at 35 V for 120 min.

The obtained relationship between the number of counts and the radiation energy reveals the presence of peaks originating from the metallic components of the substrate, i.e., Ti, Zr, and Nb. Quantitative analysis of the obtained EDS spectrum shows the surface content of the elements in the following amounts (wt%): 74.3(6) for Ti, 12.9(6) for Zr, and 12.8(7) for Nb. These results are in accordance with the chemical composition specified for the bulk Ti-13Zr-13Nb. The assumed chemical composition of the Ti-13Zr-13Nb alloy ensures optimal biocompatible properties and long-term corrosion resistance in a biological environment, which is necessary in medical applications [15,31,33–41].

On all EDS spectra obtained for the Ti-13Zr-13Nb alloy after the electrochemical oxidation, oxygen peaks were also observed apart from the alloying component peaks. Figure 8b shows an exemplary EDS spectrum from a micro-area on the surface of the Ti-13Zr-13Nb alloy after anodizing at 35 V for 120 min. The intensity of the oxygen-derived peak increased with the anodizing voltage, resulting in the amorphous SWNTs layer being produced [41].

### 3.4. Electronic Properties of SWNTs on Ti-13Zr-13Nb Alloy

The effect of oxidation voltage on the electronic properties of the Ti-13Zr-13Nb alloy was studied using the SKP method. The contact potential difference maps of Ti-13Zr-13Nb alloy before and after oxidation at voltages from 5 V to 35 V are shown in Figure 9.

Statistical analysis of the obtained CPD maps allowed us to determine the arithmetic mean ( $CPD_{av}$ ), root mean square of height irregularities ( $CPD_{rms}$ ), skewness ( $CPD_{sk}$ ), and kurtosis ( $CPD_{ku}$ ), i.e., parameters that quantitatively determine the electronic properties of the material surface. The obtained dependences of  $CPD_{av}$  and  $CPD_{rms}$  as a function of the oxidation voltage are shown in Figure 10.

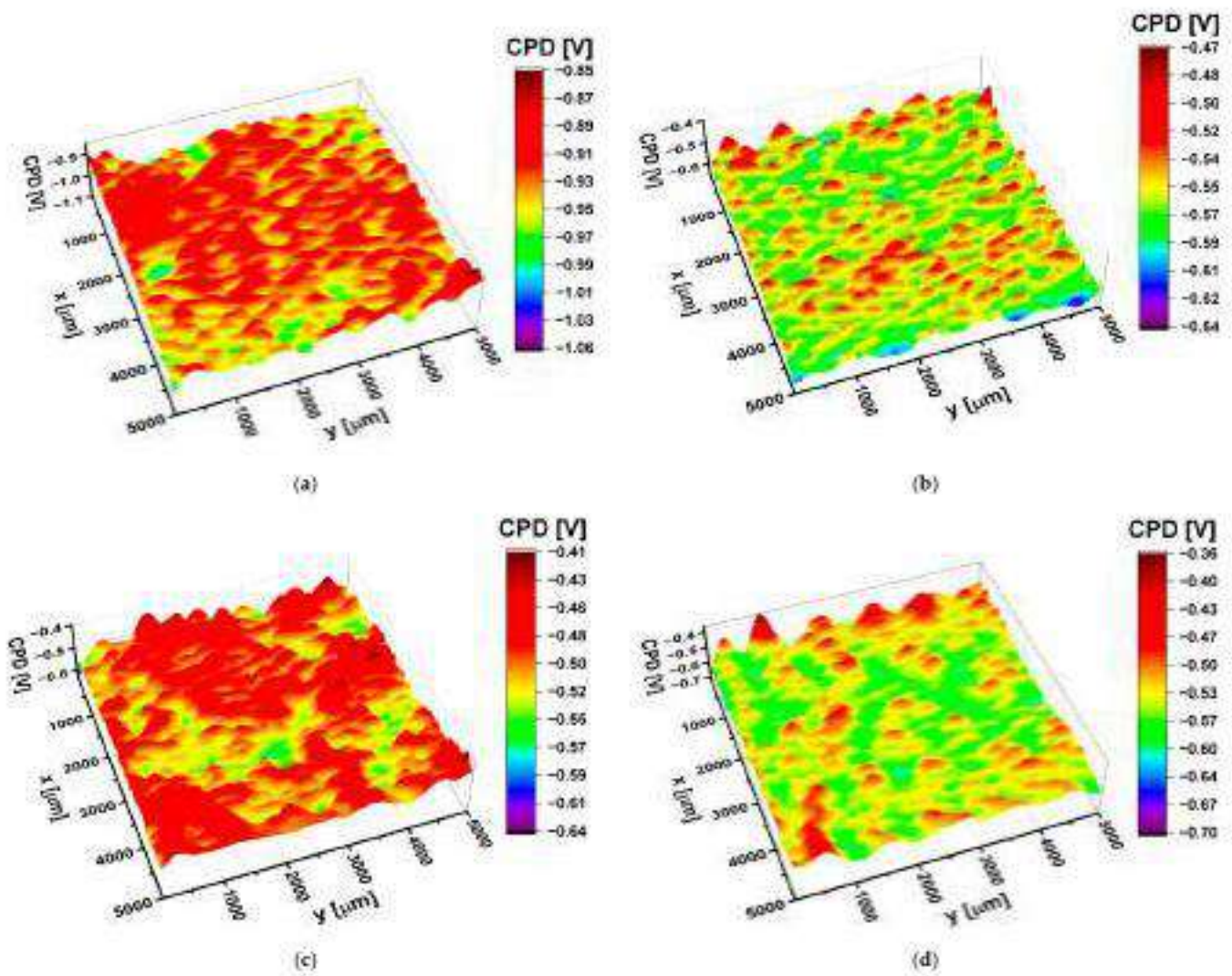


Figure 9. The contact potential difference (CPD) map for the Ti-13Zr-13Nb alloy surface: (a) Before anodizing; (b) After anodizing at 15 V for 120 min; (c) After anodizing at 25 V for 120 min; (d) After anodizing at 35 V for 120 min.

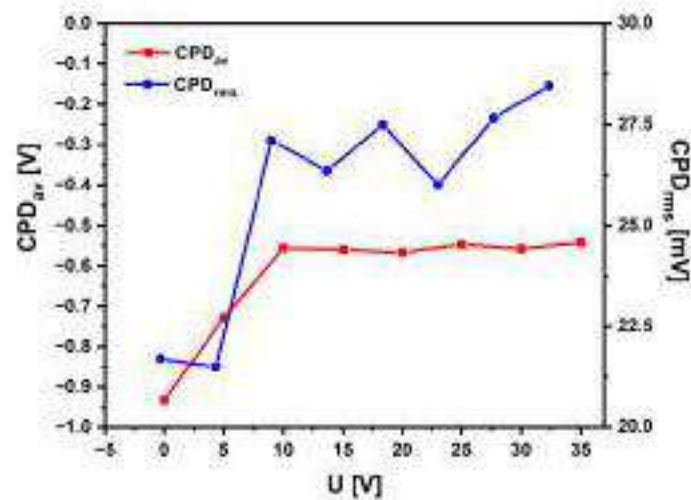


Figure 10. The arithmetic mean (CPD<sub>ar</sub>) and root mean square of height irregularities (CPD<sub>rms</sub>) for the Ti-13Zr-13Nb alloy surface before and after anodizing.

The Ti-13Zr-13Nb alloy at the initial state is characterized by the smallest values of  $CPD_{av}$  and  $CPD_{rms}$ . Oxidation of the alloy surface causes an increase in  $CPD_{av}$  and  $CPD_{rms}$ . In particular, it was found that, up to the value of 10 V, the  $CPD_{av}$  increased by about 40%, whereas for the voltage range from 10 to 35 V, the change of the  $CPD_{av}$  was about 2%. It has been stated that an increase in the contact potential difference correlates with an increase in the thickness of the oxide coating formed on the Ti-13Zr-13Nb alloy. The oxidation of the Ti-13Zr-13Nb alloy at voltages above 10 V causes a slight increase (ca. 1.2 times) in the  $CPD_{rms}$  parameter, indicating only a slight rise in the heights of CPD peaks and valleys. Thus, the surfaces of the oxide coatings formed at oxidation voltages from 5 to 35 V are characterized by similar height irregularities around the average. Generally, skewness and excess kurtosis describe symmetry and shape of the contact potential difference heights. It was found that, with the increase in oxidation voltage,  $CPD_{sk}$  increased from  $-0.3$  to  $0.3$ , and  $CPD_{ku}$  decreased from 1 to 0.25. Thus, the  $CPD_{sk}$  parameter showed a predominance of valleys on the surface of Ti-13Zr-13Nb alloy at the initial state. The oxidation process changes the symmetry of CPD heights, and for coating obtained at 35 V, there is an excess of CPD peaks. In turn,  $CPD_{ku}$  indicates the presence of profound valleys on the surface of Ti-13Zr-13Nb alloy at the initial state. These discontinuities disappear during the oxidation of Ti-13Zr-13Nb alloy because they are covered with oxide.

### 3.5. Geometric Structure of the Surface

The geometric structure of the surface (GSS) is one of the key factors determining the ability of the surface of biomaterials to osseointegrate [1–5]. The GSS of the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after the anodizing was characterized based on surface microgeometry measurements in a two-dimensional (2D) system. The ISO 4287 standard was the basis for determining the basic surface texture parameters [43]. The effect of the anodizing conditions on the GSS of the Ti-13Zr-13Nb alloy was discussed based on selected profile height parameters, such as  $R_a$  (arithmetic mean deviation of the roughness profile),  $R_z$  (maximum height of the roughness profile),  $R_p$  (maximum peak height of the roughness profile), and  $R_v$  (maximum valley depth of the roughness profile). Before determining the roughness parameters, the measured profiles were aligned. The analysis was carried out on symmetrical surface profiles. Figure 11 shows the exemplary 2D roughness profile for the Ti-13Zr-13Nb alloy surface before and after anodizing at 15–35 V.

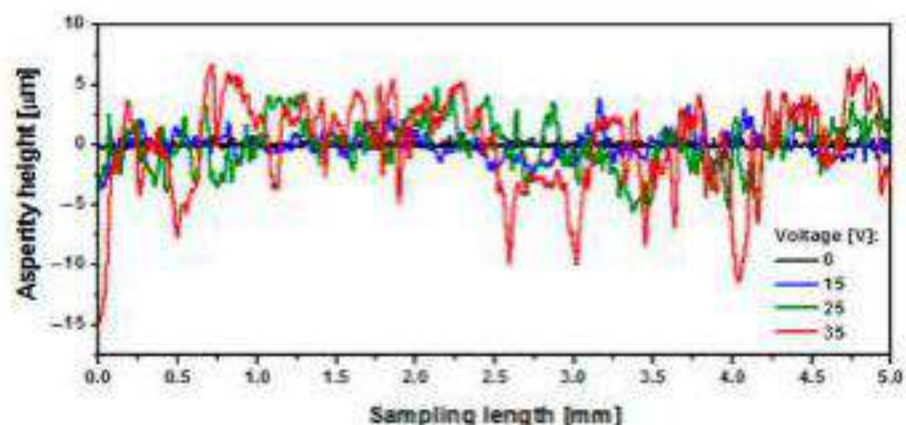


Figure 11. Roughness profile for the Ti-13Zr-13Nb alloy surface before and after anodizing at 15–35 V.

Basic surface texture parameters for the Ti-13Zr-13Nb alloy surface as a function of anodizing voltage are presented in Figure 12.

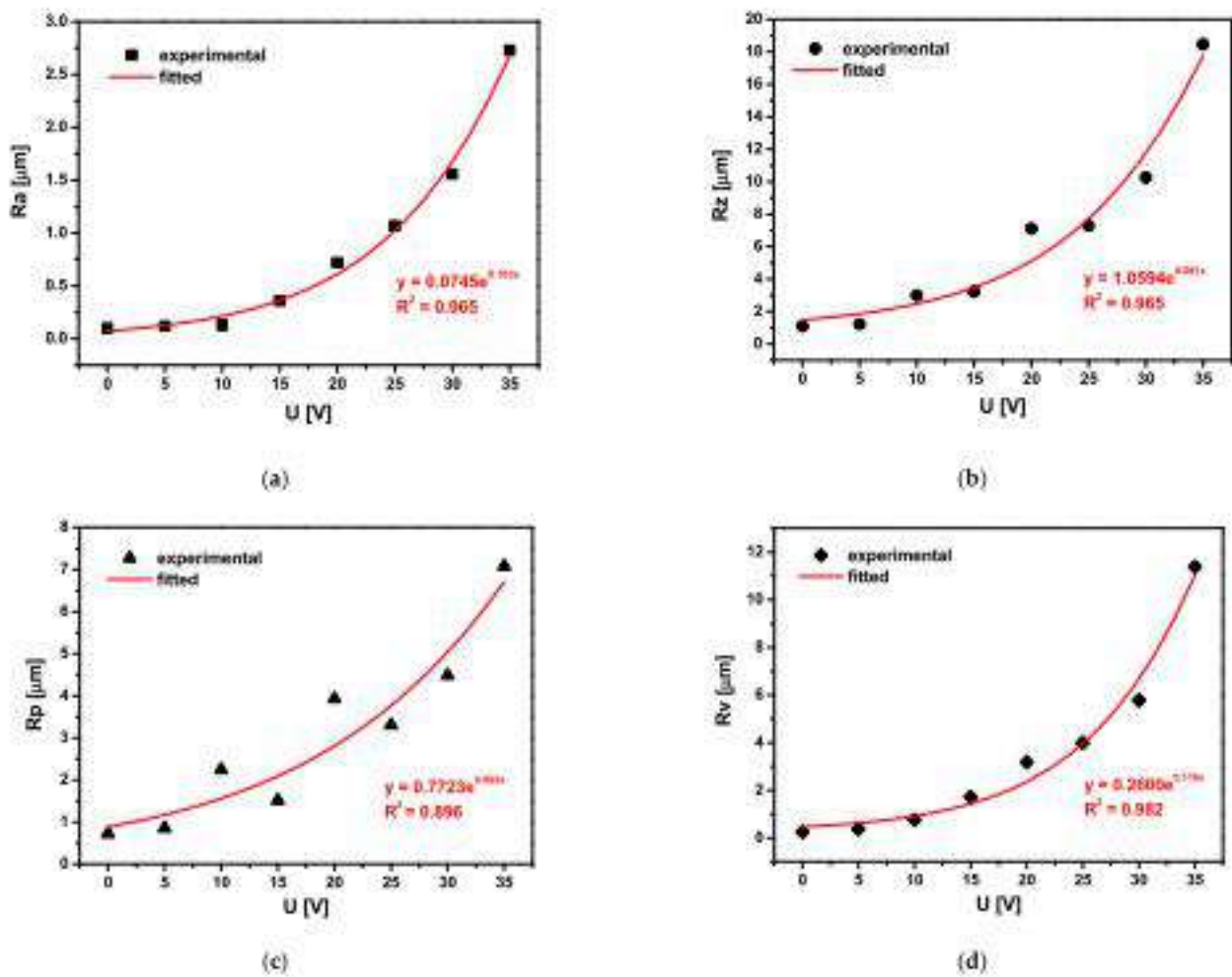


Figure 12. Basic surface texture parameters for the Ti-13Zr-13Nb alloy surface before and after anodizing: (a)  $R_a$ ; (b)  $R_z$ ; (c)  $R_p$ ; (d)  $R_v$ .

The experimental data are shown as symbols (black), and the exponential fit is shown as a solid line (red). As a result of surface treatment of the Ti-13Zr-13Nb alloy by anodizing, an exponential increase in  $R_a$  (Figure 12a),  $R_z$  (Figure 12b),  $R_p$  (Figure 12c), and  $R_v$  (Figure 12d) was achieved.

At the microscale, no deviations of the roughness profile from the mean line were observed for the non-anodized Ti-13Zr-13Nb surface (Figure 11a). The  $R_a$  of 0.10  $\mu\text{m}$  that best recognizes overall surface roughness proves the smooth surface of the alloy before anodizing (Figure 12a). The highest  $R_a$  of 2.73 is observed for the surface anodized at 35 V (Figure 12a). The roughness profile for the sample oxidized at the highest anodizing voltage testifies to the most porous surface with numerous pores with a depth of 10  $\mu\text{m}$ , as seen in Figure 11d.

The obtained results indicate the micro-rough surface for which the most suitable  $R_a$  is 1 to 3  $\mu\text{m}$  [6,9]. This means that the SWNTs layers produced on the Ti-13Zr-13Nb alloy during the anodizing voltages of 25, 30, and 35 V for 120 min have the optimal  $R_a$ . It can be assumed that their surfaces can ensure implant stability, support osseointegration, and reduce the risk of metal ion release due to corrosion processes and tribological wear [1,2,4,5]. The prerequisite for long-term success in implant treatment is, above all, osseointegration, i.e., a direct, structural, and functional connection between the living bone and the implant surface, and the integration of the implant surface with both hard and soft tissues. Bone integration of titanium implants is possible because the oxygen contained in the bone tissue forms a layer of highly biocompatible titanium dioxide on the surface of the titanium implant, on which new, mineralizing bone tissue can be deposited, forming the

proper fixation of the implant. The introduction of the intraosseous implant into the bone causes traumatization of the bone tissue, which requires subsequent regeneration. The obtained SWNTs on Ti-13Zr-13Nb alloy meet the necessary condition for the occurrence of osteoinductive properties of the biomaterial, which is the presence of sufficiently large pores with the minimum pore connection size below 50  $\mu\text{m}$  for the ingrowth of blood vessels and transport of cells to the core of the material [52].

### 3.6. Corrosion Resistance of SWNTs on Ti-13Zr-13Nb Alloy in an Artificial Atmosphere

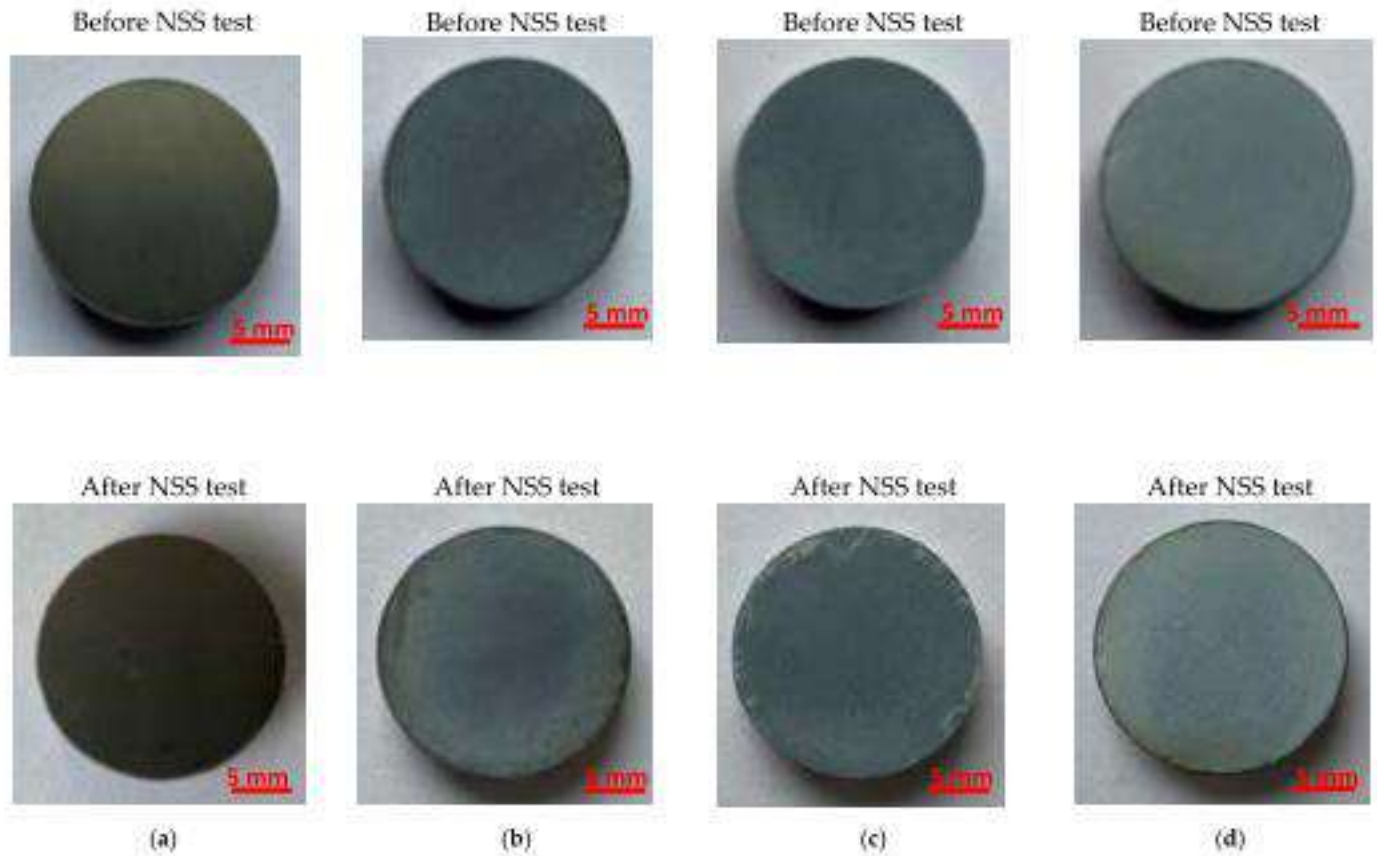
An assessment of the corrosion resistance of the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing to the effect of neutral salt spray was performed in the NSS test according to ISO 9227:2017 [44]. The surface of exemplary samples before and after exposure to neutral salt spray for 168 h is shown in Figure 13. The qualitative evaluation of the samples on a macro scale using the visual assessment method showed only slight changes in the surface appearance of the samples before and after the NSS test. In the case of the grey non-anodized substrate after the NSS test, a few minor corrosion spots darker in color on the Ti-13Zr-13Nb alloy surface may be related to the surface preparation method and/or related to visible local chemical heterogeneities (Figure 13a). On the surface of the samples, after anodizing at 15 V (Figure 13b), 25 V (Figure 13c), and 35 V (Figure 13d), a slightly lower intensity of the blue color can be observed, which may be caused by the dissolution of the SWNTs layer. At the edges of the samples after the NSS test, discoloration, local breakthroughs to the substrate, and chipping were visible, probably related to the greater brittleness of the SWNTs produced at higher anode current densities at the edges of the samples (edge effects). It is worth adding that the unprotected edges of the samples are particularly exposed to the action of aggressive salt spray and are potential places for the initiation of corrosion damage. The highest quality in accelerated laboratory tests in the neutral salt spray was demonstrated for the Ti-13Zr-13Nb alloy after anodizing at 35 V for 120 min, characterized by the highest SWNTs thickness of 167.52(60)  $\mu\text{m}$  (Figure 13d).

The Ti-13Zr-13Nb alloy belongs to the newest class of biomedical alloys. This alloy is highly resistant to corrosion and simultaneously exhibits a low elastic modulus, high strength, and excellent hot and cold workability, thus meeting the stringent requirements for materials used for medical implants [53,54]. The mechanical properties of Ti-13Zr-13Nb alloy can be tailored in a wide range by hot working, cold working, and heat treatment. Microhardness measurements can be used to assess the structural integrity of the bone in the porous implant surface and the bone surrounding the implant in the long-term bone ingrowth process. Aggressive chloride ions present in neutral salt spray can strongly influence the corrosive behavior of Ti-13Zr-13Nb alloy. Therefore, it seems advisable to compare the micromechanical properties of the tested alloy before and after the salt spray test.

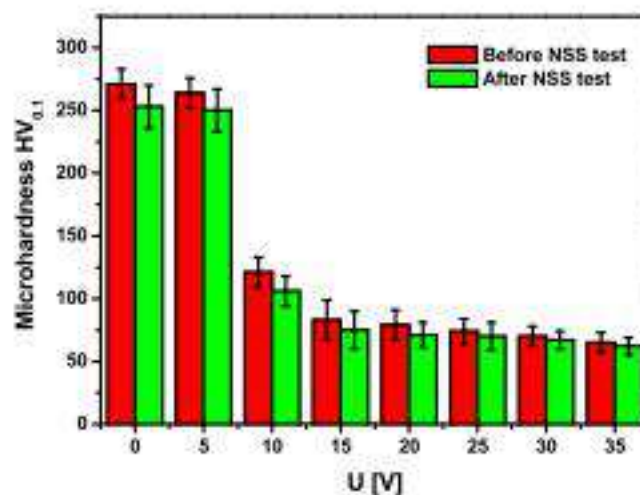
The quantitative evaluation of the corrosion effects on the micro-scale consisted of determining the micromechanical properties of SWNTs on Ti-13Zr-13Nb alloy before and after the NSS test (Figure 14).

For comparative purposes, the non-anodized Ti-13Zr-13Nb alloy was also tested. The average Vickers microhardness strongly depends on the anodizing voltage. It takes a value of 271(12) for the non-anodized substrate compared to 65(8) for the Ti-13Zr-13Nb alloy anodized at 35 V for 120 min as determined before the NSS test. The  $HV_{0.1}$  value drops sharply for the sample anodized at 10 V, and for samples with the SWNTs layer produced at an anodizing voltage from 15 to 35 V, it takes similar values. After the NSS test, slightly lower  $HV_{0.1}$  values are observed than the  $HV_{0.1}$  values obtained before the NSS test. The difference in microhardness for SWNTs before and after the NSS test decreases with increasing anodizing voltage. Such changes in microhardness are related to the thickness of the oxide layer on the Ti-13Zr-13Nb alloy substrate and its surface morphology (Figure 4). It has been reported in the literature that the larger the diameter of the oxide nanotubes on titanium, the smaller the number of nanotubular structures that carry the load in the area of contact between the tested samples and the diamond indenter, as well as the easier

the nanotubes deform and break [55]. From an application point of view, the SWNTs can compensate for the high hardness defect of the Ti-13Zr-13Nb alloy used as bone plates, avoid implant–bone stress mismatch, and reduce “stress shielding”.



**Figure 13.** The Ti-13Zr-13Nb alloy surface before and after NSS test according to ISO 9227:2017 [44]: (a) Non-anodized substrate; (b) After anodizing at 15 V for 120 min; (c) After anodizing at 25 V for 120 min; (d) After anodizing at 35 V for 120 min.



**Figure 14.** Microhardness of the Ti-13Zr-13Nb alloy surface before and after the NSS test according to ISO 9227:2017 [44] for non-anodized substrate ( $U = 0$  V) and after anodizing at  $U$  of 5–35 V for 120 min.



It is worth noting that a direct relationship does not practically occur between the corrosion resistance to NSS and the corrosion resistance to other corrosive environments. The obtained results cannot be used for comparative testing to rank different materials relative to each other with respect to corrosion resistance or to predict the long-term corrosion resistance of the tested material. The NSS corrosion test can control the quality of a product or a given technological process. The NSS test is useful for detecting discontinuities, such as pores and other defects, in protective coatings [44]. In this work, the NSS test was used for a preliminary assessment of the applicability of newly developed SWNTs as permanent corrosion protection on the Ti-13Zr-13Nb alloy. The obtained results of the NSS test reveal the high surface quality of the Ti-13Zr-13Nb alloy subjected to anodizing under the proposed conditions. Both the high resistance of the produced SWNTs to the aggressive salt spray and their stable micromechanical properties were confirmed.

The main implications of the obtained results concern the derived linear equations describing the dependence between the outer and inner diameters of the oxide nanotubes and the applied anodizing voltage, which can be used in the future to produce tailored oxide nanotubes with assumed geometrical dimensions. Based on the obtained results, it can be possible to personalize the dose of the drug implemented on the surface of an implant made of Ti-13Zr-13Nb alloy with a drug carrier in the form of third-generation oxide nanotubes with the assumed morphological parameters. The developed Ti-13Zr-13Nb/SWNTs system with an increased total surface area can not only be used as a potential carrier of drugs that inhibit local infections and inflammations or support bone healing, including in metastatic bone cancer, but also can accelerate the osseointegration process due to the optimal nanotubular oxide structure.

#### 4. Conclusions

The third-generation SWNTs were successfully produced for the first time on the biomedical Ti-13Zr-13Nb alloy by anodizing in 1 M  $C_2H_6O_2$  + 4 wt%  $NH_4F$  electrolyte at U of 15–35 V for 120 min. No nanotubular oxide structures were formed at anodizing voltages of 5 and 10 V. The morphological parameters of the obtained SWNTs were functions of the anodizing voltage. With increasing anodizing voltage in the range of applied voltages, the outer diameter changed from 104(13) nm to 230(30) nm, whereas the inner diameter varied from 39(5) to 93(13) nm. The length of the SWNTs changed from 15.64(71)  $\mu m$  to 167.52(60)  $\mu m$ . The novelty of this work is the derivation of a linear dependence between the outer and inner diameters of the SWNTs, and the applied anodizing voltage was found.

The electronic properties of the obtained SWNTs studied by the SKP method depended on the anodizing voltage. Statistical analysis of the contact potential difference maps revealed that quantitative parameters as the arithmetic mean and root mean square of height irregularities increased with the oxidation voltage in the range of 5–35 V from  $-0.729$  to  $-0.543$  V and from 21.49 to 28.47 mV, respectively. The Ti-13Zr-13Nb alloy before anodizing was characterized by the smallest values of the contact potential difference, which proves the lowest stability among the tested materials.

The geometric structure of the Ti-13Zr-13Nb alloy after anodizing showed that the basic surface texture parameters  $R_a$ ,  $R_z$ ,  $R_p$ , and  $R_v$  are exponential functions of the oxidation voltage. The lowest  $R_a$  of 0.10  $\mu m$  for the substrate before oxidation proved its smooth surface. The  $R_a$  of 1.07–2.73 was determined for the porous SWNTs surface obtained at 25–35 V, indicating the micro-rough surface for which the  $R_a$  belonged to the most suitable  $R_a$  for biomedical applications from 1 to 3  $\mu m$  [6,9].

An assessment of corrosion resistance of the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing to the effect of NSS on the macro scale showed the high quality of the obtained SWNTs. The quantitative evaluation of the impact of NSS on the micro-scale was based on the microhardness measurements before and after accelerated corrosion tests in a salt chamber. Before the NSS test, the average Vickers microhardness decreased with increasing anodizing voltage from 271(12) for the non-anodized substrate to 65(8) for the Ti-13Zr-13Nb

alloy anodized at 35 V for 120 min. Only slightly lower  $HV_{0.1}$  was determined after the NSS test, confirming the high corrosion resistance of the developed SWNTs.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.L.; methodology, B.L., A.S., and P.O.; investigation, B.L., S.S., A.S., P.O., J.K., J.M., and K.D.; formal analysis, B.L., S.S., A.S., and P.O.; writing—original draft preparation, B.L., S.S., A.S., and J.K.; writing—review and editing, P.O., and K.D.; visualization, S.S., A.S., P.O., J.K., J.M., and K.D.; funding acquisition, B.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

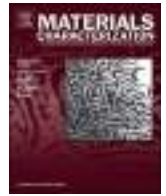
**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Jakubowicz, J. (Ed.) *Ti-Based Biomaterials*. In *Ti-Based Biomaterials*; MDPI AG: Basel, Switzerland, 2020.
- Anene, F.; Jaafar, C.A.; Zainol, I.; Hanim, M.A.; Suraya, M. Biomedical materials: A review of titanium based alloys. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part C J. Mech. Eng. Sci.* **2020**, *235*, 3792–3805. [\[CrossRef\]](#)
- Froes, F.H.; Qian, M. (Eds.) *Titanium in Medical and Dental Applications*; Elsevier BV: Amsterdam, The Netherlands, 2018.
- Chen, Q.; Thouas, G.A. Metallic implant biomaterials. *Mater. Sci. Eng.* **2015**, *87*, 1–57. [\[CrossRef\]](#)
- Abdel-Hady Gepreel, M.; Niinomi, M. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2013**, *20*, 407–415. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Losiewicz, B.; Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Stach, S. Effect of autoclaving time on corrosion resistance of sandblasted Ti G4 in artificial saliva. *Materials* **2020**, *13*, 4154. [\[CrossRef\]](#)
- Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Ratajczak, P.; Losiewicz, B. Long-Term Assessment of the In Vitro Corrosion Resistance of Biomimetic ACP Coatings Electrodeposited from an Acetate Bath. *J. Funct. Biomater.* **2021**, *12*, 12. [\[CrossRef\]](#)
- Losiewicz, B.; Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Bogunia, S.; Ratajczak, P.; Aniolek, K. Effect of Temperature on Electrochemically Assisted Deposition and Bioactivity of CaP Coatings on CpTi Grade 4. *Materials* **2021**, *14*, 5081. [\[CrossRef\]](#)
- Osak, P.; Maszybrocka, J.; Zubko, M.; Rak, J.; Bogunia, S.; Losiewicz, B. Influence of Sandblasting Process on Tribological Properties of Titanium Grade 4 in Artificial Saliva for Dentistry Applications. *Materials* **2021**, *14*, 7536. [\[CrossRef\]](#)
- Costa, B.C.; Tokuhara, C.; Rocha, L.A.; Oliveira, R.C.; Lisboa-Filho, P.N.; Pessoa, J. Vanadium ionic species from degradation of Ti-6Al-4V metallic implants: In vitro cytotoxicity and speciation evaluation. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *96*, 730–739. [\[CrossRef\]](#)
- Stróż, A.; Goryczka, T.; Losiewicz, B. Electrochemical formation of self-organized nanotubular oxide layers on niobium (Review). *Curr. Nanosci.* **2019**, *15*, 42–48. [\[CrossRef\]](#)
- Losiewicz, B.; Stróż, A.; Osak, P.; Maszybrocka, J.; Gerle, A.; Dudek, K.; Balin, K.; Lukowiec, D.; Gawlikowski, M.; Bogunia, S. Production, Characterization and Application of Oxide Nanotubes on Ti-6Al-7Nb Alloy as a Potential Drug Carrier. *Materials* **2021**, *14*, 6142. [\[CrossRef\]](#)
- Aniolek, K.; Losiewicz, B.; Kubisztal, J.; Osak, P.; Stróż, A.; Barylski, A.; Kaptacz, S. Mechanical properties, corrosion resistance and bioactivity of oxide layers formed by isothermal oxidation of Ti-6Al-7Nb alloy. *Coatings* **2021**, *11*, 505. [\[CrossRef\]](#)
- Szklarska, M.; Dercz, G.; Rak, J.; Simka, W.; Losiewicz, B. The influence of passivation type on corrosion resistance of Ti15Mo alloy in simulated body fluids. *Arch. Met. Mater.* **2015**, *60*, 2687–2694. [\[CrossRef\]](#)
- Szklarska, M.; Dercz, G.; Simka, W.; Losiewicz, B. A.c. impedance study on the interfacial properties of passivated Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution. *Surf. Interface Anal.* **2014**, *46*, 698–701. [\[CrossRef\]](#)
- Long, X.; Jia, Q.P.; Li, Z.; Wen, S.X. Reverse analysis of constitutive properties of sintered silver particles from nanoindentations. *Int. J. Solids Struct.* **2020**, *191–192*, 351–362. [\[CrossRef\]](#)
- Durdu, S.; Cihan, G.; Yalcin, E.; Altinkok, A. Characterization and mechanical properties of TiO<sub>2</sub> nanotubes formed on titanium by anodic oxidation. *Ceram. Int.* **2021**, *47*, 10972–10979. [\[CrossRef\]](#)
- Lee, M.; Kim, I.-S.; Moon, Y.H.; Yoon, H.S.; Park, C.H.; Lee, T. Kinetics of Capability Aging in Ti-13Nb-13Zr Alloy. *Crystals* **2020**, *10*, 693. [\[CrossRef\]](#)
- Losiewicz, B.; Dercz, G.; Szklarska, M.; Simka, W.; Łęźniak, M.; Krząkała, A.; Swinarew, A. Characterization of Electrophoretically Deposited Chitosan Coatings on Ti13Zr13Nb Alloy for Biomedical Applications. *Solid State Phenom.* **2013**, *203–204*, 212–215. [\[CrossRef\]](#)
- Bartmański, M.; Pawłowski, L. Properties of chitosan/CuNPs coatings electrophoretically deposited on TiO<sub>2</sub> nanotubular oxide layer of Ti13Zr13Nb alloy. *Mater. Lett.* **2022**, *308*, 130982. [\[CrossRef\]](#)
- Bartmański, M.; Pawłowski, L.; Zieliński, A.; Mielewczyk-Gryń, A.; Strugała, G.; Cieślak, B. Electrophoretic Deposition and Characteristics of Chitosan-Nanosilver Composite Coatings on a Nanotubular TiO<sub>2</sub> Layer. *Coatings* **2020**, *10*, 245. [\[CrossRef\]](#)

22. Bartmański, M.; Zieliński, A.; Majkowska-Marzec, B.; Strugała, G. Effects of solution composition and electrophoretic deposition voltage on various properties of nanohydroxyapatite coatings on the Ti13Zr13Nb alloy. *Ceram. Int.* **2018**, *44*, 19236–19246. [[CrossRef](#)]
23. Bartmański, M.; Pawłowski, L.; Mielewczyk-Gryń, A.; Strugała, G.; Rokosz, K.; Gaiaschi, S.; Chapon, P.; Raaen, S.; Zieliński, A. The Influence of Nanometals, Dispersed in the Electrophoretic Nanohydroxyapatite Coatings on the Ti13Zr13Nb Alloy, on Their Morphology and Mechanical Properties. *Materials* **2021**, *14*, 1638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bartmański, M.; Pawłowski, L.; Belcarz, A.; Przekora, A.; Ginalska, G.; Strugała, G.; Cieslik, B.M.; Pałubicka, A.; Zieliński, A. The Chemical and Biological Properties of Nanohydroxyapatite Coatings with Antibacterial Nanometals, Obtained in the Electrophoretic Process on the Ti13Zr13Nb Alloy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bartmański, M.; Pawłowski, L.; Strugała, G.; Mielewczyk-Gryń, A.; Zieliński, A. Properties of Nanohydroxyapatite Coatings Doped with Nanocopper, Obtained by Electrophoretic Deposition on Ti13Zr13Nb Alloy. *Materials* **2019**, *12*, 3741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bartmański, M.; Cieslik, B.; Glodowska, J.; Kalka, P.; Pawłowski, L.; Pieper, M.; Zielinski, A. Electrophoretic deposition (EPD) of nanohydroxyapatite—nanosilver coatings on Ti13Zr13Nb alloy. *Ceram. Int.* **2017**, *43*, 11820–11829. [[CrossRef](#)]
27. Bartmański, M.; Zielinski, A.; Jazdzewska, M.; Glodowska, J.; Kalka, P. Effects of electrophoretic deposition times and nanotubular oxide surfaces on properties of the nanohydroxyapatite/nanocopper coating on the Ti13Zr13Nb alloy. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 20002–20010. [[CrossRef](#)]
28. Dziaduszczyńska, M.; Shimabukuro, M.; Seramak, T.; Zieliński, A.; Hanawa, T. Effects of Micro-Arc Oxidation Process Parameters on Characteristics of Calcium-Phosphate Containing Oxide Layers on the Selective Laser Melted Ti13Zr13Nb Alloy. *Coatings* **2020**, *10*, 745. [[CrossRef](#)]
29. Dziaduszczyńska, M.; Wekwejt, M.; Bartmański, M.; Pałubicka, A.; Gajowiec, G.; Seramak, T.; Osyczka, A.M.; Zieliński, A. The Effect of Surface Modification of Ti13Zr13Nb Alloy on Adhesion of Antibiotic and Nanosilver-Loaded Bone Cement Coatings Dedicated for Application as Spacers. *Materials* **2019**, *12*, 2964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Zieliński, A.; Sobieszczyk, S.; Serbiński, W.; Seramak, T.; Ossowska, A. Materials Design for the Titanium Scaffold Based Implant. *Solid State Phenom.* **2011**, *183*, 225–232. [[CrossRef](#)]
31. Ossowska, A.; Olive, J.-M.; Zielinski, A.; Wojtowicz, A. Effect of double thermal and electrochemical oxidation on titanium alloys for medical applications. *Appl. Surf. Sci.* **2021**, *563*, 150340. [[CrossRef](#)]
32. Ossowska, A.; Beutner, R.; Scharnweber, D.; Zielinski, A. Properties of composite oxide layers on the Ti13Nb13Zr alloy. *Surf. Eng.* **2017**, *33*, 841–848. [[CrossRef](#)]
33. Ossowska, A.; Zieliński, A.; Olive, J.-M.; Wojtowicz, A.; Szweđa, P. Influence of Two-Stage Anodization on Properties of the Oxide Coatings on the Ti-13Nb-13Zr Alloy. *Coatings* **2020**, *10*, 707. [[CrossRef](#)]
34. Ossowska, A.; Sobieszczyk, S.; Supernak, M.; Zielinski, A. Morphology and properties of nanotubular oxide layer on the “Ti-13Zr-13Nb” alloy. *Surf. Coat. Technol.* **2014**, *258*, 1239–1248. [[CrossRef](#)]
35. Ossowska, A.; Zieliński, A.; Supernak, M. Formation of High Corrosion Resistant Nanotubular Layers on Titanium Alloy Ti13Nb13Zr. *Solid State Phenom.* **2011**, *183*, 137–142. [[CrossRef](#)]
36. Stróż, A.; Dercz, G.; Chmiela, B.; Losiewicz, B. Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy with potential use as bone implant. *AIP Conf. Proc.* **2019**, *2083*, 030004. [[CrossRef](#)]
37. Handzlik, P.; Gutkowski, K. Synthesis of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy by the electrochemical method. *J. Porous Mater.* **2019**, *26*, 1631–1637. [[CrossRef](#)]
38. Smofka, A.; Dercz, G.; Rodak, K.; Losiewicz, B. Evaluation of corrosion resistance of nanotubular oxide layers on the Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution. *Arch. Metall. Mater.* **2015**, *60*, 2681–2686. [[CrossRef](#)]
39. Smofka, A.; Rodak, K.; Dercz, G.; Dudek, K.; Losiewicz, B. Electrochemical Formation of Self-Organized Nanotubular Oxide Layers on Ti13Zr13Nb Alloy for Biomedical Applications. *Acta Phys. Pol.* **2014**, *125*, 932–935. [[CrossRef](#)]
40. Stróż, A.; Dercz, G.; Chmiela, B.; Stróż, D.; Losiewicz, B. Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for biomedical applications. *Acta Phys. Pol.* **2016**, *130*, 1079–1080. [[CrossRef](#)]
41. Stróż, A.; Losiewicz, B.; Zubko, M.; Chmiela, B.; Balin, K.; Dercz, G.; Gawlikowski, M.; Goryczka, T. Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications. *Mater. Charact.* **2017**, *132*, 363–372. [[CrossRef](#)]
42. ASTM F1713-08(2021)1; Standard Specification for Wrought Titanium-13Niobium-13Zirconium Alloy for Surgical Implant Applications (UNS R58130). ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2021.
43. ISO 4287:1997; Geometrical Product Specifications (GPS)—Surface Texture: Profile Method—Terms, Definitions and Surface Texture Parameters. ISO: Geneva, Switzerland, 1997.
44. ISO 9227:2017(en); Corrosion Tests in Artificial Atmospheres—Salt Spray Tests. ISO: Geneva, Switzerland, 2017.
45. ISO 6507-1:2018(en); Metallic Materials—Vickers Hardness Test—Part 1: Test Method. ISO: Geneva, Switzerland, 2018.
46. ISO 6507-2:2018; Metallic Materials—Vickers Hardness Test—Part 2: Verification and Calibration of Testing Machines. ISO: Geneva, Switzerland, 2018.
47. ISO 6507-3:2018; Metallic Materials—Vickers Hardness Test—Part 3: Calibration of Reference Blocks. ISO: Geneva, Switzerland, 2018.

48. Raja, K.S.; Gandhi, T.; Misra, M. Effect of water content of ethylene glycol as electrolyte for synthesis of ordered titania nanotubes. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 1069–1076. [[CrossRef](#)]
49. Roy, P.; Berger, S.; Schmuki, P. TiO<sub>2</sub> Nanotubes: Synthesis and applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2904–2939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Stepień, M.; Handzlik, P.; Fitzner, K. Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on Ti6Al7Nb alloy and their interaction with the simulated body fluid. *J. Solid State Electrochem.* **2016**, *20*, 2651–2661. [[CrossRef](#)]
51. Ainouche, L.; Hamadou, L.; Kadri, A.; Benbrahim, N.; Bradai, D. Interfacial barrier layer properties of three generations of TiO<sub>2</sub> nanotube arrays. *Electrochim. Acta* **2014**, *133*, 597–609. [[CrossRef](#)]
52. Bohner, M.; Miron, R.J. A proposed mechanism for material-induced heterotopic ossification. *Mater. Today* **2019**, *22*, 132–141. [[CrossRef](#)]
53. Schneider, S.G.; Nunes, C.A.; Rogero, S.P.; Higa, O.Z.; Bressiani, J.C. Mechanical properties and cytotoxic evaluation of the Ti–13Nb–13Zr alloy. *Biomecânica* **2000**, *8*, 84–87. [[CrossRef](#)]
54. Lee, T. Variation in Mechanical Properties of Ti–13Nb–13Zr Depending on Annealing Temperature. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 7896. [[CrossRef](#)]
55. Wu, S.; Wang, S.; Liu, W.; Yu, X.; Wang, G.; Chang, Z.; Wen, D. Microstructure and properties of TiO<sub>2</sub> nanotube coatings on bone plate surface fabrication by anodic oxidation. *Surf. Coat. Technol.* **2019**, *374*, 362–373. [[CrossRef](#)]



# Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications

A. Stróż<sup>a</sup>, B. Łosiewicz<sup>a,\*</sup>, M. Zubko<sup>a</sup>, B. Chmiela<sup>b</sup>, K. Balin<sup>c</sup>, G. Dercz<sup>a</sup>, M. Gawlikowski<sup>d</sup>, T. Goryczka<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Materials Science, University of Silesia, 41-500 Chorzów, Poland

<sup>b</sup> Institute of Materials Science, Silesian University of Technology, 40-001 Katowice, Poland

<sup>c</sup> The August Chełkowski Institute of Physics, University of Silesia, 41-500 Chorzów, Poland

<sup>d</sup> Artificial Heart Lab, Foundation of Cardiac Surgery Development, 41-800 Zabrze, Poland

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Anodization  
Biocompatibility  
Biomaterials  
Oxide nanotubes  
Ti13Nb13Zr alloy

## ABSTRACT

This work deals with production and characterization of the oxide nanotubes on the biomedical Ti13Nb13Zr alloy. Anodic oxidation of this new type of vanadium-free titanium alloy was carried out in 1 M ethylene glycol electrolyte with the addition of 4 wt% NH<sub>4</sub>F under voltage-time conditions of 50 V for 80 min at room temperature. The results of FE-SEM, TEM, EDS, GIXD and XPS investigations confirmed the possibility of formation of the single-walled nanotubes on the bi-phase ( $\alpha + \beta$ ) alloy under study. An amorphous character of the obtained nanotubes was ascertained. The morphological parameters such as the length ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ), outer (362 nm) and internal (218 nm) diameter of the nanotube, were determined. The formed nanotubes were composed of oxides of the alloying elements derived from TiO<sub>2</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, ZrO<sub>2</sub>, and ZrO<sub>x</sub>. Spontaneous passivation of the as-received Ti13Nb13Zr alloy in the normal saline solution at 37 °C, was revealed by open-circuit potential measurements. The interface impedance of Ti13Nb13Zr electrode | oxide layer | normal saline solution, was determined by approximation of the experimental EIS data using the equivalent electrical circuit of modified Randle's cell. Potentiodynamic studies have shown no initiation of pitting corrosion up to 9.5 V vs. SCE. The proposed surface modification method has been shown to eliminate the hemolysis of the alloy and to decrease slightly its corrosion resistance due to the porous structure of the formed nanotubes. These results give a new insight into improvement of the ability of the Ti13Nb13Zr implant alloy to osseointegration in a biological milieu.

## 1. Introduction

Musculoskeletal system of man throughout his life is exposed to numerous loads. As a result of various kinds of injuries and diseases the worn or damaged joints often need to be replaced by biomaterials that improve health. Currently, particular attention is focused on designing an appropriate surface structure of the biomaterials ensuring stability on the border of implant - bone tissue [1–8]. Since the description of the osseointegration effect by Brånemark half a century ago [9], researchers are working to appropriately design surface of materials to replace damaged organs. Suitable anchoring the implant in the bone tissue allows for quick osteoconductivity and osseointegration. Osseointegration process contains the deposition of new bone area of the implant by osteoblasts. This allows to the high osteogenic activity which is the key to long-term stability of the implant in human body. Another very important process for the better implant and bone

connection is angiogenesis. This process is important for bone faster fracture healing, for the new bone formation during embryonic development and for regeneration of bone [10].

The osseointegration process of biomedical titanium alloys is affected by factors such as surface of the implant and its modification methods, its biocompatibility, bone bed, shape of the implant and load conditions [2,5,10,11]. Smooth surfaces of titanium and its alloys have been reported to be less desirable for bone fixation than after surface modification. Roughened surface of titanium implants has shown better osteogenic activities such as cell attachment, cell proliferation, adsorption of protein and calcium deposition, proving to be beneficial for osseointegration.

Studies have shown that between titanium oxide and bone layer is space, in glycoprotein networks that mediate the oxide anchorage. It allows the formation of bone tissue and removal of epithelial tissue, which is particularly sensitive in difficult times of implants.

\* Corresponding author at: Institute of Materials Science, University of Silesia, ul. 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland.  
E-mail address: [bozena.losiewicz@us.edu.pl](mailto:bozena.losiewicz@us.edu.pl) (B. Łosiewicz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.matchar.2017.09.004>

Received 22 June 2017; Received in revised form 24 August 2017; Accepted 3 September 2017

Available online 06 September 2017

1044-5803/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction of titanium implant of bone structures induces similar healing reactions like in the case of injuries. In bone tissue, the simultaneous destruction and reconstruction of tissues occurs. Remodeling is a continuous phase of osseointegration. As a result of bone reconstruction, it is constantly being improved and adjusted to new conditions. After insertion of the bone implant, initially with necrotic layer and later with young repair tissue, is replaced with a strong tissue lamellar. Histological evaluation of early stage of osseointegration showed better bone formation for modified Ti samples than smooth [8,11–16].

It has been proved that the porosity and/or roughness of the surface are the requirement of biomaterials used in dentistry and orthopedics. Obtaining adequately developed surface area provides a good mechanical stability of the implant and influences the process of osseointegration [3,10,17]. A special type of porosity in the form of nanotubes indicates the suitability of the nanostructured layers of titanium oxides for medical use [3,4,11,12,18–21]. The use of the oxide nanotubes is becoming now one of the most attractive techniques as surface modification of metallic biomaterials. Presence of the oxide nanotubes on the implant surface increases osteoblast adhesion and proliferation, bioactivity and possibility of being use as a drug delivery system [2,10,12,22–24].

For medical applications one of the most important properties of oxide nanotubes is their mechanical and thermal stability. It has been found that the production of oxide nanotubes on titanium surface decreases the value of elastic modulus in comparison with that for the Ti substrate. In the literature, the relation between the coating thickness and the elastic modulus has been shown. It has been revealed that the increase in TiO<sub>2</sub> nanotube thickness influenced the reduction of the elastic modulus [25].

The oxide nanotubes may act as micro- or nanosyringes saturated with microbicides or therapeutic agents, and enable their controlled release into the body with a determined rate which is dependent on the geometry of the pores, thus contributing to the reduction of adverse reactions after implantation [5,10]. Target control of kinetics of released therapeutic substances implemented into the oxide nanotubes is now one of the most modern treatment methods [23,24,26–29]. Anodic oxidation is one of the cheapest and simplest technique to obtain highly ordered single-walled nanotubes (SWNTs) [29–31]. Dependently on the type and concentration of the electrolyte three generations of the oxide nanotubes can be produced [3,30,32–34]. In our previous work [3] the possibility of electrochemical formation of second generation (2G) SWNTs on the surface of Ti13Nb13Zr biomedical alloy was reported.

Following our interest in the surface modification of the latest group of titanium alloys [12,35–37], the present study was undertaken in order to obtain SWNTs on the Ti13Nb13Zr biomedical alloy using anodic oxidation under new electrochemical conditions. The purpose of the investigation was also to determine the effect of the porous structure, chemical states, and surface morphology of the formed SWNTs on their hemocompatibility and in vitro corrosion resistance in biological milieu for the first time. Comparative and novel studies on a smooth surface of the Ti13Nb13Zr alloy before electrochemical modification have also been carried out. In available databases the number of articles based on surface modification of Ti13Nb13Zr alloy where the main topic are oxide nanotubes is very low. This article shows the original research based on new electrochemical conditions for production of oxide nanotubes on this alloy which are not observed in literature.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Material Preparation

The studied samples of the Ti13Nb13Zr (wt%) alloy in the form of disks were cut from the rod of 0.9 mm in diameter. The samples were ground with 1200 and 2500# grit silicon carbide paper, polished using OP-S suspension, and then sonicated for 20 min using nanopure water

(Milli-Q, 18.2 MΩ cm<sup>2</sup>, < 2 ppb total organic carbon). Anodic oxidation was performed at room temperature in 1 M ethylene glycol solution with 4 wt% content of NH<sub>4</sub>F. Ethylene glycol (anhydrous, 99.8%) and ammonium fluoride (≥ 99.99% trace metals basis) were supplied by Sigma Aldrich. The time and voltage of anodization was 80 min and 50 V, respectively. Anodization process was carried out using a Kikusui PWR800H Regulated DC Power Supply in the two-electrode system consisting of the working electrode which was the sample under study, and the counter electrode in the form of a platinum foil being spaced from the working electrode for a distance of 25 mm.

### 2.2. Material Characterization

The surface morphology and cross-section observations of the Ti13Nb13Zr alloy with formed layers of SWNTs were examined using a scanning electron microscopy with field emission (FE-SEM) using the HITACHI HD-2300A Scanning Transmission Electron Microscope (STEM). The chemical composition of the alloy before and after anodization was analyzed by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) used in conjunction with FE-SEM. The structure of SWNTs was determined by high resolution electron microscopy (HREM) technique using a JEOL JEM-3010 Transmission Electron Microscope (TEM) operating at 300 kV equipped with 2k × 2k Orius TM 833 SC200D Gatan CCD camera. The investigations were conducted on thin films of the anodized Ti13Nb13Zr alloy, which were made using the method of cross-sections by ion polishing using the polisher type of Gatan PIPS. The X-ray structural studies of the Ti13Nb13Zr alloy before and after anodization were conducted using the grazing incidence X-ray diffraction (GIXD) method on the X'Pert Philips PW 3040/60 diffractometer operating at 30 mA and 40 kV (Cu Kα radiation), which was equipped with a vertical goniometer and an Eulerian cradle. The GIXD diffraction patterns were registered in 2θ range from 20 to 90° and 0.05° step for the incident angle α of 1.00°. Chemical states of the Ti13Nb13Zr alloy surface before and after anodization were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) with the use of the VGScienta & Prevac spectrometer using monochromatic X-rays with an energy of 1486.74 eV and power of 400 W.

### 2.3. In Vitro Hemocompatibility Test

Hemocompatibility of the Ti13Nb13Zr alloy before and after anodization was examined according to the ASTM F756-00 standard [38]. Blood was obtained from healthy human volunteers. For determination of the hemoglobin (Hb) calibration curve consistent with the specifications of the International Committee for Standardization in Hematology (ICSH) was obtained [39]. Dilutions were made with phosphate buffered saline (PBS) to a Hb concentration of 10(1) g l<sup>-1</sup>. Specimens with a determinable surface area were used at a ratio of 3 cm<sup>2</sup> surface area to 1 ml of test blood solution. For reference samples and those with formed SWNTs was used 0.57(0.02) ml human blood. The final samples were exposed in human blood for 4 h at 37 °C. After 4 h of incubation the fluid was transfer to the appropriate tube and centrifuge at 3000 rpm for 15 min in a standard clinical centrifuge. The supernatant was carefully removed to avoid disturbing any button of erythrocytes which were present in the tube. Afterwards the absorbance of the solution with a spectrophotometer at a wavelength of 540 nm was noted. For calculation of % hemolysis the following formula was used [38]:

$$\% \text{hemolysis} = \frac{\text{concentration of hemoglobin released in supernatant} \times 100\%}{\text{total hemoglobin concentration in tube}} \quad (1)$$

This is synonymous with hemolytic index being the quotient of the free plasma hemoglobin (mg ml<sup>-1</sup>) released as a result of contact with test material divided by the total hemoglobin (mg ml<sup>-1</sup>) present in the blood solution multiplied by 100 [38].

## 2.4. In Vitro Corrosion Resistance Measurements

In vitro corrosion resistance of the Ti13Nb13Zr alloy before and after anodization was determined in a normal saline solution (NSS) of 0.9% NaCl at 37(2) °C using the method of open-circuit potential (OCP), polarization curves and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The NSS was prepared from analytically pure reagents and ultra-pure water (Millipore, resistivity 18.2 MΩ cm at 25 °C). To adjust the pH of the NSS to 7.4(0.1), 4% NaOH and 1% C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> solutions were used. Before each series of measurements, the fresh portion of the NSS was deaerated by bubbling Ar of high purity (UHP Ar, 99.999%) for 1 h.

Corrosion studies were performed in a three-electrode electrochemical cell with the working electrode made of the Ti13Nb13Zr alloy before anodization and with formed SWNTs. One side of the sample with the geometric surface area of 0.28 cm<sup>2</sup> was exposed to corrosive medium, the other side was insulated with epoxy resin which has not been in the reaction with the electrolyte. The counter electrode was the platinum foil with the geometric surface area of 2 cm<sup>2</sup>. All values of the potentials were measured in relation to the saturated calomel electrode (SCE) connected to the solution using Luggin capillary. Electrochemical measurements were carried out using a computer-controlled Metrohm/Eco Chemie Autolab PGSTAT30 Potentiostat/Galvanostat Electrochemical System.

Prior to electrochemical measurements, the as-received Ti13Nb13Zr electrode was subjected to depassivation at a potential of  $-1.2$  V vs. SCE for 10 min. The corrosion tests started with the measurement of the open circuit potential,  $E_{OC}$ , for 2 h. Then, the EIS measurements were carried out potentiostatically at the stabilized value of  $E_{OC}$ . Ac impedance spectra were registered in the frequency range of 20 kHz–1 mHz using 10 frequencies per decade and an excitation signal in the form of a sine wave with an amplitude of 10 mV. The experimental EIS data were analyzed based on the equivalent electrical analogs by means of the EQUIVCRT program [40] and using the complex nonlinear least squares (CNLS) method with modulus weighting. The equivalent circuits were defined using circuit description code given by Boukamp [41]. The obtained results were used for a comparative assessment of the corrosion resistance of SWNTs and the as-received Ti13Nb13Zr electrode.

Anodic polarization curves were registered under potentiodynamic conditions at a sweep rate of  $\nu = 4$  mV s<sup>-1</sup> in the potential range from  $E_{OC}$  minus 150 mV to 9.5 V.

## 2.5. Statistics

In the performed analyzes, the standard deviations were determined for all quantitative parameters. Modeling of EIS data was carried out in order to find an appropriate model described by an electrical equivalent circuit or equation by minimization of the sum of squares [42]. Such model impedances should lie very close to the experimental ones without any systematic deviations. To assure that the approximating model was correct, statistical tests were used. The quality of fit was verified by examining a  $\chi^2$  (chi-square) test. In the modeling of the impedance data the Fisher-Snedecor test F for the confidence level of  $\alpha = 0.01$ , corresponding to probability of 99%, was used for the importance of the additional term [43]. The F-test allowed to compare two different variances (square of standard deviations). Another parameter in the model was added only if this produced a statistically important decrease in the sum of squares. The number of new parameters was kept as low as possible.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. EDS Study of Chemical Composition

The selected alloy used for anodic oxidation was a new type of vanadium-free titanium alloy. Such chemical composition of the alloy

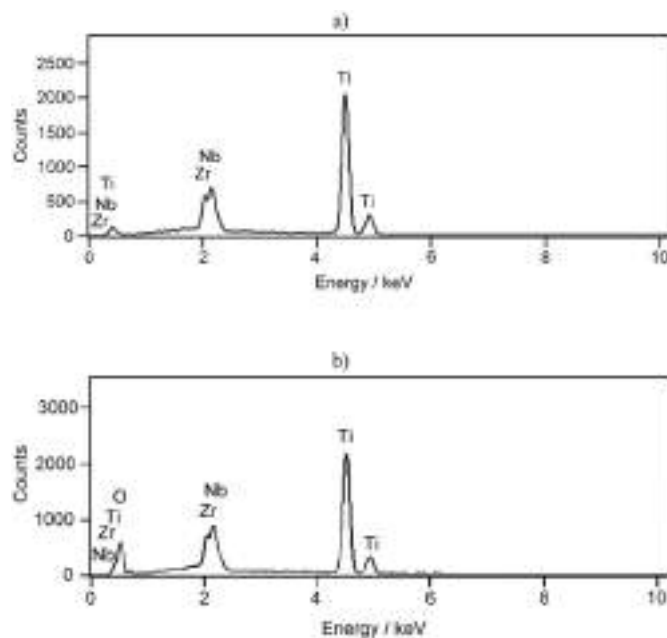


Fig. 1. EDS spectrum of the Ti13Nb13Zr alloy: a) before and b) after anodization.

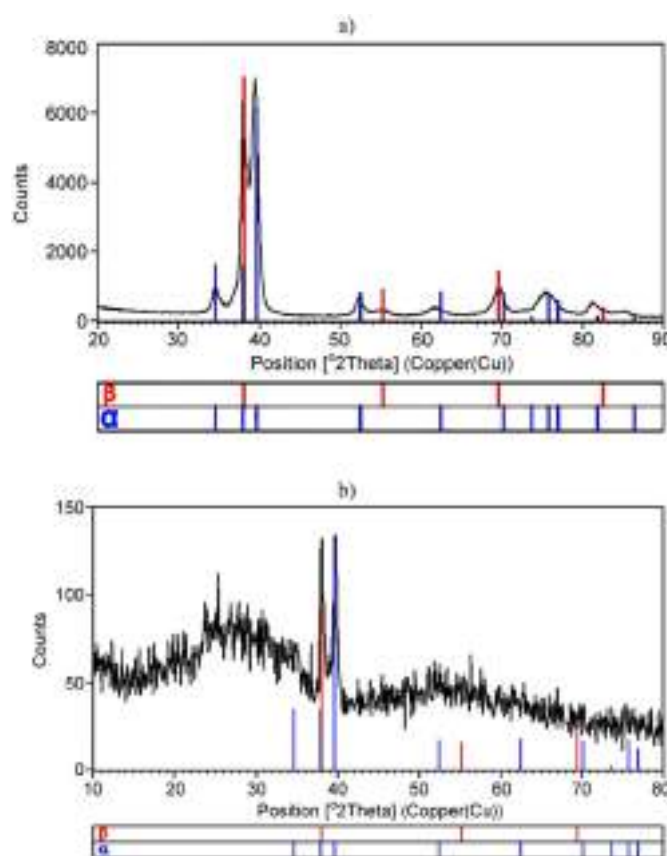
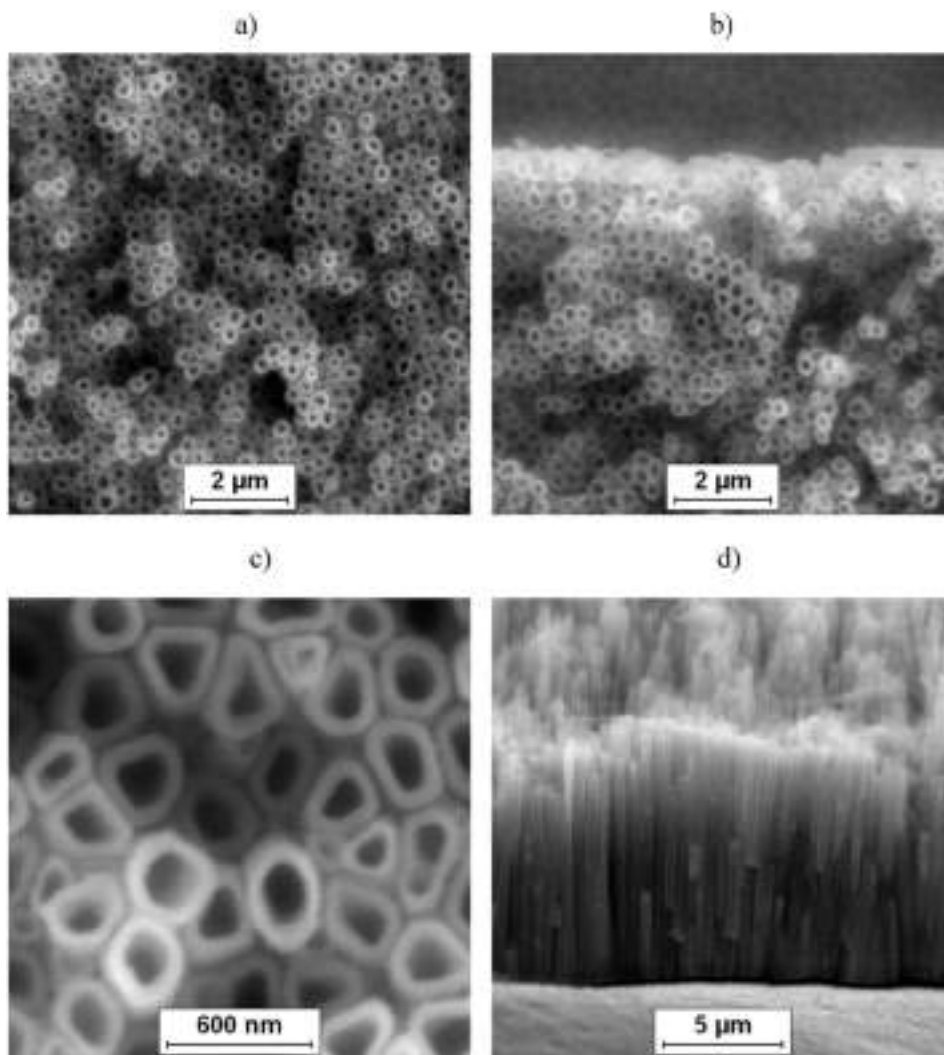


Fig. 2. GIXD pattern of the Ti13Nb13Zr alloy: a) before and b) after anodization.

ensures appropriate biomedical properties for use as medical implants [1–3]. In addition, it provides higher biocompatibility and corrosion resistance. The chemical composition of the studied alloy was confirmed using EDS measurements (Fig. 1). EDS spectrum registered in the selected micro-region on the alloy surface showed the presence of peaks originating from the substrate, i.e. Ti, Nb and Zr for the Ti13Nb13Zr alloy before (Fig. 1a) and after anodization (Fig. 1b). The



**Fig. 3.** FE-SEM image of the microstructure of SWNTs layer formed on the Ti13Nb13Zr alloy: a)–c) on-top general view, and d) cross-section of the material.

element concentration from the peaks obtained for the alloy before electrochemical modification, was determined to be 74.3 (0.5) wt% for Ti, 12.7(0.7) wt% for Nb, and 13.0 (0.5) wt% for Zr which is consistent with the bulk composition of the sample under study. The presence of oxygen peak in the EDS spectrum for the anodized alloy showed that on the surface of the test material an oxide layer is present (Fig. 1b).

### 3.2. XRD Study of Structure

Fig. 2a presents the diffraction pattern for the Ti13Nb13Zr alloy before electrochemical oxidation and reveals the presence of characteristic diffraction lines corresponding to  $\alpha$  - Ti (PDF ICDD 00-044-1294) and  $\beta$  - Ti (PDF ICDD 01-089-3726) phases. Fig. 2b shows the diffraction pattern for the Ti13Nb13Zr alloy after anodization in 1 M ethylene glycol solution with the addition of 4% wt.  $\text{NH}_4\text{F}$  at 50 V for 80 min. Identification of the diffraction pattern shows also the presence of two phases originating from the material substrate:  $\alpha$  - Ti and  $\beta$  - Ti. Extended maximum visible in the diffraction pattern between 20 and 35°  $2\theta$  indicates an amorphous character of the obtained SWNTs on the surface of the bi-phase Ti13Nb13Zr alloy composed of a mixture of  $\alpha$  and  $\beta$  phases.

### 3.3. FE-SEM and TEM Studies of Microstructure

FE-SEM images of the microstructure of the Ti13Nb13Zr alloy after anodization are shown in Fig. 3. View from the top (Fig. 3a and c)

shows the surface morphology of the formed layer of SWNTs with very smooth walls. A uniform distribution of the oxide nanotubes can be observed. Fig. 3b presents a top view of mechanically fractured sample with visible and invisible area of the oxides nanotubes. Cross-section of the SWNTs layer is shown in Fig. 3d and the thickness of the oxide layer of several  $\mu\text{m}$  can be observed. The detailed mechanism of the multistep formation of the oxide SWNTs on the Ti13Nb13Zr alloy was reported in our previous work [1].

Fig. 4a–c show representative TEM images taken from SWNT. The studied alloy after anodization was suspended in isopropanol and sonicated for 60 min in an ultrasonic bath and the resulted materials were deposited on copper grid covered with an amorphous carbon film standardized for the sample preparation for TEM analysis. After this process, the SWNTs were observed. The recorded diffraction pattern (Fig. 4d) confirms that the SWNTs obtained under proposed conditions are amorphous. EDS mapping shows that these oxides are uniformly distributed in the SWNTs (Fig. 4e–h). Recorded EDS spectrum confirmed that the resulting SWNTs are composed of Ti, Nb and Zr oxides (Fig. 4i).

Based on the FE-SEM images (Fig. 3) recorded from the selected areas of the Ti13Nb13Zr alloy surface after anodic oxidation, the morphological parameters of the obtained nanotubes were determined. The SWNT length ( $L$ ) was 9.7(0.6)  $\mu\text{m}$ . Empirical distribution histograms of the outer ( $D_0$ ) and inner ( $D_i$ ) diameter of SWNTs is shown in the Fig. 5a and b, respectively. Average  $D_0$  and  $D_i$  diameter of SWNTs was estimated by Gaussian fit to the diameter histogram to be 362(44)



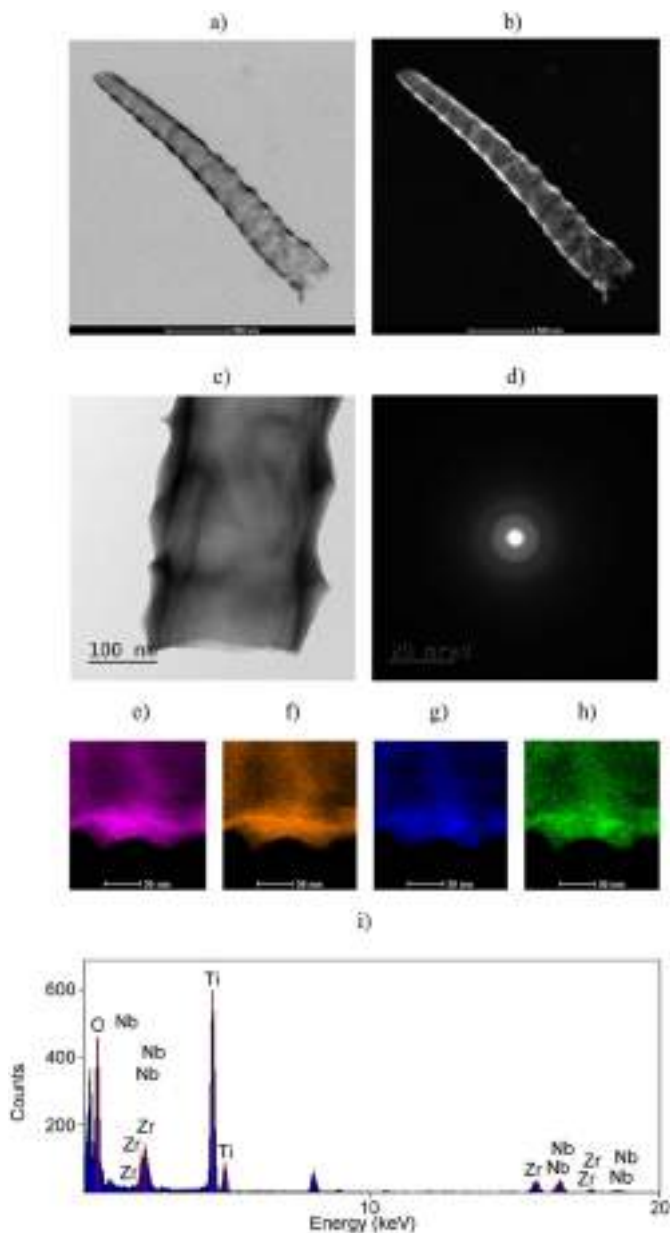


Fig. 4. Images of the obtained SWNT on the Ti13Nb13Zr alloy: a) STEM BF image, b) STEM HAADF image, c) TEM BF image, and d) corresponding diffraction pattern. EDS maps with colors corresponding to: e) Ti-K line, f) O-K line, g) Nb-L line, h) Zr-L line, and i) EDS pattern.

nm and 218(39) nm, respectively.

The total surface area ( $A_t$ ) of SWNTs equal to  $4.1 \mu\text{m}^2$ , was calculated according to the following formula [30]:

$$A_t = 2\pi(D_0^2 - D_i^2) + 2\pi L(D_0 + D_i) \quad (2)$$

The first term of the Eq. (2) is associated to the areas of the two tube rings. Second term involves the areas of internal and external curved surfaces. The specific surface area ( $A_s$ ) of SWNTs per  $\text{cm}^2$  was estimated by the following term [30]:

$$A_s = n \cdot A_t \quad (3)$$

The evaluated value of  $A_s$  was  $49.4 \text{ cm}^2/\text{cm}^2$ .

Nowadays, it is well known that composition of the electrolyte for anodization strongly influences the microstructure of the obtained oxide nanotubes [1,3,4,12,19,20,22]. SWNTs are possible to be obtained using organic polar solvents such as formamide, ethylene glycol, dimethylsulfoxide and glycerol with a fluoride salt, e.g. NaF, KF, or

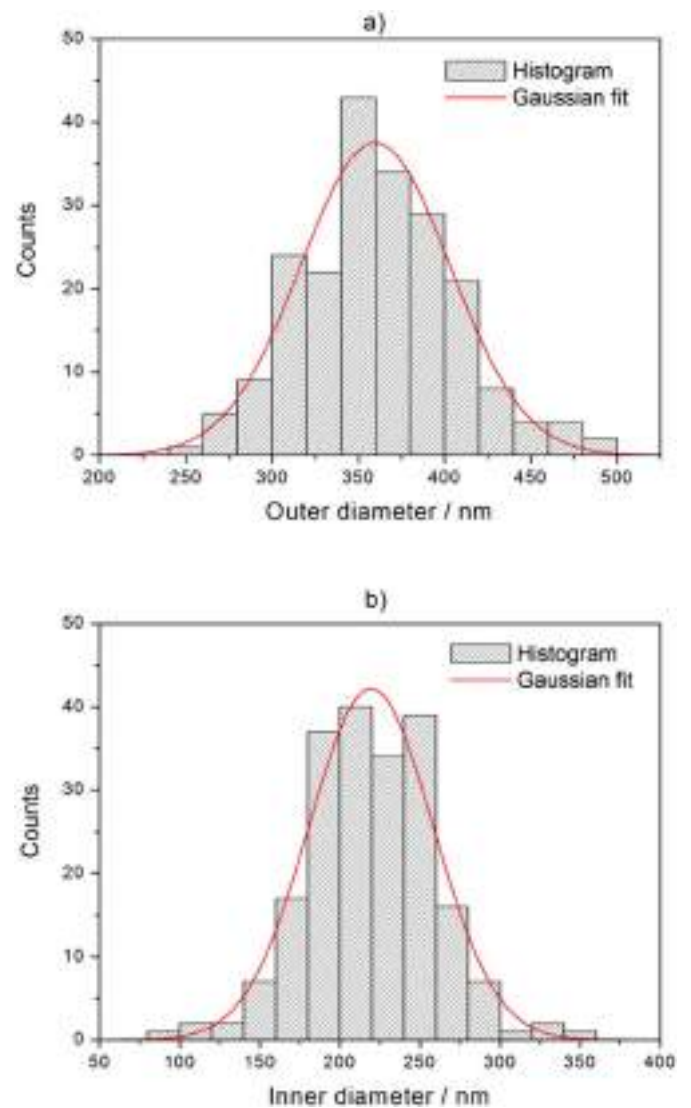


Fig. 5. Histogram of: a) outer and b) internal diameter distribution of SWNTs on the surface of the Ti13Nb13Zr alloy and Gaussian fitting curve.

$\text{NH}_4\text{F}$ . A lack of fluoride ions in the solution makes impossible to form oxide nanotubes. Fluoride ions are responsible for cracking of the passive oxide layer on the alloy surface. The use of electrolytes containing ethylene glycol leads to production of nanotubes with the length reaching even several hundred  $\mu\text{m}$  and very smooth walls in contrast to nanotubes obtained in aqueous solutions of hydrogen fluoride or its mixtures with other acids. The first generation nanostructures are shorter up to several hundred nm and have a low surface arrangement. An increase in the length of nanotubes can be achieved reducing the amount of water.

### 3.4. XPS Study of Chemical States

The XPS analysis was focused on the determination of chemical states of the test alloy components; detailed analysis of Ti2p, Nb3d and Zr3d photoemission line is presented. For the Ti13Nb13Zr alloy before electrochemical modification the XPS spectra showed that titanium exist in two chemical states:  $\text{TiO}_2$  ( $\text{Ti}^{4+}$ ) Ti2p<sub>7/2</sub> line position at 458.8 eV and reduced oxide ( $\text{Ti}^{3+}$ ) Ti2p<sub>7/2</sub> line position at 457.2 eV (Fig. 6a). For niobium on XPS spectrum the chemical state Nb3d<sub>5/2</sub> ~ 207.4 eV was observed and was related to the presence of metallic niobium (Fig. 6c). This was not a pure niobium (most likely) it was niobium derived from intermetallic compound with zirconium. Analysis

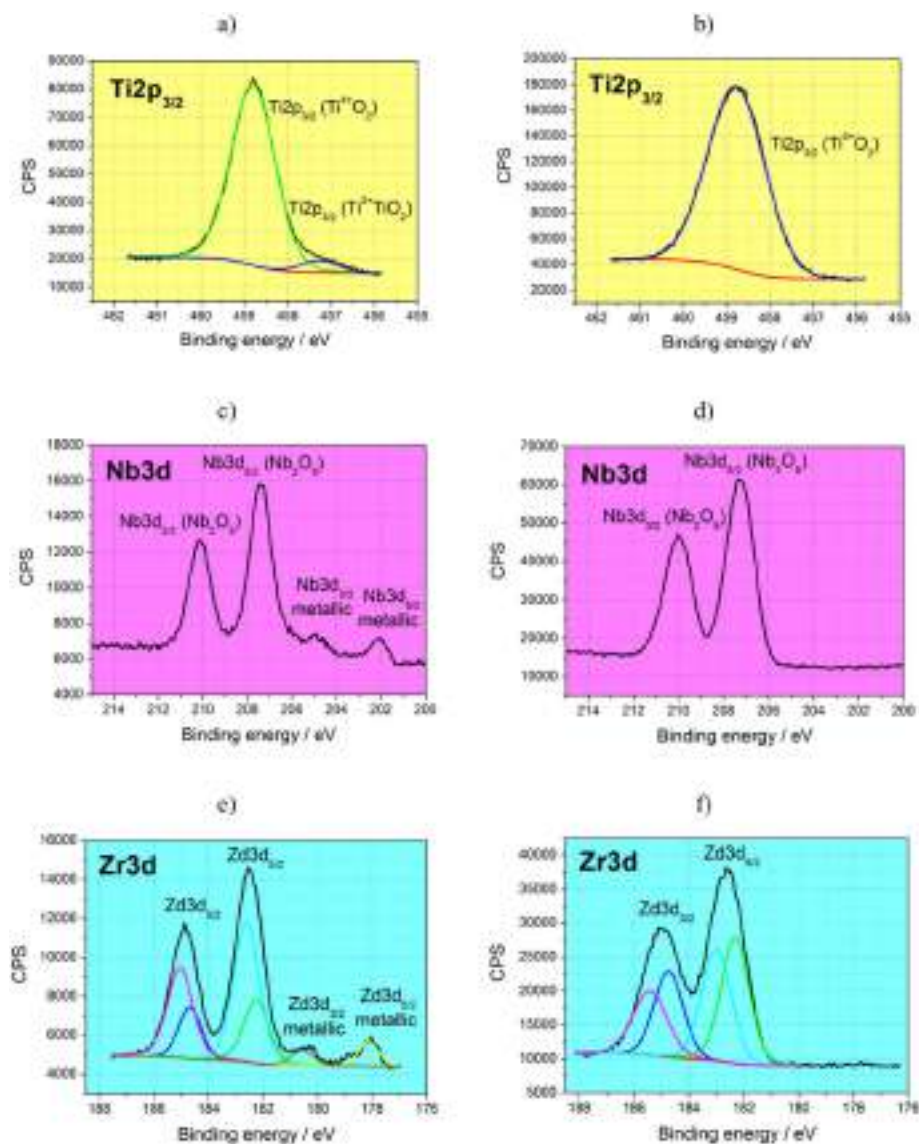


Fig. 6. XPS high resolution spectra for Ti $2p_{7/2}$ : a) before and b) after anodization, Nb3d: c) before and d) after anodization, and Zr3d: e) before and f) after anodization of the Ti13Nb13Zr alloy.

of the shape of the lines Nb3d of the Ti13Nb13Zr alloy before electrochemical modification indicates also the presence of niobium in second chemical state observed for the Nb3d $_{5/2}$  at about 207.4 eV. The position and shape of the Zr3d lines of reference sample of the Ti13Nb13Zr alloy indicates the presence of zirconium in the three states: Zr3d $_{5/2}$  at 178.1 eV in metallic state (most likely in complex with niobium); Zr3d $_{5/2}$  at 182.3 eV identified as zirconium oxide ZrO $_2$ ; Zr3d $_{5/2}$  at 182.9 eV assigned as zirconia ZrO $_x$  (Fig. 6e).

The XPS studies of the Ti13Nb13Zr alloy after the anodization process confirmed the presence of titanium only in one chemical state: TiO $_2$  (Ti $^{4+}$ ) Ti $2p_{7/2}$  line position at 458.8 eV (Fig. 6b). The position and shape of the lines Nb3d of the Ti13Nb13Zr alloy after electrochemical modification indicates the presence of niobium in one chemical state - position of the Nb3d $_{5/2}$  at about 207.4 eV (Fig. 6d). The position and shape of the lines Zr3d for SWNTs indicates the presence of zirconium in the two states: Zr3d $_{5/2}$  at 182.3 eV identified as zirconium oxide ZrO $_2$ ; Zr3d $_{5/2}$  at 182.9 eV assigned as zirconia ZrO $_x$  (Fig. 6f).

### 3.5. In Vitro Hemocompatibility Study

The most common method to determine the hemocompatibility for biomaterials is the hemolysis test [38,39,44]. Hemolysis is the process of transition hemoglobin (dye of red blood cells) into the cytoplasm as

a result of rupturing erythrocytes. To determine the biocompatibility of the Ti13Nb13Zr alloy before and after electrochemical modification examinations according to the ASTM F756-00 standard were performed [38]. Based on this standard the hemolytic index below 2 evidences that material is nonhemolytic (Fig. 7). The obtained results of hemolysis test revealed the value of the hemolytic index of 0.30(0.08) for the Ti13Nb13Zr alloy before modification and 0.00 for anodically formed SWNTs on the alloy surface. The latter value proves that the proposed surface modification completely eliminates hemolysis process and ensures excellent hemocompatibility of the porous Ti13Nb13Zr alloy with SWNTs.

### 3.6. In Vitro Corrosion Resistance Studies

Fig. 8 presents the results of  $E_{OC}$  vs. time for the Ti13Nb13Zr electrode without and with SWNTs. It can be observed that  $E_{OC}$  is strongly dependent on immersion time. The results of OCP measurements for the depassivated, smooth Ti13Nb13Zr electrode show that the value of  $E_{OC}$  increased dynamically from  $-0.438$  V towards more positive potentials right after immersion in NSS, and then after 1.8 h of exposure, it started to stabilize reaching the value of  $-0.143$  V (Fig. 8, solid line). Such behavior is characteristic for the spontaneous formation of the passive film on titanium and its alloys in biological milieu [45,46]. For

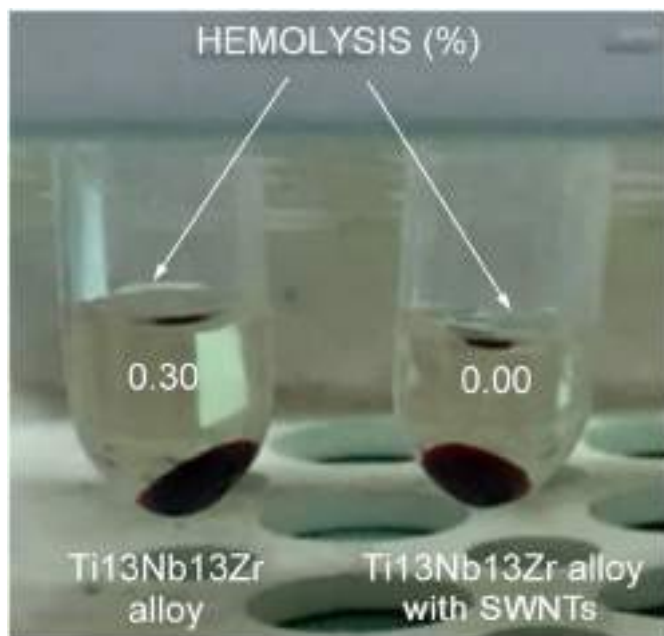


Fig. 7. Anti-hemolytic activity of the Ti13Nb13Zr alloy before and after anodization.

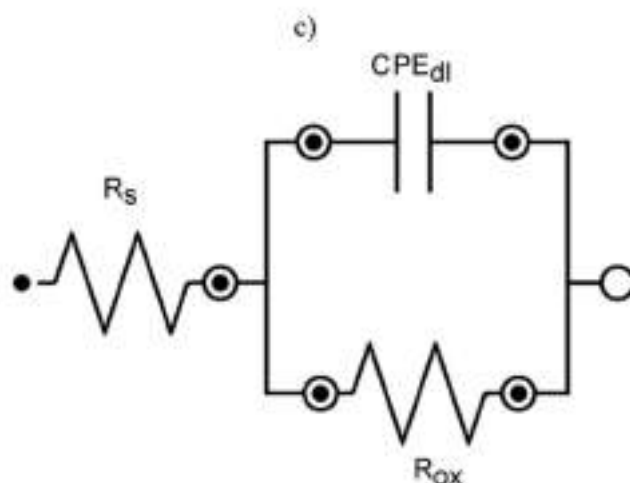
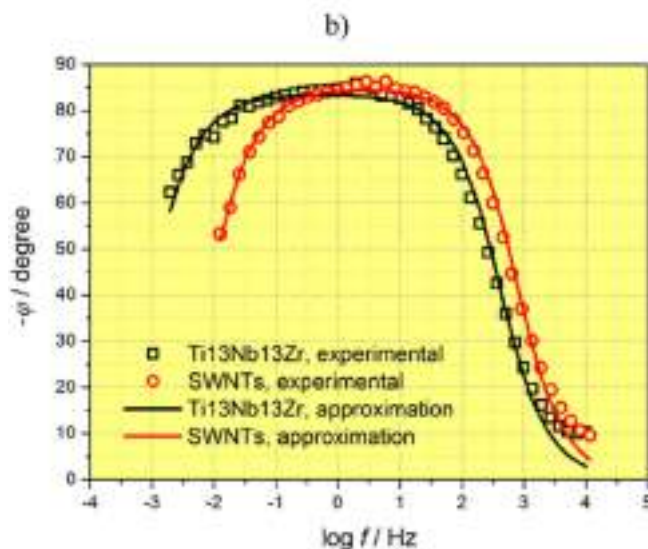
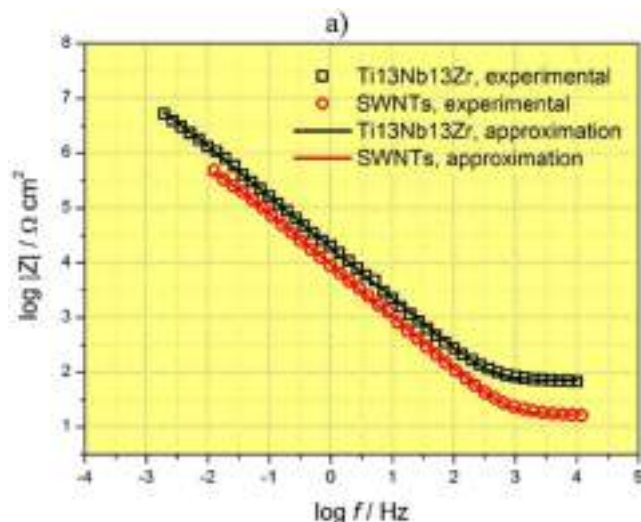


Fig. 9. Experimental (symbol) and approximated (line) Bode diagrams in the form of: a)  $\log |Z| = f(\log f)$ , and b)  $\varphi = f(\log f)$  for the Ti13Nb13Zr electrode before and after anodization in NSS at 37 °C. Symbols are experimental data and lines represent approximation results; c) equivalent electrical circuit model used for approximation of the experimental EIS data for the system: Ti13Nb13Zr electrode | oxide layer | NSS and Ti13Nb13Zr electrode | SWNTs | NSS.

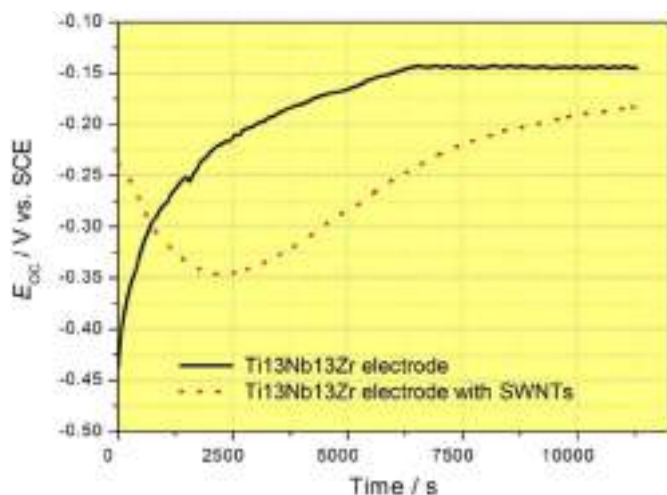


Fig. 8. Open circuit potential versus time for the Ti13Nb13Zr alloy before and after anodization in NSS at 37 °C.

the porous electrode with SWNTs (Fig. 8, dotted line), the OCP results indicate that the  $E_{OC}$  showed a different course in time. It rapidly decreased from  $-0.238$  V to  $-0.347$  V for 30 min and after this the  $E_{OC}$  started to increase to  $-0.183$  V for 3 h at the end of the measurement. After 3.5 h of immersion, the SWNTs layer revealed slightly lower  $E_{OC}$  than the smooth Ti13Nb13Zr electrode due to the presence of porous structure. Open circuit potential is important since informs that the electrode with lower  $E_{OC}$  will dissolve faster in the electrolyte, and may be treated as approximate corrosion potential,  $E_{cor}$ . The measurement conditions at  $E_{OC}$  for the Ti13Nb13Zr electrode in NSS at 37 °C are very similar to in vivo conditions in the human body.

Currently, the EIS study has been increasingly used for characterization of oxide films [2,30,42,45–47]. This is one of the more universal methods for testing the kinetics of electrode processes with simultaneous determination of electrical characteristics of the interface electrode | electrolyte solution on which the electrode reaction takes place [42,48–55]. Faraday's impedance describes the rate of charge transfer ( $R_{ct}$ ) across the phase boundary, which is characterized by the electrical double layer ( $C_{dl}$ ), where the capacity of the  $C_{dl}$  plays an important role.

**Table 1**

The values of parameters with their standard deviations and the results of chi-square test, obtained using the equivalent circuit model (Fig. 9c) to approximate EIS data for the Ti13Nb13Zr electrode | oxide layer | NSS and Ti13Nb13Zr electrode | SWNTs | NSS systems at 37 °C.

Electrode	$\chi^2$	Sum of squares	$R_s$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$T_{dl}$ ( $\text{F s}^{\phi-1} \text{ cm}^{-2}$ )	$\phi_{dl}$	$R_{ox}$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$C_{dl}$ ( $\text{F cm}^{-2}$ )
Ti13Nb13Zr	0.01	1.05	70.75 (1.06)	$9.60 \cdot 10^{-6}$ ( $7.98 \cdot 10^{-8}$ )	0.930 (0.002)	$1.24 \cdot 10^7$ ( $8.60 \cdot 10^5$ )	$5.52 \cdot 10^{-6}$ ( $2.76 \cdot 10^{-7}$ )
Ti13Nb13Zr with SWNTs	0.02	1.61	16.69 (0.41)	$1.96 \cdot 10^{-5}$ ( $3.32 \cdot 10^{-7}$ )	0.944 (0.004)	$8.09 \cdot 10^5$ ( $6.55 \cdot 10^4$ )	$1.22 \cdot 10^{-5}$ ( $6.10 \cdot 10^{-7}$ )

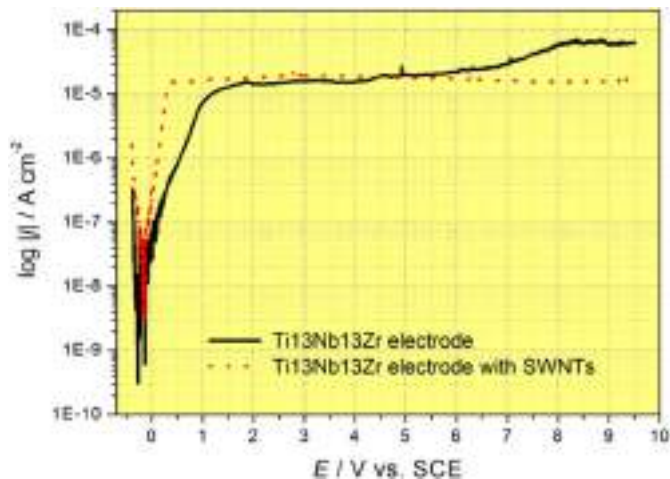


Fig. 10. Anodic potentiodynamic curve for the Ti13Nb13Zr electrode before and after anodization in NSS at 37 °C.

The experimental EIS results (symbol) performed potentiostatically at  $E_{OC}$  for the Ti13Nb13Zr electrode with the self-passive layer and with SWNTs layer on the surface, are shown in the form of Bode plots,  $\log |Z| = f(\log f)$  (Fig. 9a) and  $\varphi = f(\log f)$  (Fig. 9b). The high values of  $|Z|_{f \rightarrow 0}$  and  $\varphi$  close to  $-90^\circ$  are visible for both electrodes which are typical of a capacitive behavior of a high corrosion resistance material [2,30,42,45–47]. The slightly higher impedance values in the whole range of the studied frequencies (Fig. 9a) and the wider plateau at intermediate frequencies (Fig. 9b) corresponding to higher corrosion resistance, was recorded for the Ti13Nb13Zr electrode with the self-passive barrier-layer against corrosion. In the case of the Ti13Nb13Zr electrode with SWNTs, a large dispersion of the time constants was observed at low frequencies below 13 MHz due to the porous structure. Only one time constant on the Bode-phase plot was visible (Fig. 9b).

All registered impedance plots were analyzed using the CNLS method. The best fit to the experimental data for the Ti13Nb13Zr | oxide layer | NSS and Ti13Nb13Zr | SWNTs | NSS systems was obtained using the modified Randles' equivalent circuit (Fig. 9c). To fitting procedure instead of a capacitor, the constant phase element (CPE) was used because of that ac impedance plots deviated from the classical Randles' equivalent circuit [56]. The CPE impedance is given by the following equation:

$$\hat{Z}_{CPE} = \frac{1}{T(j\omega)^\phi} \quad (4)$$

where  $T$  (in  $\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{\phi-1}$ ) denotes the capacitance parameter, and  $\phi \leq 1$  is a dimensionless CPE exponent related to the constant phase angle,  $\alpha = 90^\circ(1-\phi)$ . In the model shown in Fig. 9c,  $R_s$  represents the electrolyte resistance,  $R_{ox}$  is the resistance of charge transfer through the oxide layer | NSS or SWNTs | NSS interface, and  $C_{dl}$  parameter corresponds to the CPE element. In Fig. 9a and b continuous lines indicate fitting using CNLS method and the electrical equivalent circuit shown in Fig. 9c. A very good fit to the experimental EIS data for both test electrodes was obtained. The results of the fitting procedure are presented in Table 1. The high quality of fit was verified by small values of  $\chi^2$  and sum of squares. The  $R_{ox}$  value for the Ti13Nb13Zr | oxide layer | NSS interface of  $1.24 \cdot 10^7 \Omega \text{ cm}^2$  is about two orders of magnitude

higher than that for the Ti13Nb13Zr | SWNTs | NSS system. It means that the kinetics of electrochemical corrosion in NSS is slower at the smooth Ti13Nb13Zr electrode as compared with that at the porous Ti13Nb13Zr electrode. The values of  $\phi_{dl}$  show that the surface roughness and heterogeneities of SWNTs layer do not cause significant changes in the impedance behavior of the test material.

The values of average  $\bar{C}_{dl}$  were determined based on formula given by Brug et al. [56]:

$$T = \bar{C}_{dl}^\phi (R_s^{-1} + R_{ct}^{-1})^{1-\phi} \quad (5)$$

The calculated value of  $\bar{C}_{dl}$  of order  $10^{-6} \text{ F cm}^{-2}$  for the as-received Ti13Nb13Zr electrode (Table 1) is typical for passivated metallic biomaterials observed in the literature [2,45,46]. This value is lower than that for the Ti13Nb13Zr electrode with SWNTs, and suggests higher corrosion resistance. This difference in the  $\bar{C}_{dl}$  values is connected with the weaker surface development of the self-passivated oxide layer in comparison with the porous surface of SWNTs layer.

The results of potentiodynamic study with anodic potential limited to 9.5 V for the Ti13Nb13Zr electrode before and after anodization in NSS at 37 °C, are presented in Fig. 10. For both test electrodes similar  $E_{cor}$  values and anodic behavior is observed. The only difference are higher current density values at potentials above 5.5 V for the as-received Ti13Nb13Zr electrode what indicates its slightly lower corrosion resistance in comparison with the electrode with SWNTs. It suggests that anodic dissolution of the self-passive nanometric oxide layer is faster than SWNTs layer. In both cases, the electrodes are in a passive state as evidenced by the wide plateau up to the potential value of 9.5 V. No evidence of pitting corrosion initiation which is characteristic for metallic implants in an environment containing aggressive chloride ions is observed [45]. SEM observations of the surface of the test electrodes after potentiodynamic measurements revealed no pits. It means that Nb and Zr as alloying additions influence the stability of the passive layer and slow down the process of anodic dissolution.

#### 4. Conclusions

The obtained results of FE-SEM, TEM, EDS, GIXD and XPS confirmed the possibility of formation of SWNTs on the surface of the biomedical Ti13Nb13Zr alloy by anodic oxidation in a solution of 1 M ethylene glycol with 4 wt%  $\text{NH}_4\text{F}$  at a voltage of 50 V for 80 min at room temperature. An amorphous character of the obtained SWNTs layer on this bi-phase ( $\alpha + \beta$ ) alloy, was found. The morphological parameters of the formed nanotubes were determined to be  $\sim 10 \mu\text{m}$  in the length, 362 nm in outer and 217 nm in inner diameter. XPS analysis showed that these SWNTs were composed of oxides of the alloying elements derived from:  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{ZrO}_2$ , and  $\text{ZrO}_x$ . Biological evaluation of biocompatibility of the Ti13Nb13Zr alloy proved that the material after anodization had no hemolytic effects and met the requirements for clinical application. Open circuit potential, EIS and potentiodynamic measurements in the normal saline solution at 37 °C, revealed a slight decrease of in vitro corrosion resistance for the modified Ti13Nb13Zr electrode as compared with the spontaneously passivated electrode due to formation of the porous structure of SWNTs. For both electrodes no initiation of pitting corrosion up to 9.5 V vs. SCE was found in potentiodynamic and SEM studies.

## Acknowledgments

This work was supported by the Young Scientist Project (No. 1M-0816-001-1-10).

## References

- [1] A. Smółka, K. Rodak, G. Dercz, K. Dudek, B. Łosiewicz, Electrochemical formation of self-organized nanotubular oxide layers on Ti13Zr13Nb alloy for biomedical applications, *Acta Phys. Pol. A* 125 (2014) 932–935, <http://dx.doi.org/10.12693/APhysPolA.125.932>.
- [2] A. Smółka, G. Dercz, K. Rodak, B. Łosiewicz, Evaluation of corrosion resistance of nanotubular oxide layers on the Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution, *Arch. Metall. Mater.* 60 (2015) 8–13, <http://dx.doi.org/10.1515/amm-2015-0432>.
- [3] A. Stróż, G. Dercz, B. Chmiela, D. Stróż, B. Łosiewicz, Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for biomedical applications, *Acta Phys. Pol. A* 130 (2016) 1079–1080, <http://dx.doi.org/10.12693/APhysPolA.130.1079>.
- [4] S. Grigorescu, C. Ungureanu, R. Kirchgeorg, P. Schmuki, I. Demetrescu, Various sized nanotubes on TiZr for antibacterial surfaces, *Appl. Surf. Sci.* 270 (2013) 190–196, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.12.165>.
- [5] S. Grigorescu, V. Pruna, I. Titorencu, V.V. Jinga, A. Mazare, P. Schmuki, I. Demetrescu, The two step nanotube formation on TiZr as scaffolds for cell growth, *Bioelectrochemistry* 98 (2014) 39–45, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.03.002>.
- [6] M. Sowa, M. Piotrowska, M. Widziołek, G. Dercz, G. Tylko, T. Gorewoda, A.M. Osyczka, W. Simka, Bioactivity of coatings formed on Ti-13Nb-13Zr alloy using plasma electrolytic oxidation, *Mater. Sci. Eng. C* 49 (2015) 159–173, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.073>.
- [7] J. Xu, L. Liu, P. Munroe, Z.-H. Xie, Promoting bone-like apatite formation on titanium alloys through nanocrystalline tantalum nitride coatings, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 4082–4094, <http://dx.doi.org/10.1039/C5TB00236B>.
- [8] S. Qian, Y. Qiao, X. Liu, Selective bifunctional modification of titanium implants for osteogenic and antibacterial applications, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 7475–7487, <http://dx.doi.org/10.1039/C4TB00973H>.
- [9] P.I. Branemark, S. Chien, H.-G. Grondahl, R. Kingslay (Eds.), *The Osseointegration Book: From Calvarium to Calcaneus*, Hanover Park, Quintessence Publ. Co, Inc., USA, 2005, pp. 5548–5559, <http://dx.doi.org/10.1039/C6TB01109H>.
- [10] L. Bai, R. Wu, Y. Wang, X. Wang, X. Zhang, X. Huang, L. Qin, R. Hang, L. Zhao, B. Tang, Osteogenic and angiogenic activities of silicon-incorporated TiO<sub>2</sub> nanotube arrays, *J. Mater. Chem. B* 4 (2016) 5548–5559, <http://dx.doi.org/10.1039/C6TB01109H>.
- [11] K. Das, S. Bose, A. Bandyopadhyay, Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti, *Acta Biomater.* 3 (2007) 573–585, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2006.12.003>.
- [12] K. Huo, B. Gao, J. Fu, L. Zhao, P.K. Chu, Fabrication, modification, and biomedical applications of anodized TiO<sub>2</sub> nanotube arrays, *RSC Adv.* 4 (2014) 17300, <http://dx.doi.org/10.1039/c4ra01458h>.
- [13] S.B. Patel, A. Hamlekhan, D. Royhman, A. Butt, J. Yuan, T. Shokuhfar, C. Sukotjo, M.T. Mathew, G. Jursich, C.G. Takoudis, Enhancing surface characteristics of Ti–6Al–4V for bio-implants using integrated anodization and thermal oxidation, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 3597, <http://dx.doi.org/10.1039/c3tb21731k>.
- [14] J. Choi, J.H. Lim, S.C. Lee, J.H. Chang, K.J. Kim, M.A. Cho, Porous niobium oxide films prepared by anodization in HF/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5502–5507, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2006.02.024>.
- [15] X. Wang, Y. Li, J. Xiong, P.D. Hodgson, C. Wen, Porous TiNbZr alloy scaffolds for biomedical applications, *Acta Biomater.* 5 (2009) 3616–3624, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.06.002>.
- [16] A. Bandyopadhyay, A. Shivaram, S. Tarafder, H. Sahasrabudhe, D. Banerjee, S. Bose, *In vivo* response of laser processed porous titanium implants for load-bearing implants, *Ann. Biomed. Eng.* 45 (1) (2017) 249–260, <http://dx.doi.org/10.1007/s10439-016-1673-8>.
- [17] J. Lełątko, T. Goryczka, T. Wierzchoń, M. Ossowski, B. Łosiewicz, E. Rówiński, H. Morawiec, Structure of low temperature nitrided/oxidized layer formed on NiTi shape memory alloy, *Solid State Phenom.* 163 (2010) 127–130, doi:<http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.163.127>.
- [18] A.M. Díez-Pascual, A.L. Díez-Vicente, Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the performance of polyphenylsulfone biomaterial for orthopaedic implants, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 7502–7514, <http://dx.doi.org/10.1039/C4TB01101E>.
- [19] Y. Yang, Y. Li, M. Pritzker, Morphological evolution of anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes, *RSC Adv.* 4 (2014) 35833–35843, <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA05006A>.
- [20] N. Liu, H. Mirabolghasemi, K. Lee, S.P. Albu, A. Tighineanu, M. Altomare, P. Schmuki, Anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes: double walled vs. single walled, *Faraday Discuss.* 164 (2013) 107–116, <http://dx.doi.org/10.1039/c3fd00020f>.
- [21] D. Guan, Y. Wang, Synthesis and growth mechanism of multilayer TiO<sub>2</sub> nanotube arrays, *Nano* 4 (2012) 2968, <http://dx.doi.org/10.1039/c2nr30315a>.
- [22] A.F. Cipriano, C. Miller, H. Liu, Anodic growth and biomedical applications of TiO<sub>2</sub> nanotubes, *J. Biomed. Nanotechnol.* 10 (2014) 2977–3003, <http://dx.doi.org/10.1166/jbn.2014.1927>.
- [23] J.A. Lyndon, B.J. Boyd, N. Birbilis, Metallic implant drug/device combinations for controlled drug release in orthopaedic applications, *J. Control. Release* 179 (2014) 63–75, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.01.026>.
- [24] T. Shokuhfar, S. Sinha-Ray, C. Sukotjo, A.L. Yarin, Intercalation of anti-inflammatory drug molecules within TiO<sub>2</sub> nanotubes, *RSC Adv.* 3 (2013) 17380–17386, <http://dx.doi.org/10.1039/C3RA42173B>.
- [25] A. Shivaram, S. Bose, A. Bandyopadhyay, Mechanical degradation of TiO<sub>2</sub> nanotubes with and without nanoparticulate silver coating, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 59 (2016) 508–518, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbm.2016.02.028>.
- [26] X. Wang, D. Chen, L. Cao, Y. Li, B.J. Boyd, R.A. Caruso, Mesoporous titanium zirconium oxide nanospheres with potential for drug delivery applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5 (2013) 10926–10932, <http://dx.doi.org/10.1021/am4031104>.
- [27] J. Wang, A. Jiang, M. Joshi, J. Christoforidis, Drug delivery implants in the treatment of vitreous inflammation, *Mediat. Inflamm.* 2013 (2013), <http://dx.doi.org/10.1155/2013/780634>.
- [28] K.C. Popat, M. Eltgroth, T.J. LaTempa, C.A. Grimes, T.A. Desai, Titania nanotubes: a novel platform for drug-eluting coatings for medical implants? *Small* 3 (2007) 1878–1881, <http://dx.doi.org/10.1002/sml.200700412>.
- [29] C. Chang, X. Huang, Y. Liu, L. Bai, X. Yang, R. Hang, B. Tang, P.K. Chu, High-current anodization: a novel strategy to functionalize titanium-based biomaterials, *Electrochim. Acta* 173 (2015) 345–353, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.05.075>.
- [30] L. Ainouche, L. Hamadou, A. Kadri, N. Benbrahim, D. Bradai, Interfacial barrier layer properties of three generations of TiO<sub>2</sub> nanotube arrays, *Electrochim. Acta* 133 (2014) 597–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2014.04.086>.
- [31] P. Roy, S. Berger, P. Schmuki, TiO<sub>2</sub> nanotubes: synthesis and applications, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 2904–2939, <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201001374>.
- [32] S.W. Ng, F.K. Yam, K.P. Beh, Z. Hassan, Titanium dioxide nanotubes in chloride based electrolyte: an alternative to fluoride based electrolyte, *Sains Malaysiana* 43 (2014) 947–951.
- [33] J. Jakubowicz, K. Jurczyk, M. Jurczyk, Electrochemical formation and corrosion properties of porous TiO<sub>x</sub> biomaterials, *Mater. Sci. Forum* 636–637 (2010) 15–21, <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.636-637.15>.
- [34] F.C. Materials, N.F. Fahim, T. Sekino, Using Rapid Anodization Method in Chloride-based Electrolytes, (n.d.) 10–11.
- [35] J.M. Macak, P. Schmuki, Anodic growth of self-organized anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes in viscous electrolytes, *Electrochim. Acta* 52 (2006) 1258–1264, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2006.07.021>.
- [36] J.M. Macák, H. Tsuchiya, P. Schmuki, High-aspect-ratio TiO<sub>2</sub> nanotubes by anodization of titanium, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 2100–2102, <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200462459>.
- [37] H. Jha, R. Hahn, P. Schmuki, Ultrafast oxide nanotube formation on TiNb, TiZr and TiTa alloys by rapid breakdown anodization, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 8883–8887, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2010.07.098>.
- [38] S. Materials, Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials 1, (n.d.) 1–9.
- [39] B.H. Davis, B. Jungerius, International council for standardization in haematology technical report 1-2009: new reference material for haemoglobinocyanide for use in standardization of blood haemoglobin measurements, *Int. J. Lab. Hematol.* 32 (2010) 139–141, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-553X.2009.01196.x>.
- [40] E.C.B. V. User Manual for Frequency Response Analysis (FRA) for Windows, (2001).
- [41] B.A. Boukamp, A nonlinear least squares fit procedure for analysis of admittance data of electrochemical systems, *Solid State Ionics* 20 (1986) 31–44, [http://dx.doi.org/10.1016/0167-2738\(86\)90031-7](http://dx.doi.org/10.1016/0167-2738(86)90031-7).
- [42] A. Lasia, *Electrochemical Impedance Spectroscopy and Its Applications*, (2002), <http://dx.doi.org/10.1007/0-306-46916-2>.
- [43] P.R. Bevington, D.K. Robinson, Data reduction and error analysis for the physical sciences, 2nd edn, *Comput. Phys.* 7 (1992) 324, <http://dx.doi.org/10.1063/1.4823194>.
- [44] S. Henkelman, G. Rakhorst, J. Blanton, W. van Oeveren, Standardization of incubation conditions for hemolysis testing of biomaterials, *Mater. Sci. Eng. C* 29 (2009) 1650–1654, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2009.01.002>.
- [45] M. Freitag, B. Łosiewicz, T. Goryczka, J. Lełątko, Application of EIS to study the corrosion resistance of passivated NiTi shape memory alloy in simulated body fluid, *Solid State Phenom.* 183 (2011) 57–64, <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.183.57>.
- [46] M. Szklarska, G. Dercz, J. Rak, W. Simka, B. Łosiewicz, The influence of passivation type on corrosion resistance of Ti15Mo alloy in simulated body fluids, *Arch. Metall. Mater.* 60 (2015), <http://dx.doi.org/10.1515/amm-2015-0433>.
- [47] W.-Q. Yu, J. Qiu, L. Xu, F.-Q. Zhang, Corrosion behaviors of TiO<sub>2</sub> nanotube layers on titanium in Hank's solution, *Biomed. Mater.* 4 (2009) 65012, <http://dx.doi.org/10.1088/1748-6041/4/6/065012>.
- [48] B. Łosiewicz, R. Jurczakowski, A. Lasia, Kinetics of hydrogen underpotential deposition at polycrystalline platinum in acidic solutions, *Electrochim. Acta* 80 (2012) 292–301, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.07.019>.
- [49] B. Łosiewicz, R. Jurczakowski, A. Lasia, Kinetics of hydrogen underpotential deposition at polycrystalline rhodium in acidic solutions, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 5746–5753, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2011.04.048>.
- [50] B. Łosiewicz, M. Martin, C. Lebouin, A. Lasia, Kinetics of hydrogen underpotential deposition at ruthenium in acidic solutions, *J. Electroanal. Chem.* 649 (2010) 198–205, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.04.002>.
- [51] B. Łosiewicz, L. Birry, A. Lasia, Effect of adsorbed carbon monoxide on the kinetics of hydrogen electroadsorption into palladium, *J. Electroanal. Chem.* 611 (2007) 26–34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2007.07.025>.
- [52] B. Łosiewicz, R. Jurczakowski, A. Lasia, Kinetics of hydrogen underpotential deposition at iridium in sulfuric and perchloric acids, *Electrochim. Acta* 225 (2017) 160–167, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2016.12.116>.
- [53] K. Kowalski, B. Łosiewicz, A. Budniok, M. Kupka, Effect of alloying on corrosion resistance of B2 FeAl alloy in aqueous solution of sulfuric acid, *Mater. Chem. Phys.* 126 (2011) 314–318, <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.11.020>.
- [54] B. Łosiewicz, A. Budniok, M. Freitag, M. Kupka, Structure and electrochemical

- corrosion resistance of the passivated Fe-40at.%Al binary alloy in sulfuric acid solution, *Solid State Phenom.* 163 (2010) 68–71. doi:10.4028/www.scientific.net/SSP.163.68.
- [55] B. Losiewicz, A. Budniok, A. Lasia, E. Łągiewka, Composite Ni-P + TiO<sub>2</sub> electro-coatings for hydrogen evolution reaction in alkaline solutions, *Pol. J. Chem.* 78 (2004).
- [56] G.J. Brug, A.L.G. van den Eeden, M. Sluyters-Rehbach, J.H. Sluyters, The Analysis of Electrode Impedances Complicated by the Presence of a Constant Phase Element, 176 (1984), pp. 275–295, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728\(84\)80324-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728(84)80324-1).

## Article

# Influence of Anodizing Conditions on Biotribological and Micromechanical Properties of Ti–13Zr–13Nb Alloy

Agnieszka Stróż <sup>1</sup>, Joanna Maszybrocka <sup>1</sup>, Tomasz Goryczka <sup>1</sup>, Karolina Dudek <sup>2</sup>, Patrycja Osak <sup>1</sup>  
and Bożena Łosiewicz <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Institute of Materials Engineering, Faculty of Science and Technology, University of Silesia in Katowice, 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland
- <sup>2</sup> Refractory Materials Center, Institute of Ceramics and Building Materials, Łukasiewicz Research Network, Toszecka 99, 44-100 Gliwice, Poland
- \* Correspondence: bozena.losiewicz@us.edu.pl; Tel.: +48-32-3497-527

**Abstract:** The biomedical Ti–13Zr–13Nb bi-phase ( $\alpha + \beta$ ) alloy for long-term applications in implantology has recently been developed. The porous oxide nanotubes' (ONTs) layers of various geometries and lengths on the Ti–13Zr–13Nb alloy surface can be produced by anodizing to improve osseointegration. This work was aimed at how anodizing conditions determinatine the micromechanical and biotribological properties of the Ti–13Zr–13Nb alloy. First-generation (1G), second-generation (2G), and third-generation (3G) ONT layers were produced on the Ti–13Zr–13Nb alloy surface by anodizing. The microstructure was characterized using SEM. Micromechanical properties were investigated by the Vickers microhardness test under variable loads. Biotribological properties were examined in Ringer's solution in a reciprocating motion in the ball-on-flat system. The 2D roughness profiles method was used to assess the wear tracks of the tested materials. Wear scars' analysis of the ZrO<sub>2</sub> ball was performed using optical microscopy. It was found that the composition of the electrolyte with the presence of fluoride ions was an essential factor influencing the micromechanical and biotribological properties of the obtained ONT layers. The three-body abrasion wear mechanism was proposed to explain the biotribological wear in Ringer's solution for the Ti–13Zr–13Nb alloy before and after anodizing.

**Keywords:** anodizing; biomaterials; biotribology; oxide nanotubes; Ti–13Zr–13Nb alloy



**Citation:** Stróż, A.; Maszybrocka, J.; Goryczka, T.; Dudek, K.; Osak, P.; Łosiewicz, B. Influence of Anodizing Conditions on Biotribological and Micromechanical Properties of Ti–13Zr–13Nb Alloy. *Materials* **2023**, *16*, 1237. <https://doi.org/10.3390/ma16031237>

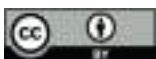
Academic Editor: Chunguang Yang

Received: 20 December 2022

Revised: 26 January 2023

Accepted: 29 January 2023

Published: 31 January 2023



**Copyright:** © 2023 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 (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Medical implants, which are a substitute for bone parts in the human body, are accompanied by the action of friction, which includes a set of phenomena occurring in the contact area of two bodies moving relative to each other, as a result of which resistance to movement arises [1–5]. As a consequence, the continuity of the passive layer or protective coating is broken, and then the native structure of the alloy changes. Thus, the protection against the corrosive environment is lost [6–14]. Biotribology deals with the search for minimizing the effects of friction, which would involve reducing the wear of the surfaces involved in the friction of the elements and reducing the energy accompanying the process [15–23].

Currently, four basic groups of metallic biomaterials can be distinguished, among which the most widely used are austenitic steels [4]. The second group consists of shape memory alloys belonging to smart materials [4,14]. For long-term implants, the service life of which should not exceed 15 years, cobalt alloys are applied [4]. Titanium and titanium alloys are most often used due to their best biocompatibility, and their service life may exceed 20 years [1–13,15–17,19,21]. The market of long-term implants is dominated by a commercially pure titanium alloy (Cp Ti) and a bi-phase ( $\alpha + \beta$ ) Ti–6Al–4V alloy known also as Grade 5 Titanium or Ti 6–4, which has excellent strength, a low modulus of

elasticity, high corrosion resistance, good weldability, and is heat treatable [19,23]. Al and V alloy additions increase the hardness of titanium and improve its physical and mechanical properties. However, the Ti–6Al–4V alloy shows unfavorable tribological properties, and its Young's modulus (~110 GPa) is higher than that of bone (~10–64 GPa). Aluminum has well-documented toxicity in the serum or urine of patients; moreover, it has a causal relationship with neurotoxicity and senile dementia of the Alzheimer type. In addition, vanadium is thermodynamically unstable in conditions corresponding to the tissue environment and is considered a toxic alloying additive, similarly to vanadium oxide ( $V_2O_5$ ), which has relatively good solubility and high toxicity in living organisms. Therefore, growing doubts about the cytotoxicity of the Ti–6Al–4V alloy have prompted investigations into the development of modern vanadium-free Ti alloys containing biocompatible elements such as Mo, Nb, Zr, and Ta, which are able to stabilize the  $\beta$  structure in titanium [10,24–26].

One of the newest classes of biomedical alloys which excludes harmful elements in the form of Al and V from the composition is the Ti–13Zr–13Nb alloy developed by Davidson and Kovacs [24]. The Ti–13Zr–13Nb alloy combines a low modulus with high strength and excellent hot and cold serviceability. Research on this alloy has shown that its mechanical properties can be controlled to a large extent by hot working, heat treating, and cold working. The Ti–13Nb–13Zr alloy also shows high corrosion resistance in a physiological environment, which is one of the most important factors that has a decisive impact on the use of a given biomaterial for implants [7,11,12,24,27]. Like titanium, niobium is an element with high corrosion resistance, which is due to its susceptibility to being covered with a self-passive  $Nb_2O_5$  oxide layer [28]. Zirconium has similar physicochemical properties to those of titanium and can be processed by similar methods. In some strength parameters, this element even surpasses titanium [23]. Zr is not ferromagnetic, which allows the use of implants made of the Ti–13Zr–13Nb alloy in patients undergoing nuclear magnetic resonance imaging. The Ti–13Nb–13Zr alloy is characterized by favorable mechanical properties for implant applications and a low Young's modulus. The alloys used for the production of biomaterials should have mechanical properties close to those they replace, therefore, the modulus of elasticity of Ti–13Zr–13Nb may vary between 41 and 83 GPa.

The natural and uneven oxide layer present on titanium and its alloys does not sufficiently protect the implant in the environment of body fluids, therefore the surfaces of these materials are often subjected to modification [6–8,11–14,29,30]. One of the currently most popular electrochemical methods of modifying the oxide film to form self-assembled nanotubular oxide structures is anodizing, which allows the production of oxide layers in the form of a matrix of ordered, vertically arranged oxide nanotubes (ONTs) [11–13,17–19,28,29,31–40]. The ONTs exhibit numerous unique properties compared to ultrathin oxide films formed spontaneously. Increasing the surface roughness at the nanoscale by producing ONTs contributes to a better adhesion tendency of bone-forming cells. The porous surface of the ONT layers has a beneficial effect on the osseointegration process and ensures faster tissue growth and stronger bonding of the bone with the implant due to the chemical and morphological similarity of the nanotube oxide layer to the structure of bone tissue. The type of electrolyte in which the anodizing process is carried out has the greatest impact on the microstructure and properties of the ONTs obtained on titanium oxide and its alloys [11–13,17–19,28,29,31–40]. The prospect of using ONTs dominated the efforts of researchers at the expense of understanding the mechanical properties of the nanotubular oxide layer [21,23,36,41–43]. Most biocompatibility studies of ONTs focus on their use in dentistry, orthopedics, and cardiovascular surgery due to their high affinity for bone cell adhesion and differentiation, hydroxyapatite formation, and outstanding biochemical inertia [1–5]. ONT layers on the surface of titanium and its alloys are considered promising bionanomaterials for controlled drug delivery systems to suppress local inflammation after the implantation process [29]. The possibility of selecting anodizing parameters when obtaining ONTs with desired, predetermined morphological features can be used in practical applications in personalized medicine. ONTs used as intelligent drug carriers enable the delivery of poorly water-soluble drugs and prevent



the first-pass effect through the liver. ONTs can be produced on a variety of substrates, including three-dimensional, nonplanar, and curved surfaces such as, for example, thin, long surgical wires and bone fixation needles, allowing ONTs to be clinically used on the surface of implants or surgical supports in orthopedics [31–40]. However, despite numerous studies on ONTs, relatively little is known about their impact on biotribological wear of modern titanium alloys in a biological environment due to the dominance of research in dry sliding conditions [17,19].

This work is a continuation of our interest in the surface functionalization of the biomedical Ti–13Zr–13Nb alloy through the production of ONTs of the first, second, and third generation. The main purpose of the undertaken research is to determine for the first time the effect of anodizing conditions on biotribological wear in Ringer’s solution and micromechanical properties of the Ti–13Zr–13Nb alloy for the development of long-term implants. This work brings new insights into the relationship between the anodizing conditions and biotribological wear of the Ti–13Zr–13Nb alloy under wet sliding conditions.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Substrate Surface Treatment

The substrate material was a rod with a diameter of 9 mm and a length of 1 m made of a bi-phase Ti–13Zr–13Nb alloy composed of a mixture of  $\alpha$  and  $\beta$  phases (BIMO TECH, Wrocław, Poland) with a chemical composition in wt% according to the standard ASTM F1713-08(2021)e1 [44]. One side of the cut samples in the shape of disks with a thickness of 5 mm was subjected to wet grinding and polishing using a metallographic grinding and polishing machine Metkon Forcipol 102 (Metkon Instruments Inc., Bursa, Turkey), equipped with an automatic header. The samples were embedded into conductive PolyFast resin (Struers, Cleveland, OH, USA) using an ATM Opal 400 hot mounting press (Spectrographic Ltd., Guiseley, Leeds, UK) at 180 °C for 10 min. A mirror-like surface of the substrate was obtained on a wheel used for grinding at 250 rpm with water-based silicon carbide abrasive papers of P600 to P2500 gradations (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA). Diamond suspensions with 6 to 1  $\mu\text{m}$  grain size (Buehler, Waukegan, IL, USA) were used for further polishing. Polishing was finished using a polishing cloth (Buehler, Waukegan, IL, USA) and a colloidal  $\text{SiO}_2$  suspension with a grain size of 0.04  $\mu\text{m}$  (Struers, Cleveland, OH, USA).

The polished samples were cleaned for 20 min in an ultrasonic cleaner USC-TH (VWR International, Radnor, PA, USA) with acetone (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland) and then in ultrapure water with resistivity of 18.2  $\text{M}\Omega\text{ cm}$  (Milli-Q Advantage A10 Water Purification System, Millipore SAS, Molsheim, France) with two Milli-Q water changes. As a result of high-frequency ultrasonic waves propagating in the liquid, vacuum bubbles were formed, under the influence of which rapid evaporation of the liquid and the formation of water vapor bubbles took place. During the implosion of the vacuum bubbles, a local increase in temperature and pressure was generated. The imploding bubbles, located at the contaminated surface, detached the pollutants.

### 2.2. Anodizing Conditions of Ti–13Zr–13Nb Alloy

Anodes made of the Ti–13Zr–13Nb alloy with a one-sided geometric surface area of 3.14  $\text{cm}^2$  were prepared in accordance with the detailed information provided in our earlier work [29]. Immediately before anodizing, the prepared electrodes were immersed in 25%  $v/v$   $\text{HNO}_3$  (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland) for 10 min at room temperature to remove oxides from the surface of the Ti–13Zr–13Nb alloy, and then sonicated in Milli-Q water for 20 min.

The ONTs on the Ti–13Zr–13Nb electrode surface were produced in a two-electrode system by one-step anodizing at room temperature under the conditions shown in Table 1.

**Table 1.** Conditions for anodic production of 1G [32], 2G [34], and 3G [31] ONTs on the Ti–13Zr–13Nb alloy.

Conditions	ONTs on Ti–13Zr–13Nb		
	I Generation (1G)	II Generation (2G)	III Generation (3G)
Voltage (V)	20	20	50
Time (min)	120	120	80
Electrolyte	0.5% HF	1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 2% NH <sub>4</sub> F	1M C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> + 4% NH <sub>4</sub> F
Inner diameter of ONT (nm)	71(7)	61(11)	218(39)
Outer diameter of ONT (nm)	87(10)	103(16)	362(44)
Length of ONT (μm)	0.94(9)	3.9(2)	9.7(6)

Hydrofluoric acid (48 wt.% in H<sub>2</sub>O, ≥99.99% trace metals basis), ammonium sulfate (for molecular biology, ≥99.0%), ammonium fluoride (≥99.99% trace metals basis), and ethylene glycol (anhydrous, 99.8%) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). A PWR800H high-current power supply (Kikusui Electronics Corporation, Yokohama, Japan) was used. The anodes with freshly prepared ONTs were placed in Milli-Q water, which was vigorously stirred for 5 min.

### 2.3. Physicochemical Characteristics of ONTs on Ti–13Zr–13Nb Alloy

The microstructure of the Ti–13Zr–13Nb alloy before and after anodizing was studied using a TESCAN Mira 3 LMU scanning electron microscope (SEM, TESCAN ORSAY HOLDING, Brno-Kohoutovice, Czech Republic). The secondary electrons (SE) were used for imaging that were generated by the incoming electron beam as they entered the surface. The use of SE allowed to obtain a high-resolution signal with a resolution that was only limited by the electron beam diameter. The SEM examinations were performed on the samples covered by an ultrathin layer of chromium deposited using a Quorum Q150T ES Sputter Coater (Quorum Technologies, East Sussex, UK).

### 2.4. Microhardness of ONTs on Ti–13Zr–13Nb Alloy

The microhardness of the Ti–13Zr–13Nb alloy before and after anodizing was determined using the Vickers method by means of a Wilson<sup>®</sup>–Wolpert<sup>TM</sup> Microindentation Tester 401MVD (Wilson Instruments, LLC, Carthage, TX, USA). A hardness scale of HV = 0.1 was used. A Vickers indenter was applied, which was a square-based pyramidal-shaped diamond indenter with face angles of 136° according to the ISO 6507-1 standard [45]. The Vickers microhardness measurements were performed with variable loads of 490, 980, 1560, and 4900 mN, respectively. Indentation diagonal lengths were between 0.020 and 1.400 mm. The Vickers hardness number was calculated based on Equation (1):

$$\mu\text{HV} = \frac{1854.4 \times P}{d^2} \quad (1)$$

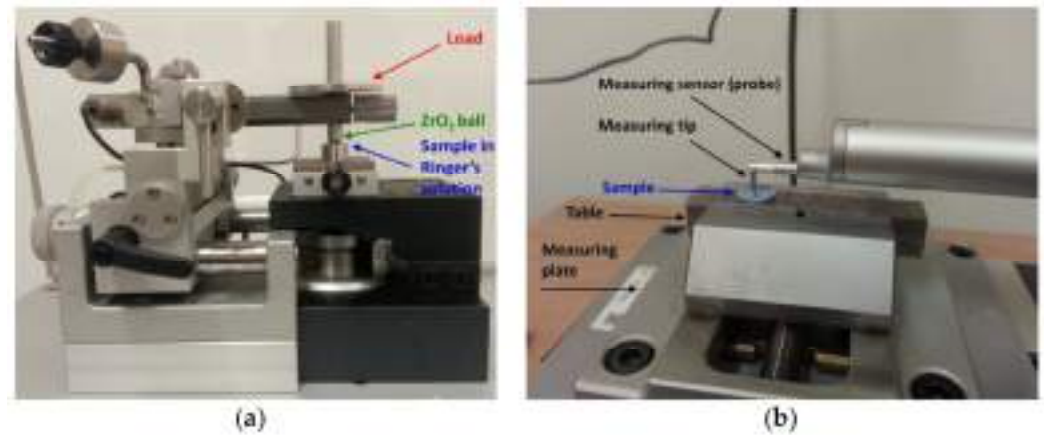
where P—force (gf) and d—mean diagonal length of the indentation (μm).

A direct method of checking and calibrating the microhardness tester, indenter, and diagonal length of the measuring system was used according to the ISO 6507-2:2018 standard [46].

### 2.5. Biotribology of ONTs on Ti–13Zr–13Nb Alloy in Ringer's Solution

Measurements of biotribological wear of the Ti–13Zr–13Nb alloy in the initial state and after anodizing were performed in a reciprocating motion in the ball-on-flat system using a tribometer (Anton Paar Polska, Warsaw, Poland) shown in Figure 1a. The counter-sample in the test was a ZrO<sub>2</sub> ball with a diameter of 6 mm. The tests were carried out in Ringer's solution with the chemical composition (g cm<sup>−3</sup>): 8.60—NaCl, 0.30—KCl, and 0.33—CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O. To adjust the pH of the solution to 7.4(1), 4% NaOH and 1% C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

were used. Chemical reagents of recognized analytical grade (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland) and Milli-Q water were used to prepare the solution. The normal force ( $F_n$ ) in the friction node was 1 N. A sliding rate ( $r$ ) of  $2.5 \text{ cm s}^{-1}$  and stroke length ( $l$ ) of 4 mm were applied. The biotribological test consisted of 3749 cycles (back and forth = 1 cycle), which corresponded to a total friction distance ( $s$ ) of 30 m.



**Figure 1.** Setup for testing biotribological wear: (a) tribometer for measurements in the ball-on-flat system with a load of 1 N; (b) method of arranging the sample before testing on the contact profilograph.

The assessment of biotribological wear of the tested samples was carried out based on profilometric analysis of wear scars using the SURFTEST SJ-500 profilometer (Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan) shown in Figure 1b.

The specific wear rate ( $V_v$ ) in  $\text{mm}^3 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-1}$  was determined according to Equation (2):

$$V_v = \frac{A \cdot l}{F_n \cdot s} \quad (2)$$

where  $A$ —the wear scar area ( $\text{mm}^2$ ),  $l$ —the stroke length (mm),  $F_n$ —the normal force (N), and  $s$ —the friction distance (m).

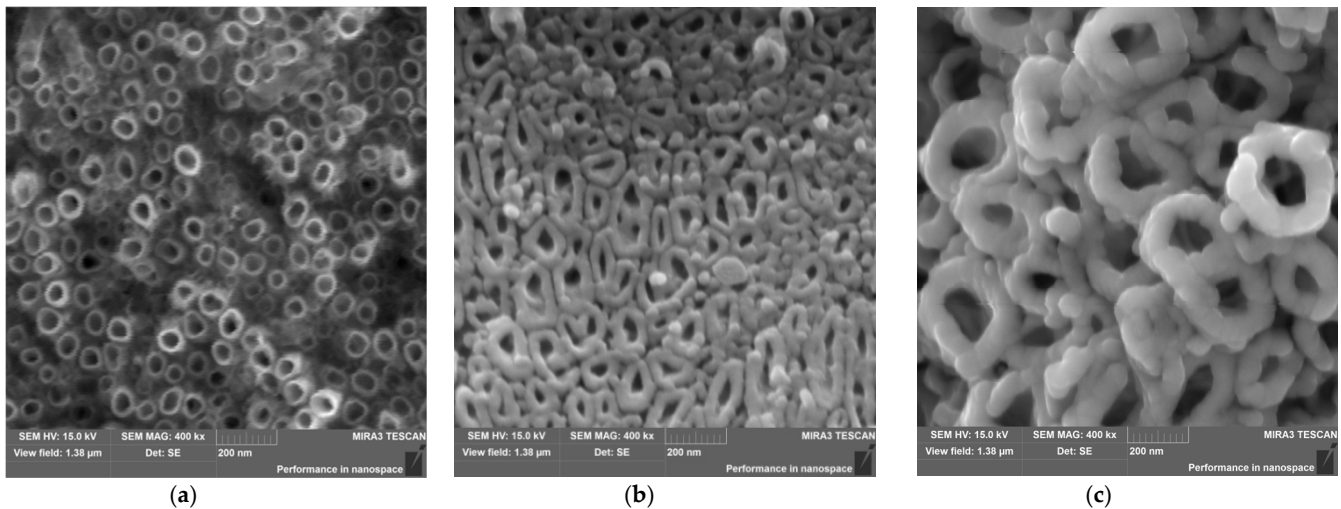
The biotribological wear analysis of the  $\text{ZrO}_2$  ball was carried out based on measurements of the diameter of the wear scar on the counter-sample using a BX51 optical microscope (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan). The microstructure was analyzed, with particular emphasis on the surface of the wear scar of the tested samples, resulting from prior biotribological testing.

Five samples of each type were tested, and the values of the determined parameters are the average values with their standard deviations (SD).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Microstructure of ONTs on Ti-13Zr-13Nb Alloy

Figure 2 shows SEM images of the microstructure of the self-assembled ONTs obtained on the surface of the Ti-13Zr-13Nb alloy by anodizing under different conditions (see Table 1). The detailed mechanism of the electrochemical formation of ONT layers on the surface of the Ti-13Zr-13Nb alloy in electrolytes containing fluoride ions that form water-soluble complexes with titanium, zirconium, and niobium was described in our earlier paper [33,35]. A strong influence of the type of electrolyte on the surface morphology of the obtained ONT layers could be observed. The on-top general view of the Ti-13Zr-13Nb alloy with the ONTs of 1G (Figure 2a), 2G (Figure 2b), and 3G (Figure 2c) revealed the presence of well-developed and evenly distributed oxide nanotubes with single and very smooth walls.



**Figure 2.** SEM image of the microstructure of ONT layer on the Ti–13Zr–13Nb alloy obtained by anodizing in: (a) 0.5% HF electrolyte (1G); (b) 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 2%  $\text{NH}_4\text{F}$  electrolyte (2G); (c) 1M  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$  + 4%  $\text{NH}_4\text{F}$  electrolyte (3G).

The 1G ONTs had the smallest inner diameter of 71(7) nm, an outer diameter of 87(10) nm, and nanotube length of 0.94(9)  $\mu\text{m}$  [32]. The wall thickness of the 1G ONTs was also the smallest among all the obtained generations of ONTs on the surface of the Ti–13Zr–13Nb alloy. The ONTs formed in the 0.5% HF electrolyte at 20 V for 120 min had a circular or elliptical cross-section (Figure 2a). The 2G ONTs were characterized by higher values of geometrical parameters of the produced nanotubes on the Ti–13Zr–13Nb alloy, which were determined based on SEM images from selected areas of the oxide surfaces (Figure 2b). The ONTs with an inner diameter of 61(11) nm and an external diameter of 103(16) nm were obtained in the electrolyte of 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 2%  $\text{NH}_4\text{F}$  at 20 V for 120 min [34]. The length of vertically positioned 2G ONTs with a circular cross-section was 3.9(2)  $\mu\text{m}$ . The 2G ONTs were the most densely packed and tended to form clusters of oxide nanotubes of various lengths. The obtained results showed that using the organic electrolyte 1M  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$  + 4%  $\text{NH}_4\text{F}$  at 50 V for 80 min allowed obtaining an over three-fold increase in inner diameter and an about four-fold increase in outer diameter of 3G ONTs compared to that of the ONTs of 1G and 2G [31]. The ONTs of 3G with a circular cross-sectional shape had the thickest nanotube walls. The length of 3G ONTs increased more than 10-fold and two-fold compared to the length of 1G ONTs and 2G ONTs, respectively.

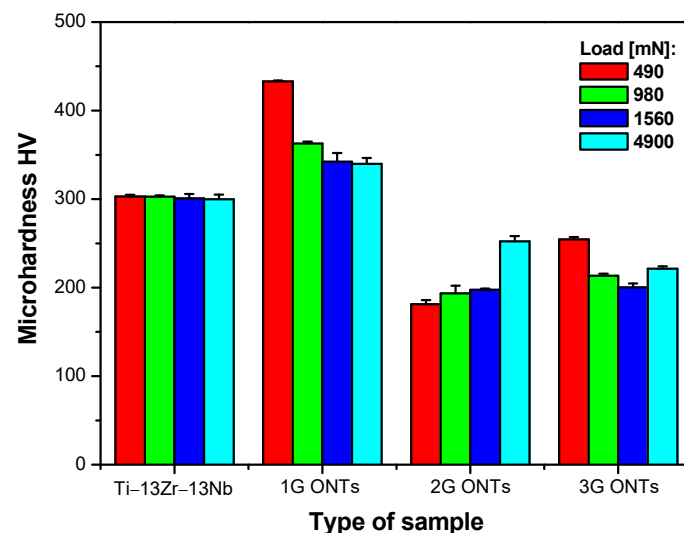
The obtained results indicate that the modification of the surface of the Ti–13Zr–13Nb alloy made it possible to obtain porous layers of ONTs with different morphological parameters and lengths. The surface morphology of all obtained generations of ONTs was very similar to the structure of trabecular bone, which will affect the ability to transfer load by implants made of the Ti–13Zr–13Nb alloy with an ONT layer applied. It was signaled in the literature that ONT layers on titanium and its alloys show the ability to accelerate osseointegration, leveling the inflammatory states and preventing the penetration of harmful corrosion products into the biological environment of the body [10,41,43]. The ONT layers can also be used as intelligent carriers of medicinal substances in drug delivery systems, especially for personalized medicine [29].

Long-term in vitro corrosion resistance studies of the Ti–13Zr–13Nb alloy in saline solution showed the influence of the electrode immersion time on the change in the thickness of the self-passive oxide layer [7]. In studies using the electrochemical impedance spectroscopy method, it was shown that the thickness of the self-passive oxide layer increased from 0.6 to 2.3 nm for 20 days of immersion. It should be emphasized that after 20 days of immersion tests, no pitting was observed on the surface of the Ti–13Zr–13Nb alloy. Comparative assessment of the determined corrosion resistance parameters showed that surface modification of the Ti–13Zr–13Nb alloy by anodizing increased its corrosion

resistance in a saline solution for the 2G ONT layers [12] and slightly decreased for the 3G ONT layer [31] as compared to the non-anodized Ti–13Zr–13Nb alloy surface. It was shown that the in vitro corrosion resistance of ONT layers depended on their structure and morphological parameters. In the case of both the Ti–13Zr–13Nb alloy before and after the production of 2G and 3G ONT layers, no breakdown potential was revealed in potentiodynamic tests conducted up to 9.5 V, which indicates that the tested biomaterials had excellent resistance to pitting corrosion and can be promising biomaterials for long-term use in implantology.

### 3.2. Micromechanical Properties of ONTs on Ti–13Zr–13Nb Alloy

The assessment of the effect of anodizing conditions on the micromechanical properties of the Ti–13Zr–13Nb alloy was carried out based on the Vickers microhardness tests. Microhardness, which is the hardness of the material exposed to low applied loads, is particularly useful for assessing the structural integrity of the bone tissue on the surface of the porous layer of ONTs and the bone tissue that surrounds the implant in the process of osseointegration. For this reason, it is important to compare the micromechanical properties of the Ti–13Zr–13Nb alloy before and after anodizing. The quantitative assessment of the anodizing effect in the microscale consisted in determining the micromechanical properties of the Ti–13Zr–13Nb alloy before and after the formation of ONT layers in various conditions of electrochemical oxidation (Figure 3).



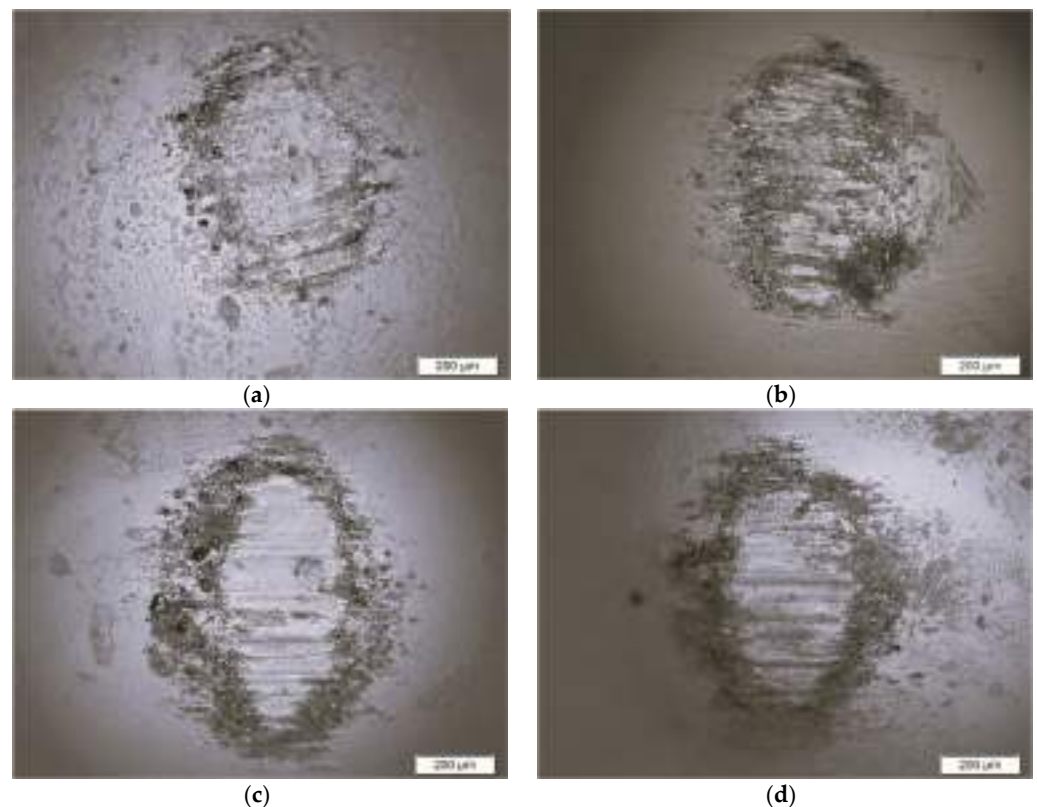
**Figure 3.** Vickers microhardness of the Ti–13Zr–13Nb alloy surface before and after anodizing with variable loads.

The results presented in Figure 3 indicate that Vickers microhardness of the Ti–13Zr–13Nb alloy changed as a result of anodizing. The value of Vickers microhardness for the non-anodized alloy determined under variable loads in the range from 490 to 4900 mN was constant within the error limits and amounted to 302(1). In the case of three generations of ONT layers, Vickers microhardness depended on the applied load, which resulted from the different lengths of the tested oxide nanotubes and their morphological parameters (Figure 2). Compared to the Ti–13Zr–13Nb alloy in the initial state, an increase in the microhardness was observed in the case of the 1G ONT layer, for which Vickers microhardness value decreased in the range from 433(1) to 340(7) with increasing load. Such micromechanical properties of the 1G ONT layer resulted from the smallest outer diameter of oxide nanotubes and their shortest length among all obtained generations of ONTs (Table 1). The 1G ONT layer had the largest number of individual nanotubes on the surface, and thus had the greatest load carrying capacity [18,19]. Vickers microhardness value dropped for the 2G and 3G ONT layers compared to that of the substrate surface and 1G ONT layer (Figure 3). The 2G ONT layers showed the smallest Vickers microhardness ranging

from 181(5) to 252(6) with increasing load in the range of 490 to 4900 mN. The 3G ONT layers revealed a slightly higher Vickers microhardness than the 2G ONT layers did, which varied from 254(3) to 221(3) with increasing load. Larger outer diameters of the 2G and 3G ONTs and their greater length cause easier deformation and cracking of the obtained oxide nanotubes [17]. With the increase in the ONTs diameter on the Ti–13Zr–13Nb alloy, the number of oxide nanotubes carrying loads in the contact area of the tested surfaces with the diamond indenter decreased. On the other hand, ONTs are able to compensate for the large hardness defect of the biomedical Ti–13Zr–13Nb alloy used for the production of implants, eliminate implant–bone stress mismatch, and minimize “stress shielding” [35].

### 3.3. Biotribological Properties of ONTs on Ti–13Zr–13Nb Alloy

Biotribological wear resistance tests and friction coefficient measurements were carried out under sliding friction conditions in the presence of Ringer’s solution, which was a biological lubricating fluid. The Ti–13Zr–13Nb alloy in the initial state and with the 1G, 2G, and 3G ONT layers was subjected to biotribological tests in reciprocating motion in the ball-on-flat system, after which microscopic analysis of wear scars of the ZrO<sub>2</sub> ball was performed (Figure 4).

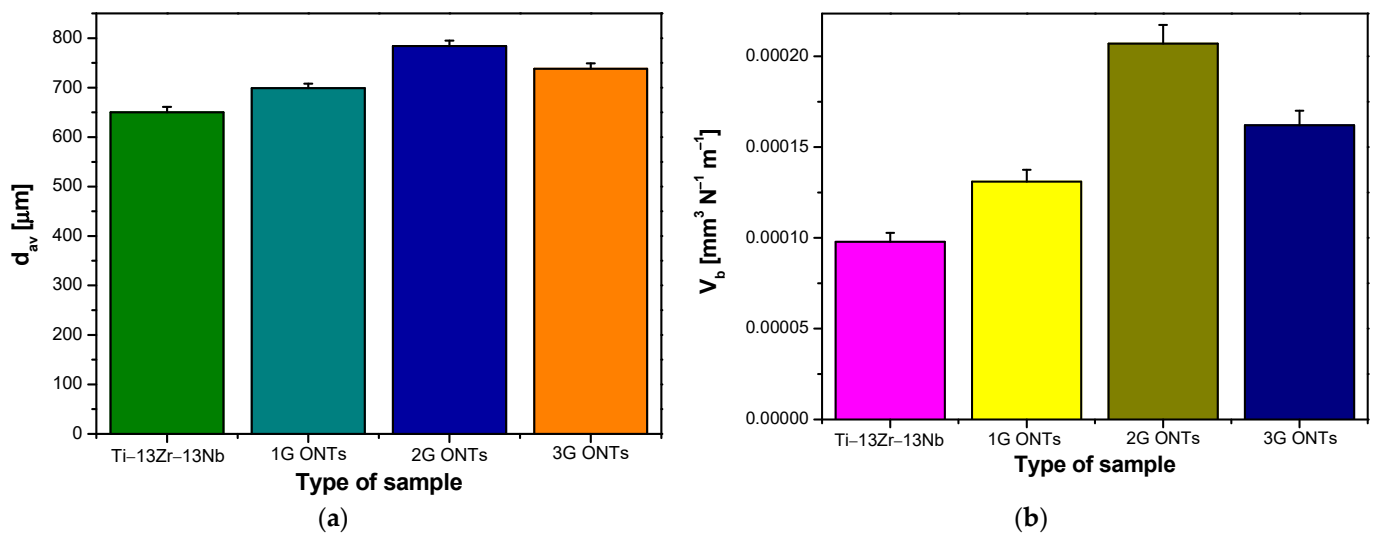


**Figure 4.** ZrO<sub>2</sub> ball wear scar after the ball-on-flat biotribological test against (a) Ti–13Zr–13Nb substrate; (b) 1G ONT layer; (c) 2G ONT layer; (d) 3G ONT layer.

On the microscopic images of counter-sample wear scars after the biotribological wear test, the direction of damage to the ball from top to bottom was observed for all tested materials. Residual abrasion of materials on the surface of the ZrO<sub>2</sub> ball was also visible. The wear scar of the ZrO<sub>2</sub> ball in combination with the surface of the Ti–13Zr–13Nb alloy was characterized by the smoothest surface with a small number of impurities transferred to the surface of the counter-sample compared to the tested ONT layers, which indicated the lowest biotribological wear of the alloy substrate. During the friction process of the 1G, 2G, and 3G ONT layers, numerous scratches appeared on the surface of the ZrO<sub>2</sub> ball. Such an effect was caused by the presence of residual abrasion products (debris) in the form

of particles of the ONTs, which were subject to abrasion during the friction process and constituted an additional factor damaging the surface, causing an increase in friction.

Based on microscopic observations, the average value of the  $ZrO_2$  ball wear scar diameter ( $d_{av}$ ) was determined, the values of which are shown in Figure 5a. The  $d_{av}$  value for the Ti–13Zr–13Nb alloy in the initial state was 650(11)  $\mu\text{m}$ . The  $d_{av}$  parameter assumed higher values in the presence of ONT layers produced on the alloy substrate, and thus indicated an increase in the specific wear of the counter-sample in the form of a  $ZrO_2$  ball ( $V_b$ ). Figure 5b shows a comparison of the  $V_b$  values determined for all tested materials. The  $ZrO_2$  ball wear scar for the 2G ONT layer had the largest width of  $d_{av} = 784(11)$   $\mu\text{m}$  (Figure 5a) and showed the largest value of  $V_b$  equal to  $2.07(10) \cdot 10^{-4}$   $\text{mm}^3 \text{N}^{-1} \text{m}^{-1}$  (Figure 5b), showing a more than two-fold increase in the biotribological wear of the counter-sample compared to  $V_b$  obtained for the  $ZrO_2$  ball–alloy Ti–13Zr–13Nb combination.

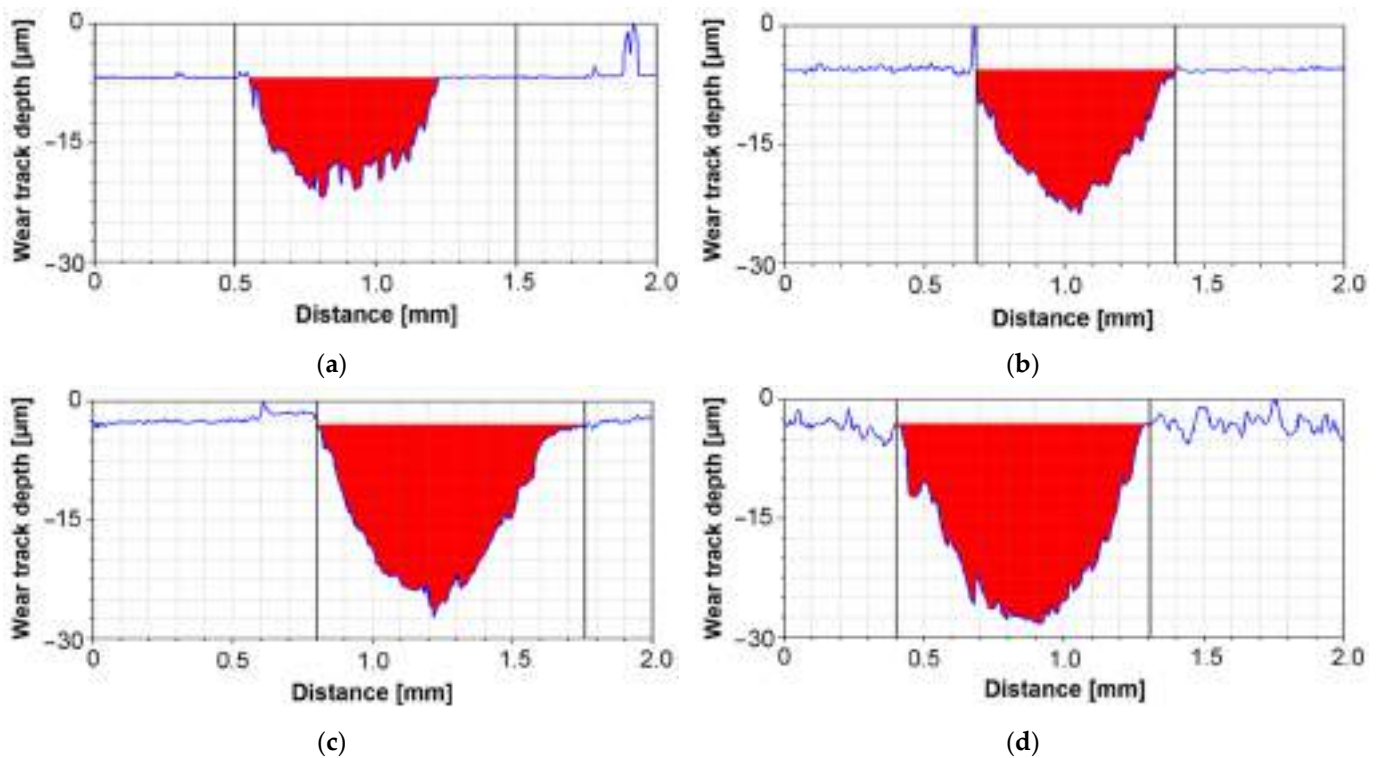


**Figure 5.** Parameters obtained after the biotribological wear test in the ball-on-flat system for the Ti–13Zr–13Nb alloy before and after anodizing: (a)  $ZrO_2$  ball wear scar ( $d_{av}$ ); (b)  $ZrO_2$  ball-specific wear ( $V_b$ ).

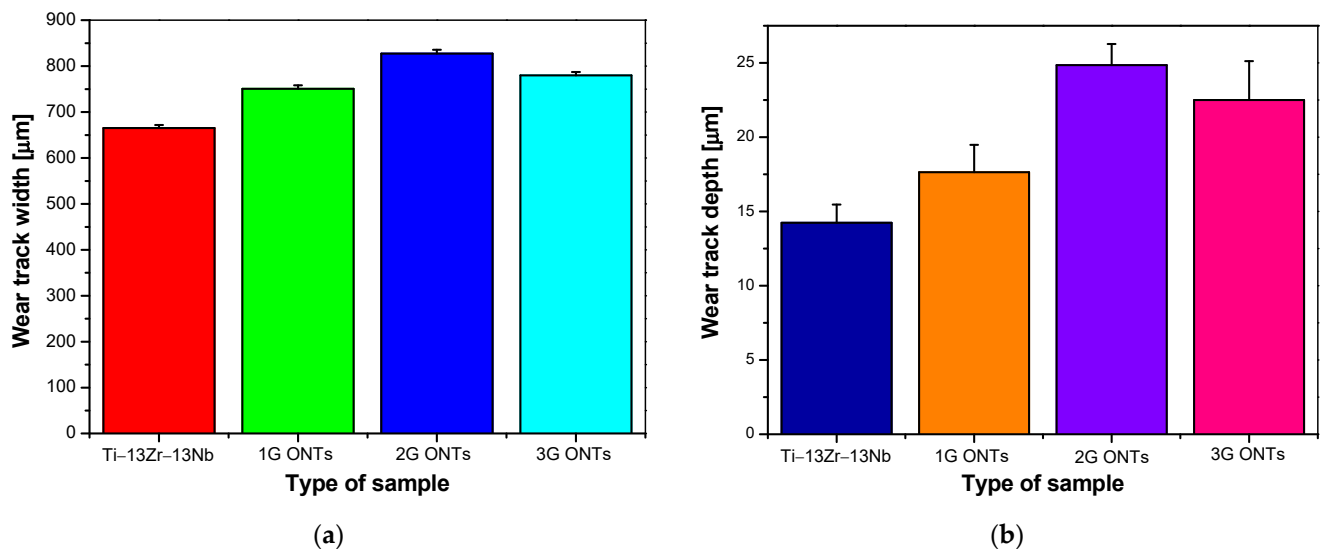
The results of profilometric tests of the wear track on the surface of the tested materials after the biotribological wear test in the ball-on-flat system are shown in Figure 6. Based on the obtained cross-sectional profiles of wear tracks for the Ti–13Zr–13Nb alloy before and after anodizing, it can be concluded that biotribological wear of the material surface depended on the anodizing conditions, while the surface of the Ti–13Zr–13Nb alloy in the initial state showed less material wear compared to anodized surfaces.

The width of the wear track for the surface of the Ti–13Zr–13Nb alloy determined based on the data in Figure 6 was 665(7)  $\mu\text{m}$ , and for electrochemically oxidized surfaces it increased, reaching the largest value of 827(8)  $\mu\text{m}$  for the 2G ONT layer. Larger values of the wear track width were observed for all the tested materials compared to the width of the  $ZrO_2$  ball wear scar (Figure 5a), which suggests a higher biotribological wear of the Ti–13Zr–13Nb alloy before and after anodizing compared to the  $ZrO_2$  ball used in a ball-on-flat combination.

Figure 7b presents wear track depth obtained after the biotribological wear test for the Ti–13Zr–13Nb alloy before and after electrochemical oxidation. The smallest wear track depth was shown by the alloy substrate, the value of which was 14(1)  $\mu\text{m}$ . All generations of ONT layers showed greater wear track depth compared to that of the non-anodized substrate, with the greatest wear track depth value being 25(1)  $\mu\text{m}$  for the 2G ONT layer.



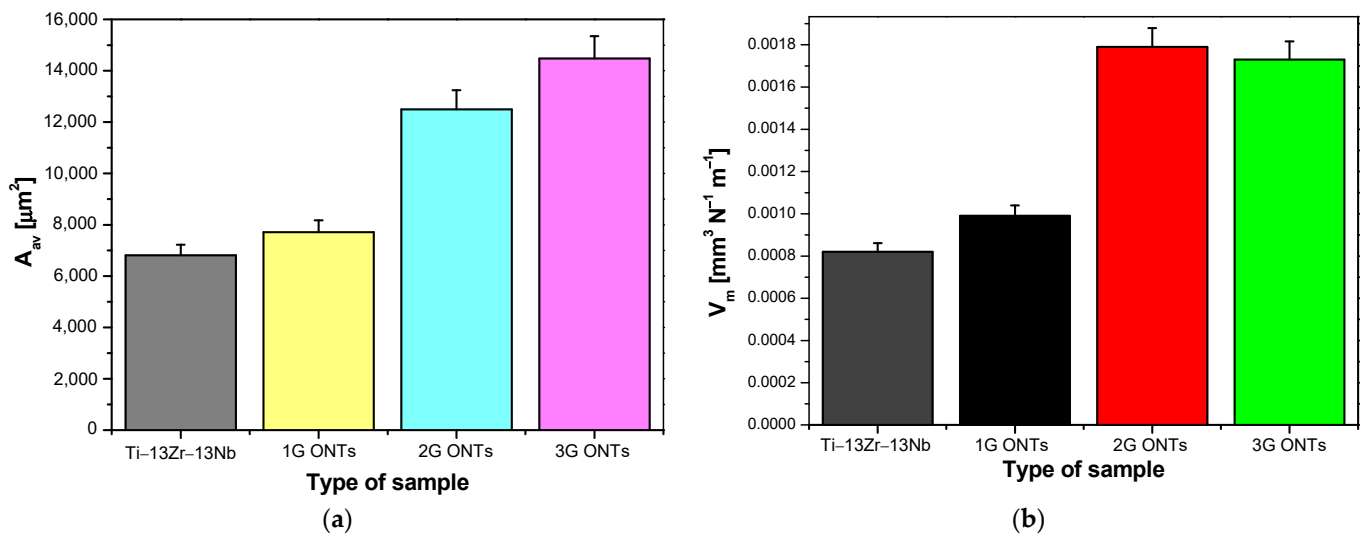
**Figure 6.** Cross-sectional profiles of wear tracks after the biotribological wear test in the ball-on-flat system for the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing: (a) Ti-13Zr-13Nb alloy; (b) 1G ONT layer; (c) 2G ONT layer; (d) 3G ONT layer.



**Figure 7.** Parameters obtained after the biotribological wear test in the ball-on-flat system for the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing: (a) wear track width; (b) wear track depth.

Based on the  $d_{av}$  parameter (Figure 5a), which strongly depends on the type of the tested surface used in the friction node, the average wear surface area ( $A_{av}$ ) was determined after the biotribological test, which took the smallest value equal to  $6814(64) \mu\text{m}^2$  for the Ti-13Zr-13Nb alloy in the initial state (Figure 8a). Along with the increase in the average outer diameter of ONTs and their length, an upward trend of  $A_{av}$  was observed. The  $A_v$  value determined for the non-anodized substrate was more than two times lower than the average wear surface area value for the 2G and 3G ONT layers.





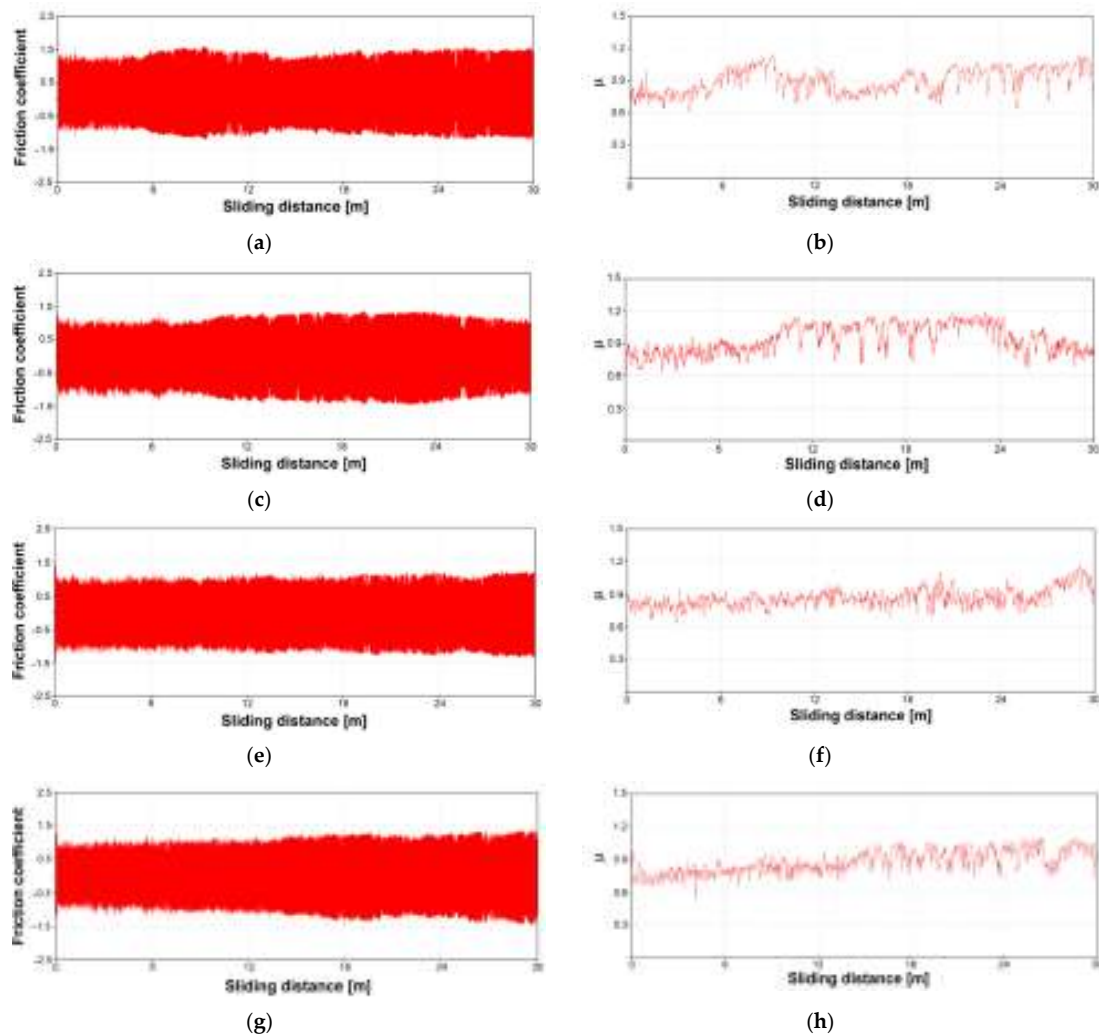
**Figure 8.** Parameters obtained after the tribological wear test in the ball-on-flat system for the Ti–13Zr–13Nb alloy before and after anodizing: (a) average wear surface area ( $A_{av}$ ); (b) average material volume consumption ( $V_m$ ).

Average material volume consumption ( $V_m$ ) took the lowest value of  $8.20(4) \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-1}$  for the electrochemically unoxidized surface of the Ti–13Zr–13Nb alloy (Figure 8b). The obtained  $V_m$  value was twice as high as compared to the average material volume consumption for mechanically polished grade 4 titanium [15], 16 times higher than  $V_m$  for sandblasted grade 4 titanium [15], and 11 times higher than for sandblasted and steam-sterilized grade 4 titanium [16], subjected to biotribological wear test under comparable conditions in protein-free artificial saliva. The obtained results indicate that the value of  $V_m$  increased after the anodizing process of the Ti–13Zr–13Nb alloy in a solution of 0.5% HF, 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 2%  $\text{NH}_4\text{F}$ , and 1M  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$  + 4%  $\text{NH}_4\text{F}$ . The highest value of  $V_m$  equal to  $1.79(9) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-1}$  was observed for the 2G ONT layer, which was very close to the  $V_m$  obtained for the 3G ONT layer within the limit of error (Figure 8b). Such a significant consumption of ONTs resulted from the porous structure of the tested layers. Oxide nanotubes are a kind of hollow tubes that carry load. During the friction process, the thin walls of 2G and 3G ONTs with a lower microhardness compared to that of the alloy substrate and 1G ONTs (Figure 3) break more easily, resulting in higher material consumption.

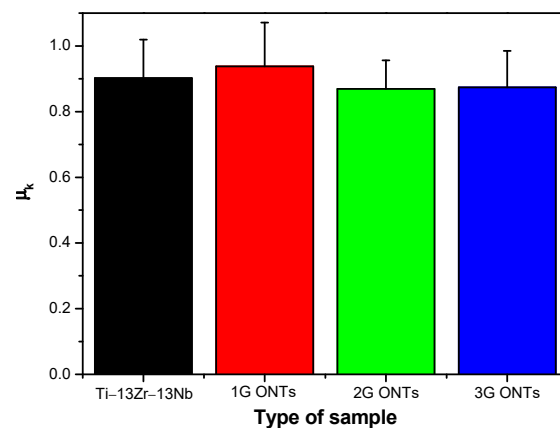
Figure 9 shows the course of the friction coefficient as a function of the sliding distance for the Ti–13Zr–13Nb alloy and its surface after anodizing. In the conducted biotribological tests, the coefficient of friction was a measure of the resistance of the tested materials in the process of friction against the counter-sample penetrating the material under study.

In the graph of the coefficient of friction shown in Figure 9, the initial course of friction was attributed to the initial oxide layer, which was then systematically removed [20]. The initial lower friction coefficient values were mainly due to two factors. Firstly, the wear debris produced in the first stage filled the pores of the outer layer, which increased the contact area between the  $\text{ZrO}_2$  ball and the tested surface. The outermost layer of ONTs was easy to remove and was a carrier of particles that affected friction processes. Secondly, as the porous outer layer was gradually worn away, the counter-sample had increased contact with the denser inner layer. At the end of the friction process, particles formed in the friction process (wear debris) accumulated and the friction coefficient increased. Long nanotubes contributed to the accumulation of a large amount of worn material and thus a higher value of the friction coefficient [21,22]. On the graph of the friction coefficient for 2G ONTs, the smoothest course along the entire length of the sliding distance was visible, showing the easiest wear of the material (Figure 9e,f). Based on the friction coefficient, the kinetic coefficient of friction ( $\mu_k$ ) was determined, which took the smallest value of

0.86(8) for the surface of the Ti-13Zr-13Nb alloy with a 2G ONT layer (Figure 10). A similar value of  $\mu_k$  of 0.86(6) and 0.87(3) was determined for sandblasted [15] and sandblasted and sterilized [16] grade 4 titanium, respectively.

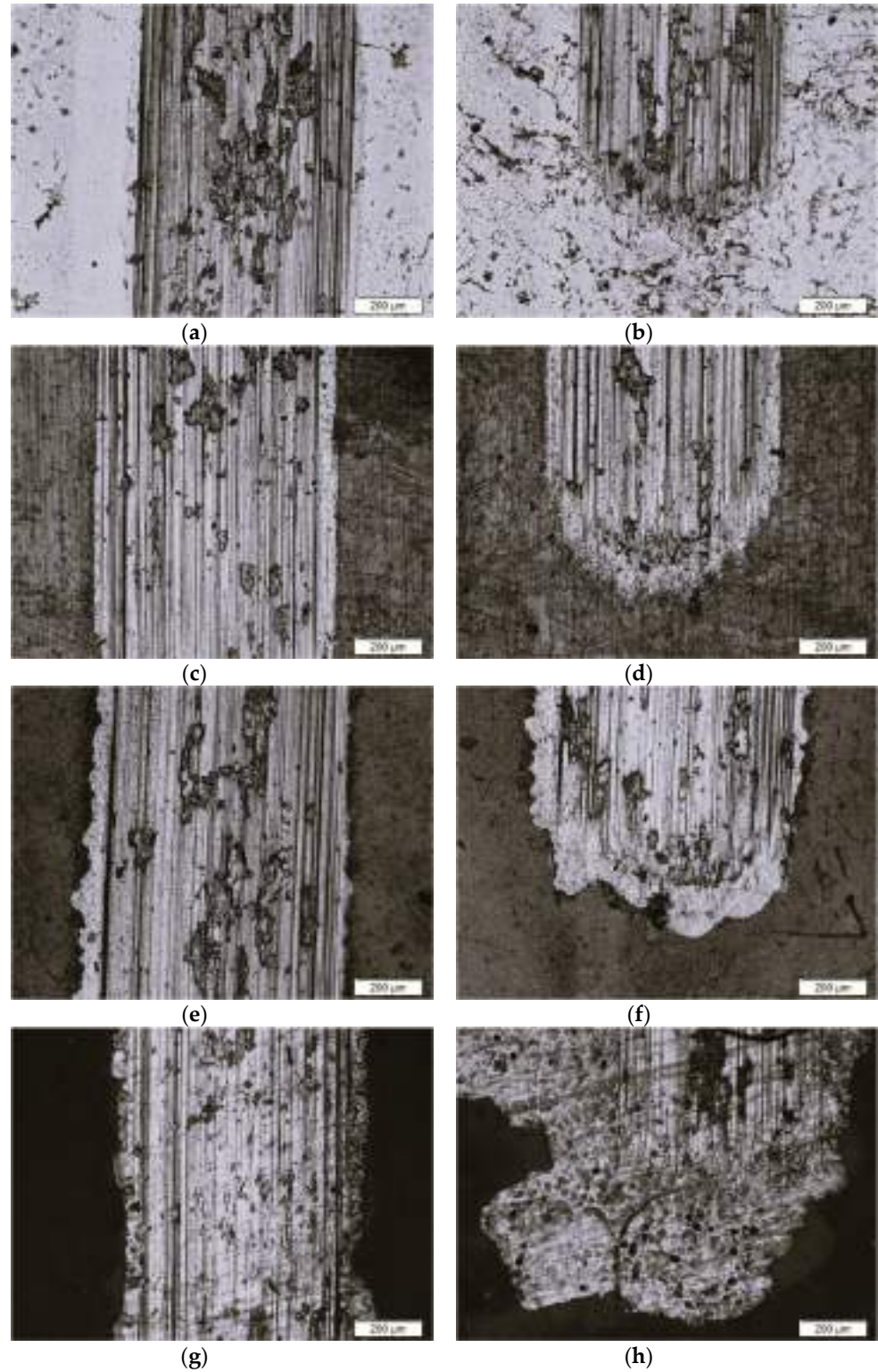


**Figure 9.** Friction coefficient ( $\mu$ ) as a function of the sliding distance in the ball-on-flat system for: (a,b) Ti-13Zr-13Nb alloy; (c,d) 1G ONT layer; (e,f) 2G ONT layer; (g,h) 3G ONT layer.



**Figure 10.** Kinetic coefficient of friction ( $\mu_k$ ) obtained in the tribological wear test using the ball-on-flat system for the Ti-13Zr-13Nb alloy before and after anodizing.

Figure 11 shows exemplary microscopic images of wear tracks of the tested materials after the biotribological test in Ringer's solution performed in the center region of wear tracks (Figure 11a,c,e,g) and in the border of wear tracks and untested surfaces (Figure 11b,d,f,h).

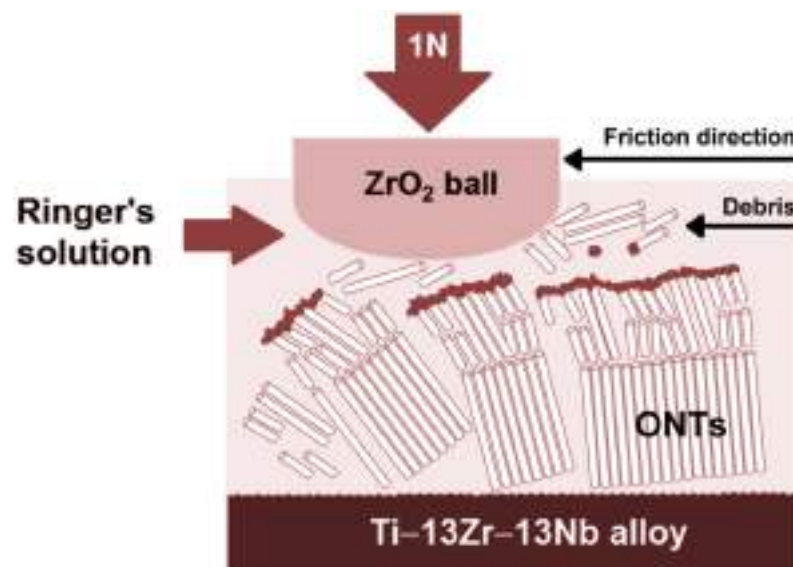


**Figure 11.** Microscopic image of wear track after the biotribological test in the ball-on-flat combination system for: (a,b) Ti-13Zr-13Nb alloy; (c,d) 1G ONT layer; (e,f) 2G ONT layer; (g,h) 3G ONT layer.

Visible scratches and furrows in Figure 11 were the result of the movement of wear products along the working path of the counter-sample. The surface of the Ti–13Zr–13Nb alloy in the initial state had numerous material losses and pits filled with remnants of the abraded material and lubricant in the form of Ringer’s solution (Figure 11a,b). The surface of the 1G ONT layer (Figure 11c,d) and 2G ONT layer (Figure 11e,f) also showed numerous material losses. Accumulations of abraded material were visible in the contact area of the counter-sample with the track of abrasion. The surface with 3G ONTs showed delamination of the oxide layer (Figure 11g,h). In addition, cracks in the 3G ONT layer were caused by cyclic loading during the biotribological test. Transverse cracks visible in the wear track image for the 3G ONT layer indicated additional fatigue wear (Figure 11g,h). The analysis of microscopic wear tracks showed that abrasive wear was the dominant mechanism.

### 3.4. Wear Mechanism of Ti–13Zr–13Nb Alloy before and after Anodizing in Ringer’s Solution

The mechanism of biotribological wear of ONT layers on the Ti–13Zr–13Nb alloy substrate in Ringer’s solution is based on the breaking of oxide nanotubes and their densification in the outer part of the oxide layers according to the wear mechanism of three-body abrasive wear [15,16]. In the proposed mechanism, between the surface of the Ti–13Zr–13Nb alloy with a layer of ONTs (body 1) and the surface of the ZrO<sub>2</sub> ball (body 2), there are particles of worn material (body 3), that act as a carrier abrasive (Figure 12). The wear results from the gradual loss of material in the contact area of the interacting surfaces as body 1 and body 2 move relative to each other.



**Figure 12.** Three-body abrasion wear mechanism of the Ti–13Zr–13Nb alloy before and after anodizing in Ringer’s solution.

Wear debris is mainly formed in the form of single or aggregated ONTs as a result of cracking of the oxide layers in various places, which results in the appearance of ONT fragments of various sizes. It was previously observed in the literature that densification of ONTs is accompanied by wear and cracking [41]. The increase in the indentation depth of ONTs causes cracking of oxide nanotubes and bending and cracking of adjacent ONTs resulting in gradual densification of small fragments of ONT layers [47]. As a consequence of the detachment of the ONT layer from the substrate, the remains of the oxide layer are released in the contact area, which can be pushed out of the contact or trapped in it. As soon as sliding starts, it can be expected that wear debris in the contact area will be exposed to mechanical and electrochemical influences, which may occur sequentially or at the same time, contributing to increased wear of the material. It was reported that as a result of continuous smashing and densification of the wear debris in the central area

of the wear track, a compact oxide layer is formed [41]. The tribolayer obtained in this way may reveal protective properties against corrosion and biotribological wear of the substrate. Simultaneously with the formation of the tribolayer along with the movement of the counter-sample, part of the wear debris is pushed to the ONT layer surrounding the sliding contact area. This is a probable reason for inducing cyclical compressive stresses, which cause damage to the structure of the surface and subsurface parts of the ONT layer by initiation and propagation of cracks leading to delamination. This revealed that the ONT layers were brittle and had poor adhesion to the Ti–13Zr–13Nb alloy substrate. Xu and co-authors [47] suggested that brittle ONT layers bend elastically to a very small strain and consequently collapse. Through the emerging cracks in the ONT layer, the electrolyte can penetrate into the substrate, which induces electrochemical corrosion and additionally affects the detachment of the oxide layer.

The micromechanical and biotribological properties of the porous ONT layers on the Ti–13Zr–13Nb alloy under wet sliding in Ringer's solution strongly depend on the anodizing conditions, among which the composition of the electrolyte containing fluoride ions plays a key role.

#### 4. Conclusions

The assessment of the effect of anodizing conditions on the micromechanical properties of the Ti–13Zr–13Nb alloy shows that Vickers microhardness determined under variable loads changed depending on the type of electrolyte and applied voltage–time parameters of electrochemical oxidation. Vickers microhardness for the non-anodized alloy was independent of the load used and amounts to 302(1). For 1G, 2G, and 3G ONT layers, the dependence of Vickers microhardness on applied load was revealed due to the differences in the morphological parameters and lengths of the ONTs. For the 1G ONT layer, an increase in Vickers microhardness in the range from 433(1) to 340(7) with increasing load was observed, which was related to the smallest outer diameter of ONTs with the shortest nanotube length. Vickers microhardness decreased from 181(5) to 252(6) and from 254(3) to 221(3) with increasing load for 2G and 3G ONT layers, respectively, compared to the alloy substrate.

Based on the biotribological tests carried out in Ringer's solution in a reciprocating motion in the ball-on-flat system for the Ti–13Nb–13Zr alloy before and after anodizing, it was found that the non-anodized alloy was characterized by the highest wear resistance for which the average material volume consumption was  $8.20(4) \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-1}$ . The resistance to abrasive wear decreased for 1G, 2G, and 3G ONT layers, taking the highest value of the average material volume consumption of  $1.79(9) \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-1}$  for the 2G ONT layer. It was ascertained that the lower the coefficient of friction, the greater the volumetric wear, i.e., the lower the resistance to abrasive wear. The kinetic coefficient of friction determined based on the friction coefficient, took the smallest value of 0.86(8) for the 2G ONT layer. The highest coefficient of kinetic friction of 0.94(1) was characterized by the surface of the 1G ONT layer. Based on the results obtained, a three-body abrasion wear mechanism was proposed for biotribological wear of the Ti–13Zr–13Nb alloy before and after anodizing in Ringer's solution.

In this study, the *in vitro* biotribological properties of the tested biomaterials were studied in protein-free simulated body fluid. In order to create studies under wet sliding more similar to *in vivo* conditions, future research will focus on the determination of the wettability of ONT layers and biotribology wear assessment in a simulated body fluid with the addition of proteins.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.Ł.; methodology, B.Ł., J.M., A.S. and T.G.; investigation, A.S., J.M., T.G., P.O. and K.D.; formal analysis, B.Ł., A.S., J.M., T.G., K.D. and P.O.; writing—original draft preparation, B.Ł., A.S., P.O. and J.M.; writing—review and editing, K.D. and T.G; visualization, A.S., J.M., P.O., T.G. and K.D.; funding acquisition, B.Ł. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Ti-Based Biomaterials. *Ti-Based Biomaterials*; MDPI: Basel, Switzerland, 2020.
2. Anene, F.; Jaafar, C.A.; Zainol, I.; Hanim, M.A.; Suraya, M. Biomedical materials: A review of titanium based alloys. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part C J. Mech. Eng. Sci.* **2020**, *235*, 095440622096769. [[CrossRef](#)]
3. *Titanium in Medical and Dental Applications*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018.
4. Chen, Q.; Thouas, G.A. Metallic implant biomaterials. *Mater. Sci. Eng.* **2015**, *87*, 1–57. [[CrossRef](#)]
5. Abdel-Hady Gepreel, M.; Niinomi, M. Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2013**, *20*, 407–415. [[CrossRef](#)]
6. Łosiewicz, B.; Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Stach, S. Effect of autoclaving time on corrosion resistance of sandblasted Ti G4 in artificial saliva. *Materials* **2020**, *13*, 4154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Szklarska, M.; Dercz, G.; Simka, W.; Łosiewicz, B.A.C. impedance study on the interfacial properties of passivated Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution. *Surf. Interface Anal.* **2014**, *46*, 698–701. [[CrossRef](#)]
8. Aniołek, K.; Łosiewicz, B.; Kubisztal, J.; Osak, P.; Stróż, A.; Barylski, A.; Kaptacz, S. Mechanical properties, corrosion resistance and bioactivity of oxide layers formed by isothermal oxidation of Ti–6Al–7Nb alloy. *Coatings* **2021**, *11*, 505. [[CrossRef](#)]
9. Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Ratajczak, P.; Łosiewicz, B. Long-Term Assessment of the In Vitro Corrosion Resistance of Biomimetic ACP Coatings Electrodeposited from an Acetate Bath. *J. Funct. Biomater.* **2021**, *12*, 12. [[CrossRef](#)]
10. Costa, B.C.; Tokuhara, C.; Rocha, L.A.; Oliveira, R.C.; Lisboa-Filho, P.N.; Pessoa, J. Vanadium ionic species from degradation of Ti-6Al-4V metallic implants: In vitro cytotoxicity and speciation evaluation. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *96*, 730–739. [[CrossRef](#)]
11. Ossowska, A.; Zieliński, A.; Supernak, M. Formation of High Corrosion Resistant Nanotubular Layers on Titanium Alloy Ti13Nb13Zr. *Solid State Phenom.* **2011**, *183*, 137–142. [[CrossRef](#)]
12. Smołka, A.; Dercz, G.; Rodak, K.; Łosiewicz, B. Evaluation of corrosion resistance of nanotubular oxide layers on the Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution. *Arch. Metall. Mater.* **2015**, *60*, 2681–2686. [[CrossRef](#)]
13. Ainouche, L.; Hamadou, L.; Kadri, A.; Benbrahim, N.; Bradai, D. Interfacial barrier layer properties of three generations of TiO<sub>2</sub> nanotube arrays. *Electrochim. Acta* **2014**, *133*, 597–609. [[CrossRef](#)]
14. Dudek, K.; Dulski, M.; Łosiewicz, B. Functionalization of the NiTi Shape Memory Alloy Surface by HAp/SiO<sub>2</sub>/Ag Hybrid Coatings Formed on SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> Glass Interlayer. *Materials* **2020**, *13*, 1648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Osak, P.; Maszybrocka, J.; Zubko, M.; Rak, J.; Bogunia, S.; Łosiewicz, B. Influence of Sandblasting Process on Tribological Properties of Titanium Grade 4 in Artificial Saliva for Dentistry Applications. *Materials* **2021**, *14*, 7536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Łosiewicz, B. Effect of amorphous calcium phosphate coatings on tribological properties of titanium grade 4 in protein-free artificial saliva. *Biotribology* **2022**, *32*, 100219. [[CrossRef](#)]
17. Luz, A.R.; de Souza, G.B.; Lepienski, C.M.; Siqueira, C.J.M.; Kuromoto, N.K. Tribological properties of nanotubes grown on Ti-35Nb alloy by anodization. *Thin Solid Films* **2018**, *660*, 529–537. [[CrossRef](#)]
18. Shen, X.-J.; Pei, X.-Q.; Liu, Y.; Fu, S.-Y. Tribological performance of carbon nanotube–graphene oxide hybrid/epoxy composites. *Compos. Part B Eng.* **2014**, *57*, 120–125. [[CrossRef](#)]
19. Sarraf, M.; Zalnezhad, E.; Bushroa, A.R.; Hamouda, A.M.S.; Rafieerad, A.R.; Nasiri-Tabrizi, B. Effect of microstructural evolution on wettability and tribological behavior of TiO<sub>2</sub> nanotubular arrays coated on Ti–6Al–4V. *Ceram. Int.* **2015**, *41*, 7952–7962. [[CrossRef](#)]
20. Dervishi, E.; McBride, M.; Edwards, R.; Gutierrez, M.; Li, N.; Buntyn, R.; Hooks, D.E. Mechanical and tribological properties of anodic Al coatings as a function of anodizing Conditions. *Surf. Coat. Technol.* **2022**, *444*, 128652. [[CrossRef](#)]
21. Li, Z.; Bao, Y.; Wu, L.; Cao, F. Oxidation and tribological properties of anodized Ti45Al8.5Nb alloy. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* **2021**, *31*, 3439–3451. [[CrossRef](#)]
22. Chen, Z.; Ren, X.; Ren, L.; Wang, T.; Qi, X.; Yang, Y. Improving the Tribological Properties of Spark-Anodized Titanium by Magnetron Sputtered Diamond-Like Carbon. *Coatings* **2018**, *8*, 83. [[CrossRef](#)]
23. Zhang, S.; Qin, J.; Yang, C.; Zhang, X.; Liu, R. Effect of Zr addition on the microstructure and tribological property of the anodization of Ti-6Al-4V alloy. *Surf. Coat. Technol.* **2018**, *356*, 38–48. [[CrossRef](#)]
24. Davidson, J.A.; Kovacs, P. New Biocompatible, Low Modulus Titanium Alloy for Medical Implants. U.S. Patent No. 5,169,597, 8 December 1992.
25. Bălțatu, M.S.; Vizureanu, P.; Bălan, T.; Lohan, M.; Țugui, C.A. Preliminary Tests for Ti-Mo-Zr-Ta Alloys as Potential Biomaterials. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2018**, *374*, 012023. [[CrossRef](#)]
26. Baltatu, I.; Sandu, A.V.; Vlad, M.D.; Spataru, M.C.; Vizureanu, P.; Baltatu, M.S. Mechanical Characterization and In Vitro Assay of Biocompatible Titanium Alloys. *Micromachines* **2022**, *13*, 430. [[CrossRef](#)]

27. Lee, M.; Kim, I.-S.; Moon, Y.H.; Yoon, H.S.; Park, C.H.; Lee, T. Kinetics of Capability Aging in Ti-13Nb-13Zr Alloy. *Crystals* **2020**, *10*, 693. [[CrossRef](#)]
28. Stróż, A.; Goryczka, T.; Łosiewicz, B. Electrochemical formation of self-organized nanotubular oxide layers on niobium (Review). *Curr. Nanosci.* **2019**, *15*, 42–48. [[CrossRef](#)]
29. Łosiewicz, B.; Stróż, A.; Osak, P.; Maszybrocka, J.; Gerle, A.; Dudek, K.; Balin, K.; Łukowiec, D.; Gawlikowski, M.; Bogunia, S. Production, Characterization and Application of Oxide Nanotubes on Ti-6Al-7Nb Alloy as a Potential Drug Carrier. *Materials* **2021**, *14*, 6142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Agour, M.; Abdal-hay, A.; Hassan, M.K.; Bartnikowski, M.; Ivanovski, S. Alkali-Treated Titanium Coated with a Polyurethane, Magnesium and Hydroxyapatite Composite for Bone Tissue Engineering. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1129. [[CrossRef](#)]
31. Stróż, A.; Łosiewicz, B.; Zubko, M.; Chmiela, B.; Balin, K.; Dercz, G.; Gawlikowski, M.; Goryczka, T. Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications. *Mater. Charact.* **2017**, *132*, 363–372. [[CrossRef](#)]
32. Stróż, A.; Dercz, G.; Chmiela, B.; Łosiewicz, B. Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy with potential use as bone implant. *AIP Conf. Proc.* **2019**, *2083*, 030004. [[CrossRef](#)]
33. Smołka, A.; Rodak, K.; Dercz, G.; Dudek, K.; Łosiewicz, B. Electrochemical Formation of Self-Organized Nanotubular Oxide Layers on Ti13Zr13Nb Alloy for Biomedical Applications. *Acta Phys. Pol.* **2014**, *125*, 932–935. [[CrossRef](#)]
34. Stróż, A.; Dercz, G.; Chmiela, B.; Stróż, D.; Łosiewicz, B. Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for biomedical applications. *Acta Phys. Pol.* **2016**, *130*, 1079–1080. [[CrossRef](#)]
35. Łosiewicz, B.; Skwarek, S.; Stróż, A.; Osak, P.; Dudek, K.; Kubisztal, J.; Maszybrocka, J. Production and Characterization of the Third-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Alloy. *Materials* **2022**, *15*, 2321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Durdu, S.; Cihan, G.; Yalcin, E.; Altinkok, A. Characterization and mechanical properties of TiO<sub>2</sub> nanotubes formed on titanium by anodic oxidation. *Ceram. Int.* **2021**, *47*, 10972–10979. [[CrossRef](#)]
37. Ossowska, A.; Olive, J.-M.; Zielinski, A.; Wojtowicz, A. Effect of double thermal and electrochemical oxidation on titanium alloys for medical applications. *Appl. Surf. Sci.* **2021**, *563*, 150340. [[CrossRef](#)]
38. Ossowska, A.; Zieliński, A.; Olive, J.-M.; Wojtowicz, A.; Szweđa, P. Influence of Two-Stage Anodization on Properties of the Oxide Coatings on the Ti-13Nb-13Zr Alloy. *Coatings* **2020**, *10*, 707. [[CrossRef](#)]
39. Handzlik, P.; Gutkowski, K. Synthesis of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy by the electrochemical method. *J. Porous Mater.* **2019**, *26*, 1631–1637. [[CrossRef](#)]
40. Stępień, M.; Handzlik, P.; Fitzner, K. Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on Ti6Al7Nb alloy and their interaction with the simulated body fluid. *J. Solid State Electrochem.* **2016**, *20*, 2651–2661. [[CrossRef](#)]
41. Schneider, S.G.; Nunes, C.A.; Rogero, S.P.; Higa, O.Z.; Bressiani, J.C. Mechanical properties and cytotoxic evaluation of the Ti-13Nb-13Zr alloy. *Biomecánica* **2000**, *8*, 84–87. [[CrossRef](#)]
42. Lee, T. Variation in Mechanical Properties of Ti-13Nb-13Zr Depending on Annealing Temperature. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 7896. [[CrossRef](#)]
43. Wu, S.; Wang, S.; Liu, W.; Yu, X.; Wang, G.; Chang, Z.; Wen, D. Microstructure and properties of TiO<sub>2</sub> nanotube coatings on bone plate surface fabrication by anodic oxidation. *Surf. Coat. Technol.* **2019**, *374*, 362–373. [[CrossRef](#)]
44. ASTM F1713-08(2021)e1; Standard Specification for Wrought Titanium-13Niobium-13Zirconium Alloy for Surgical Implant Applications (UNS R58130). ASTM: West Conshohocken, PA, USA, 2021.
45. ISO 6507-1:2018; Metallic Materials—Vickers Hardness Test—Part 1: Test Method. ISO: Geneva, Switzerland, 2018.
46. ISO 6507-2:2018; Metallic Materials—Vickers Hardness Test—Part 2: Verification and Calibration of Testing Machines. ISO: Geneva, Switzerland, 2018.
47. Xu, Y.N.; Liu, M.N.; Wang, M.C.; Oloyede, A.; Bell, J.M.; Yan, C. Nanoindentation study of the mechanical behavior of TiO<sub>2</sub> nanotube arrays. *J. Appl. Phys.* **2015**, *118*, 145301. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

1 Article

# 2 Biological Activity and Thrombogenic Properties of Oxide 3 Nanotubes on the Ti-13Nb-13Zr Biomedical Alloy

4 Agnieszka Stróż<sup>1</sup>, Maciej Gawlikowski<sup>2,3</sup>, Katarzyna Balin<sup>4</sup>, Patrycja Osak<sup>1</sup>, Julian Kubisztal<sup>1</sup>, Maciej Zubko<sup>5</sup>,  
5 Joanna Maszybrocka<sup>1</sup>, Karolina Dudek<sup>6</sup> and Bożena Łosiewicz<sup>1,\*</sup>

6 <sup>1</sup> University of Silesia in Katowice, Faculty of Science and Technology, Institute of Materials Engineering, 75  
7 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland; agnieszka.stroz@us.edu.pl (A.S.); patrycja.osak@us.edu.pl  
8 (P.O.); julian.kubisztal@us.edu.pl (J.K.); maciej.zubko@us.edu.pl (M.Z.); joanna.maszybrocka@us.edu.pl  
9 (J.M.)

10 <sup>2</sup> Silesian University of Technology, Faculty of Biomedical Engineering, 40 Roosevelt, 41-800 Zabrze, Poland;  
11 maciej.gawlikowski@polsl.pl (M.G.)

12 <sup>3</sup> Foundation of Cardiac Surgery Development, Artificial Heart Lab., 345a Wolności, 41-800 Zabrze, Poland

13 <sup>4</sup> University of Silesia in Katowice, Faculty of Science and Technology, August Chełkowski Institute of Phys-  
14 ics, 75 Pułku Piechoty 1A, 41-500 Chorzów, Poland; katarzyn.balin@us.edu.pl (K.B.)

15 <sup>5</sup> University of Hradec Králové, Faculty of Science, Department of Physics, Rokitského 62, 500 03 Hradec  
16 Králové, Czech Republic

17 <sup>6</sup> Refractory Materials Center, Institute of Ceramics and Building Materials, Łukasiewicz Research Network,  
18 Toszecka 99, 44-100 Gliwice, Poland; karolina.dudek@icimb.lukasiewicz.gov.pl (K.D.)

19 \* Correspondence: bozena.losiewicz@us.edu.pl; Tel.: +48 32 3497527 (B.Ł.)

21 **Abstract:** The success of implant treatment is dependent on the osseointegration of the implant.  
22 The main goal of this work was to improve the biofunctionality of the Ti-13Nb-13Zr implant alloy  
23 by the production of oxide nanotubes (ONTs) layers for better anchoring in the bone and use as an  
24 intelligent carrier in drug delivery systems. Anodization of the Ti-13Nb-13Zr alloy was carried out  
25 in 0.5% HF, 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 2% NH<sub>4</sub>F, and 1 M ethylene glycol + 4 wt.% NH<sub>4</sub>F electrolytes. Phys-  
26 icochemical characteristics of ONTs was performed by high resolution electron microscopy  
27 (HREM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and Scanning Kelvin Probe (SKP). Water contact  
28 angle studies were conducted using sitting air drop method. In vitro biological properties and re-  
29 lease kinetics of ibuprofen were investigated. The results of TEM and XPS studies confirmed the  
30 formation of the single-walled ONTs of three generations on the bi-phase ( $\alpha + \beta$ ) Ti-13Nb-13Zr al-  
31 loy. The ONTs were composed of oxides of the alloying elements. The proposed surface modifica-  
32 tion method ensured good hemolytic properties, no cytotoxicity for L-929 mouse cells, good adhe-  
33 sion, increased surface wettability and improved athrombogenic properties of the Ti-13Nb-13Zr  
34 alloy. Nanotubular surfaces allowed ibuprofen to be released from the polymer matrix according  
35 to the Gallagher-Corrigan model.

Citation: To be added by editorial  
staff during production.

Academic Editor: Firstname  
Lastname

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors  
Submitted for possible open access  
publication under the terms and  
conditions of the Creative Commons  
Attribution (CC BY) license  
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

36 **Keywords:** anodization, biological activity, biomaterials, drug delivery system, oxide nanotubes,  
37 Ti-13Nb-13Zr alloy, athrombogenicity

## 39 1. Introduction

40 Each implant introduced into a living organism is initially treated as a foreign body  
and causes a defensive reaction of the immune system in the form of allergy or inflam-  
41 mation. The material that is to be used to produce a biomedical implant should have  
42 many features that will prove high biocompatibility, called biotolerance. It should show  
43 very good corrosion resistance and no adverse impact of degradation on the surrounding  
44 body cells. Ensuring high biocompatibility has become the reason for a far-reaching  
45 reduction of the content of harmful elements in metallic biomaterials [1–7]. The literature



discusses in detail the influence of the excess of some biocompatible elements in the human body on human organs and tissues, such as DNA damage and mutations, carcinogenicity and metal sensitivity [8].

Currently, the most common titanium alloys for biomedical applications include the Ti-13Nb-13Zr alloy [9–14]. The superiority of the willingness to use Ti-13Nb-13Zr alloy includes the fact that there is less release of metal ions during the spontaneous passivation of Ti-13Nb-13Zr because the corrosion products of the smaller alloy elements Nb and Zr are less soluble than Al and V. In addition, the native oxide layer on the alloy surface reveals higher resistance to corrosion and provides better protection for the underlying alloy [4,13–17]. The combination of the three most biocompatible elements, i.e. titanium, niobium and zirconium that do not show toxic or carcinogenic reactions with tissue and cells, allowed this alloy to be classified as the most promising material for bone implants [8,18].

Titanium and its alloys are used as implants for the osteosynthesis of the limbs and the skull and face, dental implants, some elements for contact joints, implants for cardiac surgery, implants for laryngology, elements for reconstruction, knee and hip endoprosthesis and bone implants. Implants are artificial bodies implanted to the body to recreate the natural function or aesthetics of the damaged organ. Implants replacing hard tissues are most commonly used [1,2,7,8]. The success of implant treatment is mainly dependent on the osseointegration of the implant [2,19–21]. It is clinically confirmed by the lack of mobility of the implant and no signs of inflammation. The process of structural and functional connection between the tissue and the implant is influenced by many factors, like the technique of inserting the implant, its stabilization, bone quality, physical properties of the bioimplant, its shape and surface [2,5,22,23]. The first condition necessary for the correct course of the osseointegration process is to ensure the primary stabilization of the implant. The stabilization is influenced by the surface structure, bone density at the site of implementation, and the shape and size of the biomaterial. It has been proven that the denser the bone in which the implant is implanted then the better the primary stabilization. The surface of the bone and implant materials play an important role in osteoblast adhesion and bone growth. Many factors affect the quality of the connection between bone and implant, including the chemical composition as well as the morphology of the implant surface [2,24]. Appropriate development of the implant surface seems to be an important factor for determining the level of interaction between tissues and biomaterials, therefore the modification methods used are aimed at obtaining the appropriate surface roughness, both at the micro- and nano-scale. In vivo studies demonstrate smooth predisposing surfaces for the fibrous tissue formation, and rough surfaces at a microscale more favorable bone formation. The rough surface, due to the presence of micro-latches, affects better anchoring, but also the distribution of pressure on the surrounding environment between the implant and human tissue. Moreover, the mentioned implants, compared to those with a smooth surface, show better contact with the bone, provide greater mechanical support and result in faster integration of osseointegration compared to implants with a smooth surface [2,25,26].

Nano-engineered surfaces have the unique ability to directly interact with cells on the overall biological response of implanted biomaterial. Therefore, various nanotechnology based techniques have been developed to produce nano-scale surfaces on existing biocompatible implant materials. Porous nano-structured titanium alloy oxide layers in the form of nanotubes make them more suitable surgical materials for implantation. Based on numerous studies, it has been proven that implants covered with a layer of oxide nanostructures have the ability to exhibit antibody properties, and thus inhibit microbial infections. Titanium nanotube materials furthermore can provide drug delivery system continuous of the pharmacological agent to the specific place in the body where it is needed, ensuring adequate treatment over a longer period of time [4,27–31].

Anodizing is one of the techniques for modifying the surface of titanium and titanium-based biomaterials [32–37]. Electrochemical oxidation of biomedical Ti-13Nb-13Zr

alloy in aqueous solutions containing fluoride ions allows to obtain an anodic nanotubes layer protecting against corrosion and the passage of metal ions, as well as improves the bioactivity of the implant [13,32,33]. The electrolyte selection for electrochemical oxidation allows to assign the obtained layers of nanotubes to one of several generations [13,34–37].

Due to our interest in the modification of the surface of the newest group of titanium alloys, this research was undertaken to study the effect of anodizing conditions on various biological properties of three generations of oxide nanotubes (ONTs) obtained on the Ti-13Nb-13Zr alloy surface. The aim of the research was to produce first generation (1G), second generation (2G) and third generation (3G) ONTs and investigate their influence on biological properties such as cytotoxicity and adhesion, thrombogenic, hemocompatibility, wettability and how they act as drug delivery system.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Preparation of Research Material

The investigated disc-shape samples of the Ti-13Nb-13Zr (wt.%) alloy were prepared by cutting the rod with a diameter of 0.9 mm. Samples after grinding with abrasive paper with a gradation of 1200 and 2500# were polished using the OP-S suspension, and next washed in an ultrasonic washer in ultrapure water (Milli-Q, 18.2 M $\Omega$  cm<sup>2</sup>) for 20 minutes. Electrochemical production of 1G ONTs was carried out at room temperature at the voltage 20 V for 2 hours in 0.5 % HF solution. 2G ONTs were obtained at room temperature in 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution with 2 wt.% of NH<sub>4</sub>F addition at the voltage 20 V for 120 min. 3G ONTs were produced at room temperature in 1M C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> solution with 4 wt.% content of NH<sub>4</sub>F. The time of anodizing was 80 minutes at the voltage of 50 V. Hydrofluoric acid (48 % HF), ammonium sulfate ( $\geq$  98.5 % trace metals basis), ethylene glycol (anhydrous, 99.8 %), and ammonium fluoride ( $\geq$  99.99 % trace metals basis) were used (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Poland). Anodizing was conducted using a Kikusui PWR800H Regulated DC Power Supply (Kikusui Electronics Corporation, Yokohama, Japan).

### 2.2. Material Characterization

The structure of formed ONTs layers were examined using by high resolution electron microscopy (HREM) technique using a JEOL JEM-3010 Transmission Electron Microscope (TEM, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) operating at 30 kV equipped with 2k $\times$ 2k Orius TM 833 SC200D Gatan CCD camera. To produce TEM samples the anodized alloy under investigation was suspended in isopropanol and sonicated for 60 minutes in an ultrasonic bath. The resulting liquid was dropped on standardized Cu grid with an amorphous carbon film and after evaporation under normal condition samples were studied using TEM. The bright field images were recorded. Chemical states of the Ti-13Nb-13Zr alloy surface in the initial state and after anodizing were studied using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) by means of a Prevac photoelectron spectrometer with a VG SCIENTA R3000 hemispherical analyzer (Pleasanton, CA, USA). Monochromatic X-rays characterised by energy of 1486.74 eV and power of 400 W, were applied.

### 2.3. Scanning Kelvin Probe Measurements

Contact potential difference (CPD) maps of the Ti-13Nb-13Zr alloy surface covered with ONTs layers were registered using SEW-PAR Model 370 device (Princeton Applied Research, Oak Ridge, USA). A tungsten Kelvin probe was used (KP,  $\phi$ 150  $\mu$ m, Princeton Applied Research, Oak Ridge, USA). The surface area of 1  $\times$  1 mm<sup>2</sup> was scanned. The sample was placed in a distance ca. 80  $\mu$ m from the micro-probe. Statistical analysis of the CPD maps allowed to determine histograms as well as the height and spatial parameters that quantitatively characterized CPD magnitudes and their distribution on the surface of tested material. The arithmetic average (CPD<sub>av</sub>), the root mean square devia-

tion ( $CPD_{rms}$ ), the skewness ( $CPD_{sk}$ ), the excess kurtosis ( $CPD_{ku}$ ) and the autocorrelation length ( $CPD_{al}$ ) parameters were determined.

#### 2.4. Wettability Measurements

Water contact angle measurements were carried out using an OCA 15EC goniometer (Future Digital Scientific Corp., Westbury, NY, USA) with an accuracy of  $\pm 0.01^\circ$  by the sitting airdrop method. 10 images of water drops with a volume of about  $5 \mu\text{l}$  placed on the tested surface were recorded within 10 s. On the basis of the received images, the mean values of the contact angle ( $\Theta$ ) were determined. The average of five measurements conducted in different parts of the tested surface was taken as the final values of the  $\Theta$ .

#### 2.5. In Vitro Hemocompatibility Test

Hemocompatibility of the ONTs layers on the Ti-13Nb-13Zr alloy substrate was investigated in accordance with the ASTM F756-17 [38]. Healthy human volunteers were donors of blood. Based on the International Committee for Standardization in Hematology (ICSH) the hemoglobin (Hb) calibration curve meeting the requirements was prepared. Phosphate buffered saline (PBS) was used for preparation of dilutions to the Hb concentration of  $10(1) \text{ g l}^{-1}$ . Specimens with the determined surface area were applied at a ratio of  $3 \text{ cm}^2$  surface area to 1 ml of test blood solution. In case of samples with produced ONTs layers,  $0.57(02) \text{ ml}$  human blood was applied. Exposition of the final samples in human blood lasted for 4 hours at  $37(1)^\circ\text{C}$ . After incubation for 4 hours, the fluid was transferred to the test-tubes and centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes in a standard clinical centrifuge. The supernatant was removed, being careful not to disturb any button of erythrocytes in the test-tube. Then, the solution absorbance was investigated using a spectrophotometer at a wavelength of 540 nm. Calculation of % hemolysis was based on the following Formula (1):

$$\% \text{ hemolysis} = \frac{\text{concentration of hemoglobin released in supernatant} \cdot 100\%}{\text{total hemoglobin concentration in tube}}. \quad (1)$$

#### 2.6. Cell Culture and Cytotoxicity Assays

Cytotoxicity tests were performed in accordance with the ISO 10993-5:2009 [39]. Mammalian cell culture monolayer consisting of L-929 mouse Fibroblast cells (Sigma, L929, Lot: 10i019) was used. An extraction of the test material was performed by incubating the material with MEM supplemented with 10% FBS, Penicillin/Streptomycin and GlutaMAX at  $37(1)^\circ\text{C}$  (humidified) in 5(1)%  $\text{CO}_2$  for 24(2) hours. Quadruplicate monolayers of L-929 mouse fibroblast (passage no.: 15) cells were dose with 1x, 2x, 3x and 4x dilutions of the extract and incubated at  $37(1)^\circ\text{C}$  in the presence of 5(1) %  $\text{CO}_2$  for 24(1) hours. Following the incubation,  $50 \mu\text{l}$  of the MTT solution, prepared just before use, were dispensed in each well and incubated for 120(15) minutes at  $37(1)^\circ\text{C}$  (humidified) in 5(1) %  $\text{CO}_2$ . Following the incubation, MTT solution was replaced with  $100 \mu\text{l}$  isopropanol and incubated for 10 min in  $37(1)^\circ\text{C}$  (humidified) in presence of 5(1) %  $\text{CO}_2$ . The percent viability for the test article and control article were determined from the blanks. Reduction of the number of living cells caused a decrease in the metabolic activity in the sample. That decrease was directly connected with the amount of blue-violet formazan, whose presence was confirmed by the optical density at 570 nm with differential filter of 650 nm.

Negative Control was HDPE (Granulat G. Motloch, LOT: C7260) extract with MEM supplemented with 10 % FBS, Penicillin/Streptomycin and GlutaMAX. Positive Control was MEM supplemented with 10 % FBS, Penicillin/Streptomycin, GlutaMAX and 30 % DMSO. Blank Control was MEM supplemented with 10 % FBS, Penicillin/Streptomycin and GlutaMAX.

#### 2.7. Qualitative In Vitro Cell Adhesion Assay

Duplicated test articles, with the indicated side up, were placed individually in a well of a 6-well plate. The L929 mouse Fibroblast cells (Sigma, L929, Lot: 10i019, passage no.:8) were harvested using trypsin and counted. To each well, 80,000 cells were added with enough MEM (supplemented with 10% FBS, Penicillin/Streptomycin and GlutaMAX) to cover the discs. The plates were incubated at 37(1) °C (humidified) in 5(1) % CO<sub>2</sub> for 24(2) hours. After the incubation period, the cells were fixed in 10% PFA for 15 minutes followed by the Hematoxylin and Eosin staining. PFA was replaced with the Hematoxylin and incubated at room temperature for 5 minutes. Each well was washed 3 times with tap water. Then, Eosin was added, and plates were incubated for 5 minutes at room temperature, followed by 3 washes with tap water. The stained cells were visualized using Delta Optical stereomicroscope SZ-630T. The photos were captured using ScopeImage 9 software and HDCE-X5 camera.

## 2.8. Thrombogenicity Test

### 2.8.1. Blood Donation and Platelet-Rich Plasma Preparation

Blood was collected for the anticoagulant CPDA-1 from healthy human volunteers, after making sure that they did not take any anticoagulants, including acetylsalicylic acid, clopidogrel or warfarin/acenocumarol over 14 days. Storing the collected blood lasted up to 24 hours at 2-7 °C. Blood count (hematology automaton BC 2800 VET, Mindray, China), platelets aggregation under the adenosine diphosphate (ADP) and arachidonic acid (impedance aggregometer Multiplate, Roche, Switzerland, with ADPtest and ASPItest tests) and concentration of plasma-free hemoglobin fHB (spectrophotometer Plasma/Low Hb, Hemocue AB, Sweden), were controlled before starting further measurements. Blood was qualified for further tests, provided that the blood count was normal, the platelet count was higher than  $120 \cdot 10^3 \text{ l } \mu\text{l}^{-1}$ , the ADP test result was above 122 AUC, the ASPItest result was higher than 136 AUC, and the fHB below  $0.2 \text{ g dl}^{-1}$ . Platelet-rich plasma (PRP) [40] was prepared directly before the tests by a centrifugation whole blood at 100 G for 10 minutes at room temperature. Plasma morphology was investigated before the use PRP in the test. Examined samples were put into polypropylene test-tubes with a flat bottom of Falcon type with a volume of 50 ml and a diameter of 30 mm. Each sample was put into a separate test-tube so that the sample area, which was not subjected to final processing and polishing, was at the bottom. Test-tubes were filled with 10 ml of PRP, and the studied samples were incubated with PRP for 60 minutes at the temperature of 37(1) °C. The test-tubes used for the incubation, were placed on the hematology cradle at deflection  $\pm 5^\circ$  and frequency 10 cycles/minute, ensuring even coverage of the samples with platelets and their aggregates. Before the incubation end, the examined samples were withdrawn from the test-tubes and carefully washed with PBS, and next fixed in 4% buffered formalin. The material prepared in such a way was then the subject of imaging tests.

### 2.8.2. Qualitative Thrombogenicity Scale

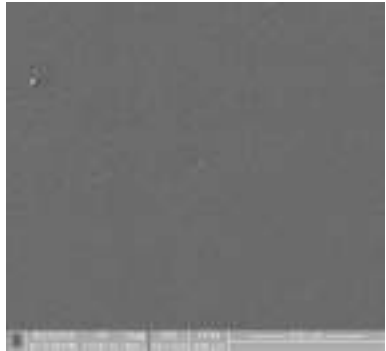
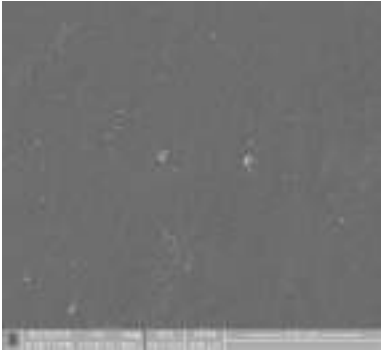
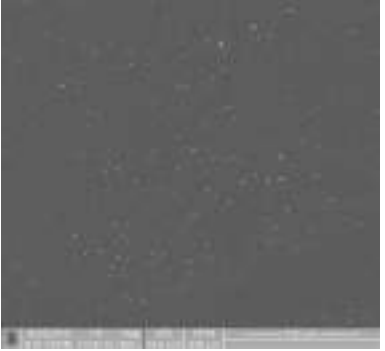
The analysis of thrombogenicity test was carried out on 39 specimens including 12 specimens of the 1G ONTs, 9 specimens of the 2G ONTs, 9 specimens of the 3G ONTs, and 9 specimens of the non-anodized Ti-13Nb-13Zr alloy. Neither literature data nor standards (e.g. ISO 10993-5:2009 [39]) give quantitative method of measurement thrombogenicity of biomaterials. Therefore in the studies described in this paper a qualitative method was used. In order to make the measurement more reliable the assessment was done by two experts who used a six-level ordinal scale (Table 1) [41]. As the experts a biologist with 25 years of experience in cell testing and a bioengineer with 20 years of experience in thrombogenicity and medical statistics were chosen.

The class 0 constituted negative control. As a reference material polyurethane based on polyesters Bionate 55D (DSM Biomedical Inc. Nederland) was chosen. This material is used in medical devices devoted for long-term contact with blood. The material samples were prepared in form of disks of 8 mm diameter and 0.8 mm thickness by high-pressure

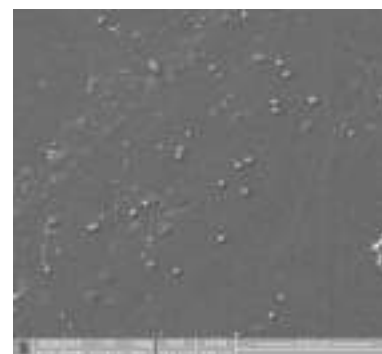
injection. The surface roughness described by an arithmetic mean deviation of the roughness profile was  $Ra=0.16$ .

The class 5 constituted positive control. As a reference material here there were chosen glass disks covered by collagen (Neuvitro Corporation, Germany). Collagen is a natural fibrous protein that exists in extracellular matrix and has strong ability to activate platelets.

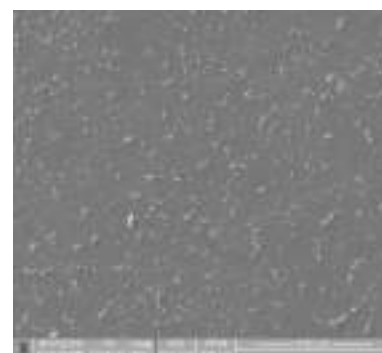
**Table 1.** Ordinal thrombogenicity scale together with description and exemplary images of surface of the sample belonging to a given class [41].

Class	Description	Example
0	contains samples characterized by minimal thrombogenicity: separated, platelets of low diverse level, no platelet aggregates	
1	contains samples characterized by very low degree-thrombogenicity: a dozen or so adhered blood platelets not creating aggregates	
2	contains samples characterized by very low degree-thrombogenicity: several dozen of visible platelets which can be present as single, separated aggregates with a small area	

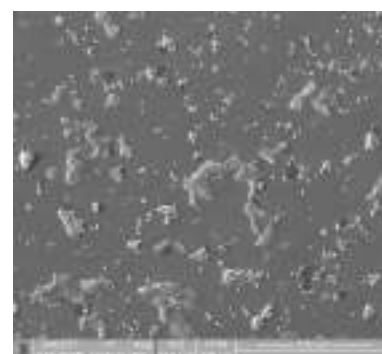
- 3 contains samples characterized by average degree-thrombogenicity: biological material mainly comprise aggregates larger than individual blood platelets



- 4 contains samples characterized by high-degree thrombogenicity: sample is covered with highly differentiated biological material and the individual objects are connected with each other without possibility to separate them



- 5 contains samples characterized by very high degree-thrombogenicity: platelets are highly differentiated and form numerous aggregates, which are connected with each other, without possibility to separate and count objects



264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281

### 2.8.3. Statistical Analysis Methods

Both experts evaluated the same material in six-level ordinal scale. In order to study the degree of compliance of the two experts the alpha – Krippendorf coefficient was used. The coefficient has values from 0 to 1. It is agreed that if it's value is  $>0.80$ , the compliance of assessments is very good. The Kruskal – Wallis test was used for that data analysis because the number of classes was higher than 2, variable describing thrombogenicity was on ordinal scale and the experimental model was independent. The Kruskal – Wallis test is nonparametric equivalent of variance analysis. Multiple comparison test was applied for post-hoc analysis.

### 2.9. Drug Delivery System

The Ti-13Nb-13Zr samples with ONTs layers were subjected to surface functionalization heparine-dopamine (Hep-DOPA) conjugate by mixing  $40 \text{ mg ml}^{-1}$  heparin,  $19.06 \text{ mg ml}^{-1}$  EDAC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, hydrochloride) and  $11.5 \text{ mg ml}^{-1}$  NHS (N-Hydroxysuccinimide) and reacted with 10 ml of MES buffer pH=4.5 for 10 min (solution 1). Then  $102.2 \text{ mg ml}^{-1}$  dopamine was mixed with 1 ml MES buffer pH=4.5 (solution 2). Solution 1 and solution 2 were mixed and reacted for 12 hours in the

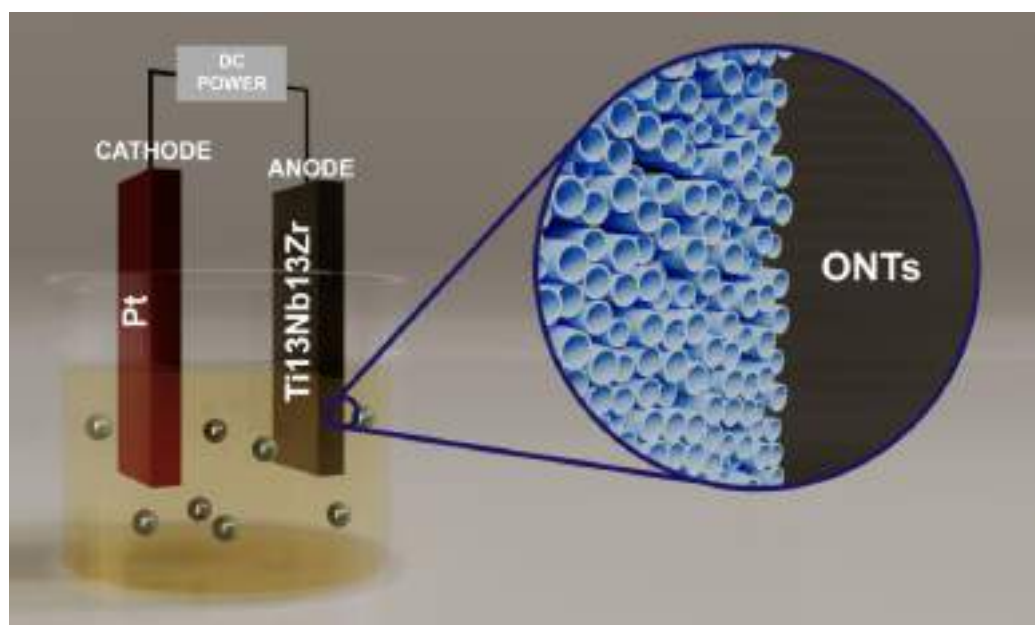
282 dark. The Ti-13Nb-13Zr alloy with ONTs layers was placed into the mixture prepared for  
283 12 hours. The material obtained in this way was dried, then ibuprofen was immobilized  
284 on the surface of the heparinized melt by adding  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  of ibuprofen to 10 ml of  
285 Tris-HCl at pH=8. The reaction was conducted for 24 hours at room temperature with  
286 gentle shaking. The release kinetics of ibuprofen from the nanotubular layer was investi-  
287 gated by immersing the sample in 15 ml PBS with pH=7.45 at 37(1) °C for 24 hours. The  
288 kinetics of the released drug was studied for 60 minutes, taking the solution for analysis  
289 every 10 minutes. Each time 1 ml of the solution was withdrawn by adding fresh solution.  
290 Using UV-VIS spectroscopy, the amount of substance released from the nanotubular ox-  
291 ide layer was determined. The absorbance value was measured at the wavelength  $\lambda = 257$   
292 nm, determining the absorbance value of the PBS in the first step, and then the absorbed  
293 solution. Based on the following Formula (2), the percentage amount of released drug was  
294 calculated:

$$\% \text{ drug release} = \frac{\text{actualabsorbance} - \text{absorbance}0\text{h}}{\text{actualabsorbance}} . \quad (2)$$

### 295 3. Results and Discussion

#### 296 3.1. FE-SEM and TEM Characterization

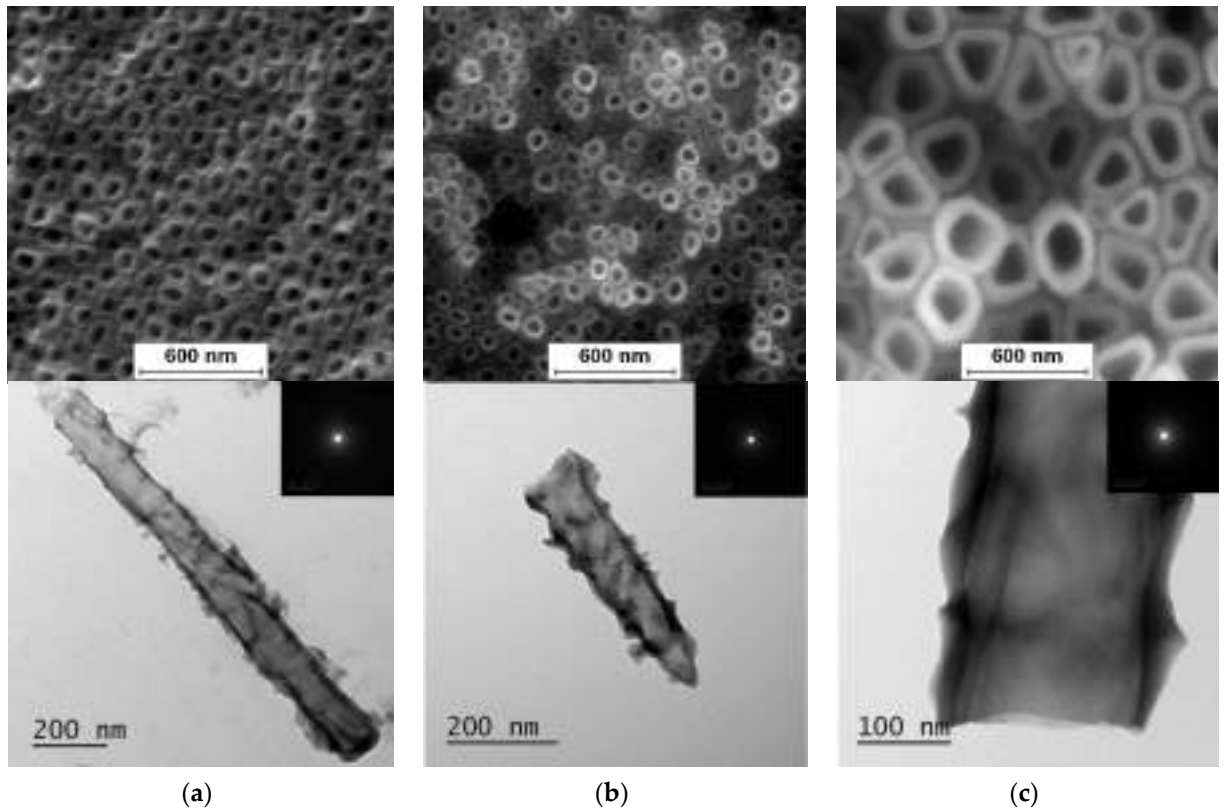
297 The selected Ti-13Nb-13Zr alloy to obtain 1G, 2G and 3G ONTs layers is a new type  
298 of vital titanium alloys. The addition of Nb and Zr in the amount of 13 wt.% provides  
299 appropriate properties for application in regenerative medicine. Additionally, it ensures  
300 better biocompatibility and higher corrosion resistance compared to titanium [11–14].  
301 Anodization of the Ti-13Nb-13Zr alloy was conducted using the anode made of the tested  
302 sample, and the Pt cathode in a distance of 25 mm in a face-to-face position (Figure 1).  
303



304  
305 **Figure 1.** Scheme of the set-up for anodizing the Ti-13Nb-13Zr alloy in aqueous solution with fluo-  
306 ride ions.  
307

308 The obtained FE-SEM images of surface morphology for 1G, 2G and 3G ONTs layers  
309 on the Ti-13Nb-13Zr substrate with corresponding TEM images are presented in Figure 2.  
310 From the observed regions selected area electron diffraction (SAED) patterns were rec-  
311 orded. SAED patterns (see insight in the Figure 2) clearly indicate that all layers of 1G, 2G  
312 and 3G ONTs exhibit amorphous structure. From selected areas of the FE-SEM images of

three generations of ONTs layers obtained via anodization, the morphological parameters of the nanotubes were determined and summed up in Table 2.



**Figure 2.** FE-SEM and corresponding below TEM images of the oxide nanotubes obtained on the Ti-13Nb-13Zr alloy: (a) 1G ONTs produced in 0.5 % HF solution [10]; (b) 2G ONTs produced in 1M  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  + 2 %  $\text{NH}_4\text{F}$  solution; (c) 3G ONTs produced in 1M  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$  + 4 %  $\text{NH}_4\text{F}$  solution [13].

Based on the results shown in Table 2, it can be seen that each generation of ONTs is characterized by different morphological parameters. For 1G ONTs, the smallest diameter of the nanotubes are obtained. In case of 2G ONTs, an increase of 20% in the length of the outer diameter compared to 1G ONTs is observed. More than four and a half times larger outer diameters of 3G ONTs compared to 1G ONTs is confirmed. The longest oxide nanotubes are obtained for 3G ONTs of the order of almost 10  $\mu\text{m}$ . The shortest ones are observed for 1G ONTs. The proposed anodic oxidation conditions for 2G ONTs allow to obtain nanotubes almost 4  $\mu\text{m}$  long.

**Table 2.** Morphological parameters of 1G [10], 2G and 3G [13] ONTs produced on the Ti-13Nb-13Zr alloy via anodization.

Electrolyte	Anodization Parameters	ONT internal diameter [nm]	ONT outer diameter [nm]	ONTs length [ $\mu\text{m}$ ]
0.5% HF	E = 20 V, t = 120 min	71(7)	87(10)	0.94(9)
1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 2% $\text{NH}_4\text{F}$	E = 20 V, t = 120 min	61(6)	103(10)	3.9(4)
1M $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ + 4% $\text{NH}_4\text{F}$	E = 50 V, t = 80 min	169(17)	342(34)	9.7(9)

Based on the literature, the influence of anodizing conditions on the diameters and lengths of oxide nanotubes obtained for different generations on the Ti-13Nb-13Zr alloy can be confirmed. The influence of voltage change on the diameter of 2G ONTs on the

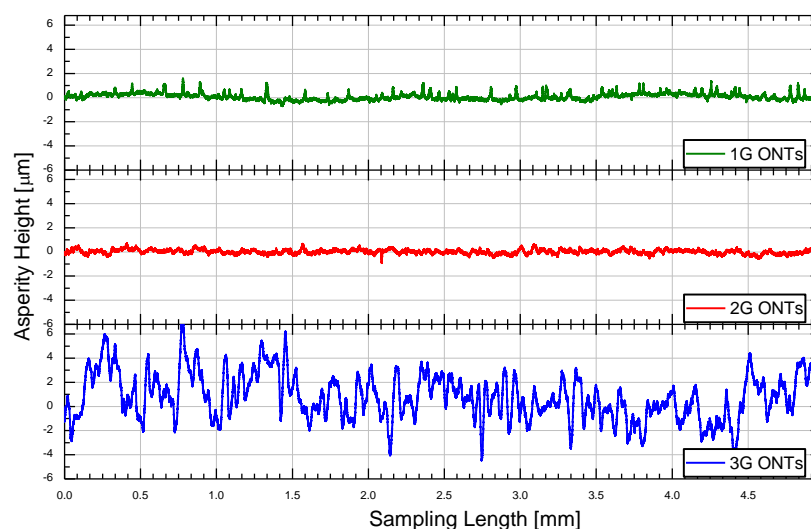


334 Ti-13Nb-13Zr alloy is presented in the paper [42]. In the voltage range 10–45 V, an  
335 increase in nanotube diameter from 55 to 250 nm can be seen. For 3G ONTs on the same  
336 substrate at the voltage of 15–35 V, the outer diameter of nanotube increased from 104(13)  
337 to 230(30) nm [43].  
338

### 3.2. Roughness Profile Measurements

339 Since the roughness of the contact surface affects the adhesion, and thus the strength  
340 of the connection, an important element for obtaining a good adhesive connection is the  
341 proper development of the contact surface of biomaterials. For titanium implants such as  
342 orthopedic and dental, it is advisable to obtain a permanent connection between the tissue  
343 and the material, therefore the aim is to obtain an optimum surface roughness of  $R_a$  be-  
344 tween 1 and 3  $\mu\text{m}$ , while in the case of surgical tools and implants intended, among oth-  
345 ers, for implants prepared for contact with blood surfaces with as little roughness as pos-  
346 sible them [43–45].  
347

348 The geometric structure of the surface (GSS) of the Ti-13Nb-13Zr alloy without and  
349 with ONTs layers of three generations was characterized by surface micro-geometry  
350 measurements in a two-dimensional (2D) system. The discussion of the influence of ano-  
351 dizing conditions on the GSS was based on the selected profile height parameter  $R_a$ . Fig-  
352 ure 3 presents the exemplary roughness profiles after alignment for the 1G, 2G and 3G  
353 ONTs layers on the Ti13-Nb-13Zr alloy. All obtained surface profiles were symmetrical. A  
354 similar value of  $R_a=0.16(01)$  and  $R_a=0.13(01)$  parameter for the 1G and 2G ONTs layers  
355 was determined, respectively. The 3G ONTs was characterized by the highest  $R_a$  param-  
356 eter of 1.34(04).  
357



358  
359 **Figure 3.** Roughness profile for the 1G, 2G and 3G ONTs layers obtained on the Ti13-Nb-13Zr alloy  
360 via anodization.

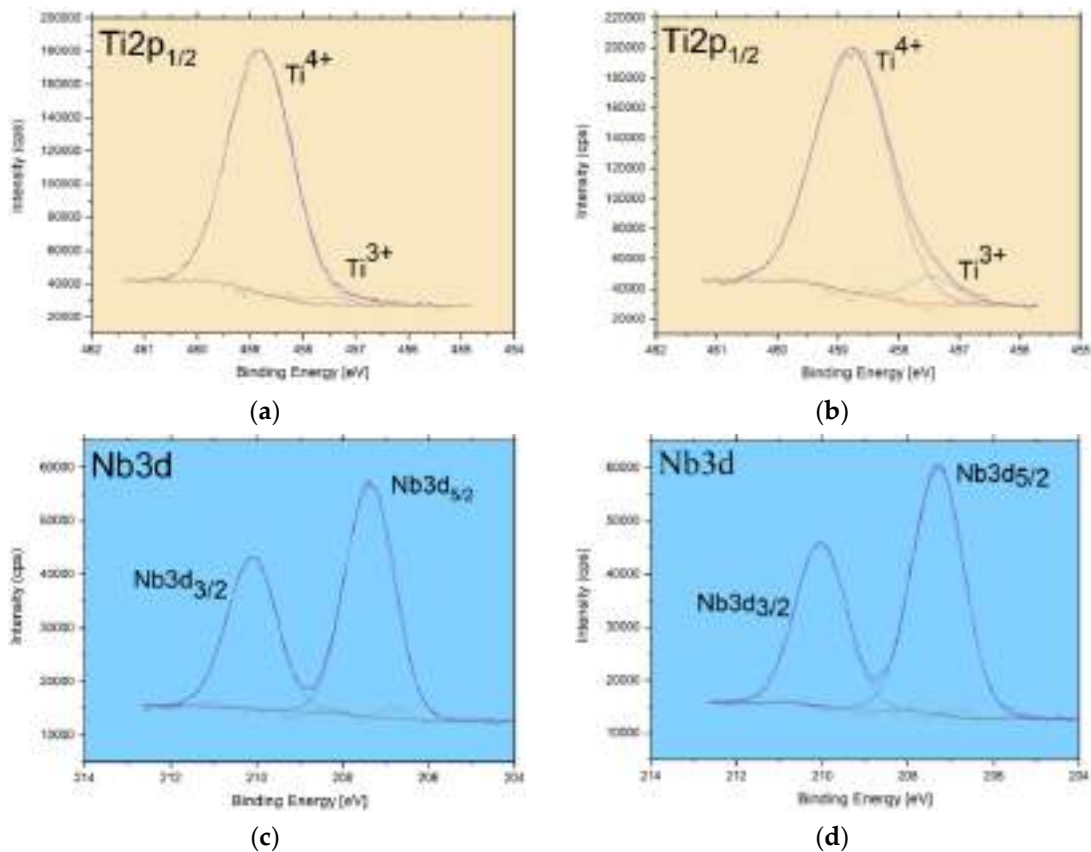
361 The  $R_a$  for the 3G ONTs increased over 8 times in comparison with the 1G ONTs and 10  
362 times in relation to the 2G ONTs due to the differences in the morphological parameters  
363 of the obtained nanotubes on the Ti-13Nb-13Zr alloy. It can be seen that the most devel-  
364 oped surface and the thickest layer of nanotubes were obtained for the 3G ONTs layer  
365 (Table 2). Based on the obtained results, it can be expected that the 3G ONTs layers will  
366 allow for better stability at the implant-bone interface, improve osseointegration and re-  
367 duce the risk of metal ion release as products of corrosion processes and biotribological  
368 wear. In our earlier work [43], it was reported that deviations of the roughness profile  
369 from the mean line at the micro-scale were not observed for the smooth surface of the  
370 Ti-13Zr-13Nb alloy before anodizing, for which  $R_a$  was only 0.10  $\mu\text{m}$ . The positive role of  
371 surface roughness was reported in studies on stainless steel, Co-Cr alloy, titanium and  
372 Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb alloys using human osteoblasts [46,47]. The authors studied the

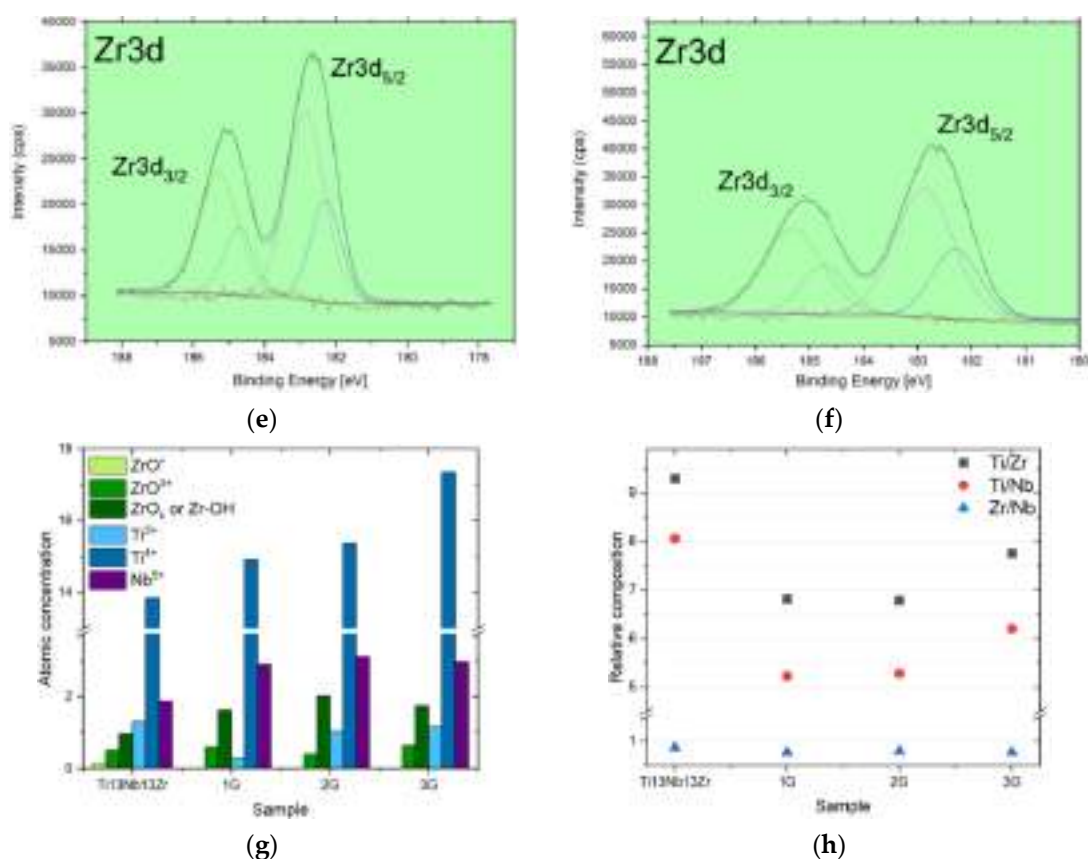
activity of bone tissue after implanting titanium implants with a smooth and rough surface on rabbits. Better contact of the implant with the bone and a larger volume of bone tissue was obtained for rough surfaces in compared to smooth surfaces.

### 3.3. XPS Study of Chemical States

The XPS studies concerned the determination of atomic concentration and chemical states analysis of the obtained ONTs components. Detailed analysis of the shape and position of Ti2p, Nb3d, Zr3d photoemission lines for the 1G and 2G ONTs in Figure 4 a-f was conducted and compared with the results of our previous XPS research on the Ti-13Nb-13Zr alloy reported in the earlier work [13].

The titanium in electrochemically obtained 1G and 2G ONTs occurs mainly as the TiO<sub>2</sub>. The binding energy of the prominent peak (Figure 4a) is located at 458.8 eV and is characteristic of Ti<sup>4+</sup> oxidation state as observed in anatase [48]. A weak contribution of oxidized titanium characteristic for trivalent titanium is visible at binding energy 457.2 eV [49]. Both chemical states were previously observed in the Ti-13Nb-13Zr alloy, for which 91.64% of titanium atoms were in 4<sup>+</sup> valence state and 8.36% in the 3<sup>+</sup> [13]. The amount of the trivalent titanium in the 1G and 2G ONTs is lower than in mentioned reference sample; for the 1G ONTs Ti<sup>3+</sup> atoms account for only 1.81 % of all titanium atoms, whereas for the 2G ONTs, only 6.35 %.





**Figure 4.** XPS high resolution spectra for Ti<sub>2p7/2</sub>: (a) 1G ONTs, Ti<sub>2p1/2</sub>; (b) 2G ONTs, Ti<sub>2p1/2</sub>; (c) 1G ONTs, Nb<sub>3d</sub>; (d) 2G ONTs, Nb<sub>3d</sub>; (e) 1G ONTs, Zr<sub>3d</sub>; (f) 2G ONTs, Zr<sub>3d</sub>; (g) Sample-dependent atomic concentration; (h) Relative composition elements dependent on the sample.

The deconvolution of the lines Nb<sub>3d</sub> of the 1G and 2G ONTs indicates the presence of Nb in one chemical state – the position of the Nb<sub>3d</sub><sub>5/2</sub> at about 207.4 eV (Figure 4c-d) is characteristic for the Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> oxide [50]. The same result for niobium was observed in 3G ONTs in our previous studies [13]. Analysis of the zirconium lines in Figure 4e-f revealed some similarities between the surfaces of the 1G and 2G ONTs and previously reported electrochemically modified Ti-13Nb-13Zr. The positions of deconvoluted peaks indicate the presence of ZrO<sub>2</sub> with a peak at 182.3 eV and Zr in another oxidation state with a peak at 182.9 eV or Zr(OH) [51]. The amount of Zr in a particular chemical state is different for 1G and 2G ONTs, and differs even more when compared with the previously analyzed 3G ONTs sample [13].

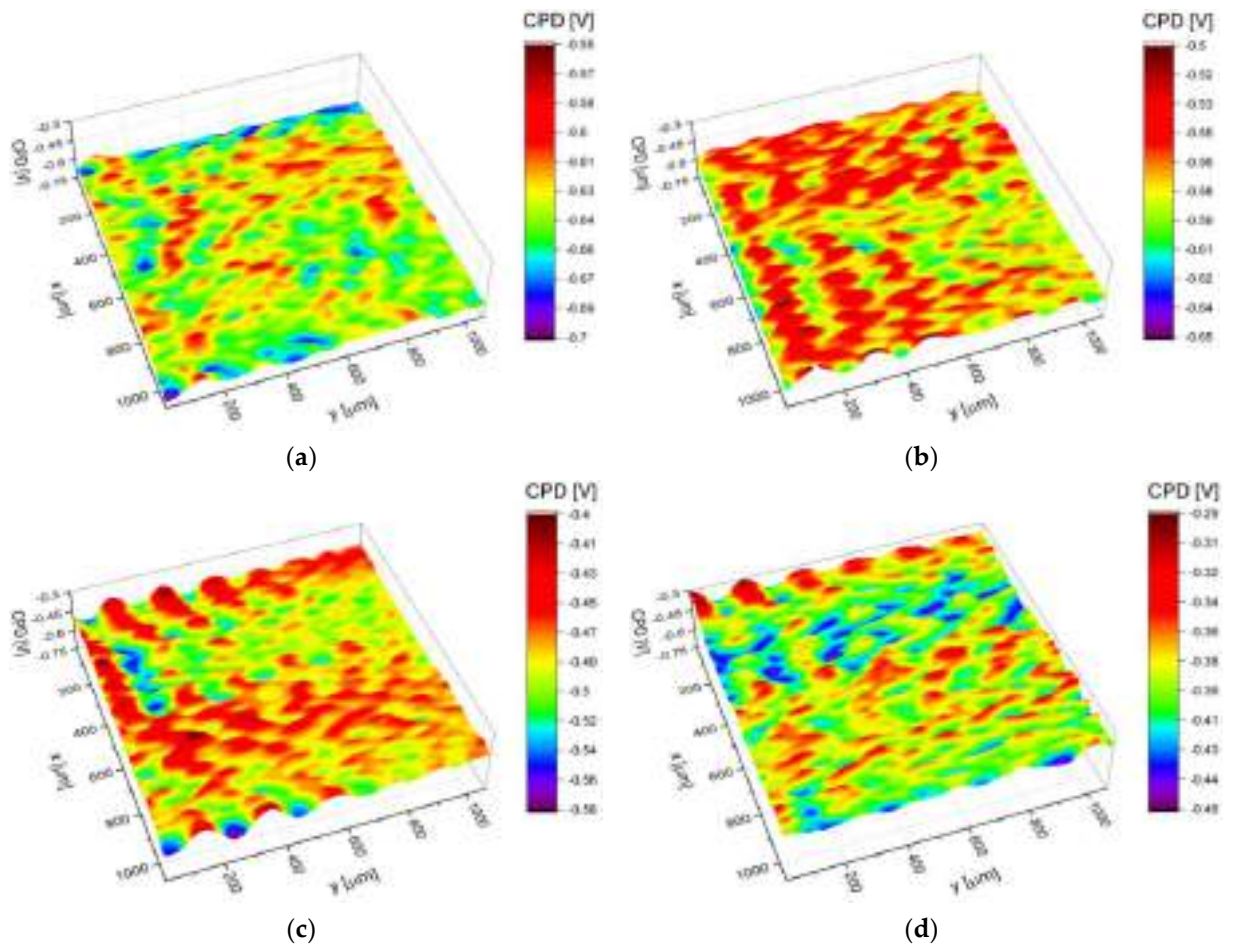
The results of the contribution of the particular chemical state for the electrochemically obtained 1G, 2G, G3 ONTs layers, and reference alloy are summarized in Figure 4g. The data points represent the calculated atomic concentration for each atom in each chemical state. The general observation suggests that Nb and Zr bonded with oxygen or OH group in anodic ONTs layers are relatively stable – their amount does not depend on the applied procedure of electrochemical modification. In the case of Ti, applied anodization generally influences the amount of titanium but also titanium chemical states. This is worth noting that applied procedures for electrochemical oxidation of Ti-13Nb-13Zr in all three generations lead to changes in the relative ratios of the elements under consideration (Figure 4h). Those changes are related to titanium as only the relative ratios of Ti/Zr, and Ti/Nb are changed when compared with the reference sample. Based on the 1G and 2G ONTs layers studies, it can also be observed that even if the relative amount of sample constituents is almost identical, as observed for the 1G and 3G [13] ONTs layers, their chemical composition is different.

422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436

### 3.4. Electronic Properties

Statistical analysis of the contact potential difference maps in Figure 5 allowed to determine the arithmetic average ( $CPD_{av}$ ), the root mean square deviation ( $CPD_{rms}$ ), the skewness ( $CPD_{sk}$ ), the excess kurtosis ( $CPD_{ku}$ ) and the autocorrelation length ( $CPD_{al}$ ) i.e. parameters that quantitatively describe electronic properties of the Ti-13Nb-13Zr alloy surface covered with ONTs. The values of above parameters are presented in Table 3.

It was found that the substrate surface covered with ONTs is characterized by the higher value of the  $CPD_{av}$  in comparison with the biomedical Ti-13Nb-13Zr alloy, regardless of the solution composition from which nanotubes were obtained. Moreover, it was stated that the 3G ONTs are characterized by the highest  $CPD_{av}$  value (ca.  $-387$  mV<sub>KPF</sub>) among all the investigated biomaterials. This result may be related to the different chemical composition of solutions and hence different concentration of fluorine ions in electrolytes (Table 2), from 0.5% F<sup>-</sup> for the 1G ONTs, 2% for the 2G ONTs and 4% for the 3G ONTs.



437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446

**Figure 5.** CPD maps determined for: (a) Ti-13Nb-13Zr alloy; (b) 1G ONTs; (c) 2G ONTs; (d) 3G ONTs.

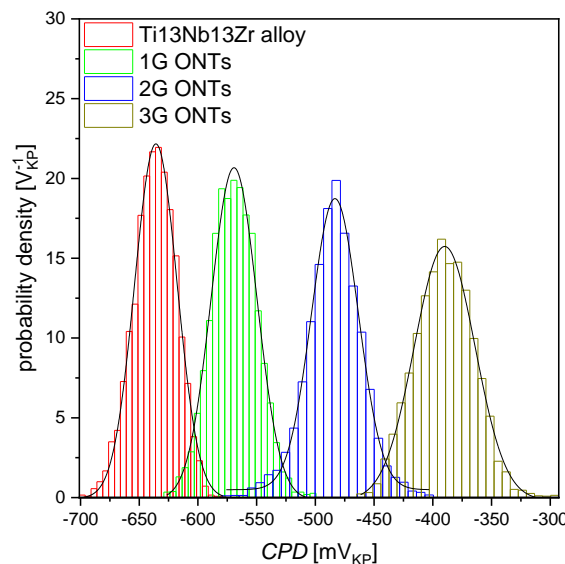
The root mean square deviation ( $CPD_{rms}$ ) determines the deviation of  $CPD$  heights in relation to the arithmetic average whereas autocorrelation length ( $CPD_{al}$ ) characterizes the spatial distribution of  $CPD$  heights on the material surface. In other words,  $CPD_{al}$  is a measure of the distance over the surface by which one would find a surface feature ( $CPD$  in this case) that is statistically different from the one that can be found in the original location. The  $CPD_{rms}$  parameters obtained for the investigated surfaces indicate increasing heights of  $CPD$  in the order Ti-13Nb-13Zr, 1G ONTs, 2G ONTs, and 3G ONTs. Simultaneously values of  $CPD_{al}$  parameter show that the correlation length is the highest for

Ti-13Nb-13Zr substrate and decreases for surfaces covered with the nanotubes. Generally, both parameters i.e.  $CPD_{rms}$  and  $CPD_{al}$  indicate that the Ti-13Nb-13Zr substrate is characterized by the most uniform surface of all the samples tested and also that the production of nanotubes on the Ti-13Nb-13Zr surface increases its electrical heterogeneity. Increase in  $CPD_{rms}$  and  $CPD_{al}$  determined for the surfaces covered with ONTs can be explained by increasing dimensions of outer diameters the nanotubes from 87(10) nm for the 1G ONTs, 103(10) nm for the 2G ONTs, and 342(34) nm for the 3G ONTs. Skewness ( $CPD_{sk}$ ) and excess kurtosis ( $CPD_{ku}$ ) describe the shape of the  $CPD$  distribution and give additional information on the  $CPD$  peaks/valleys profile. It was found that for all investigated samples  $CPD_{sk}$  and  $CPD_{ku}$  parameters change in the range  $\pm 0.3$  (see Table 3) thus one can state that for each material tested  $CPD$  distribution follows a Gaussian (normal) distribution.

**Table 3.** Statistical parameters calculated using  $CPD$  maps of the Ti-13Nb-13Zr substrate and for the 1G, 2G and 3G ONTs;  $CPD_{av}$  is the arithmetic average,  $CPD_{rms}$  is the root mean square deviation,  $CPD_{al}$  is the autocorrelation length,  $CPD_{sk}$  is the skewness, and  $CPD_{ku}$  is the excess kurtosis;  $V_{KP}$  is the voltage measured versus Kelvin probe.

Parameter	Ti-13Nb-13Zr	1G ONTs	2G ONTs	3G ONTs
$CPD_{av}$ [mV <sub>KP</sub> ]	-634.2	-566.5	-480.4	-386.7
$CPD_{rms}$ [mV <sub>KP</sub> ]	17.8	19.1	23.7	24.7
$CPD_{al}$ [μm]	63.61	31.37	43.12	52.29
$CPD_{sk}$	-0.20	0.06	-0.15	0.07
$CPD_{ku}$	-0.09	0.05	0.28	-0.02

Histograms of the  $CPD$  values with fitted Gaussian distributions are shown in Figure 6. The comprehensive description of the histograms preparation and the determination of the parameters can be found elsewhere [52–54].



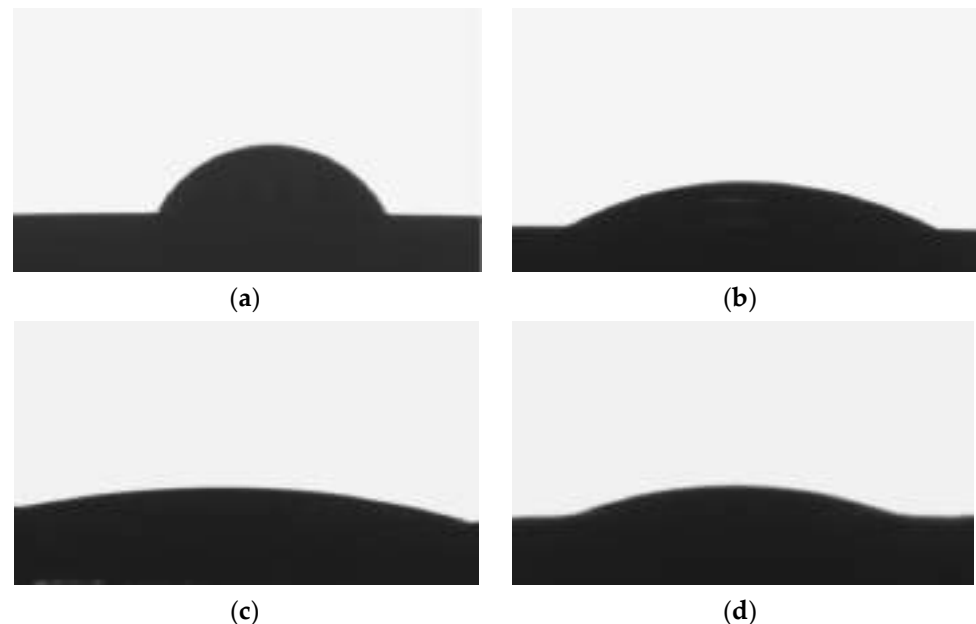
**Figure 6.**  $CPD$  histograms determined for the Ti-13Nb-13Zr alloy and for the 1G, 2G and 3G ONTs; solid lines—fit of the Gaussian function.

Approximation of the histograms using the Gaussian function allows determining arithmetic average  $CPD_{av}$  and the standard deviation which in this case corresponds to the  $CPD_{rms}$  parameter. Values of  $CPD_{sk}$  and  $CPD_{ku}$  also indicate that the  $CPD$  heights are symmetrically distributed around the average as well as that the investigated surfaces do not show inordinately high peaks/deep valleys. Generally one can state that the entire surface of the Ti-13Nb-13Zr alloy is evenly covered with ONTs irrespective of the different production process (solution composition, anodization parameters).

478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495

### 3.5. Surface Wettability

The nature of the interaction of the biomaterial with the tissue, related to each of the key properties of the surface layer mentioned above, is also determined by surface wettability. It determines protein adsorption, blood coagulation and biological response. Most of the commonly used biomaterials are hydrophobic and has a high affinity for many proteins. Immediately after implantation, the biomaterial is covered with a layer of proteins. These are mainly albumin, fibrinogen, fibronectin, immunoglobulins and von Willebrand factors. In shaping the surface properties of implants, wettability should also be taken into account, which is important for the osseointegration process preceding osseointegration and affects the adsorption of molecules favoring the adhesion of fibroblasts and/or bacteria [55,56]. Hydrophilic surfaces have better biological activity in contact with body fluids, and thus provide better osseointegration [57]. The surface wettability tests of the produced ONTs layers showed that the contact angle measured for the Ti-13Nb-13Zr alloy without and with vertically oriented 1G, 2G and 3G ONTs took the following  $\Theta$  values in sequence: 62.9(9) °, 25.3(5) °, 11.9(1) ° and 14.7(2) °, respectively (Figure 7).



496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513

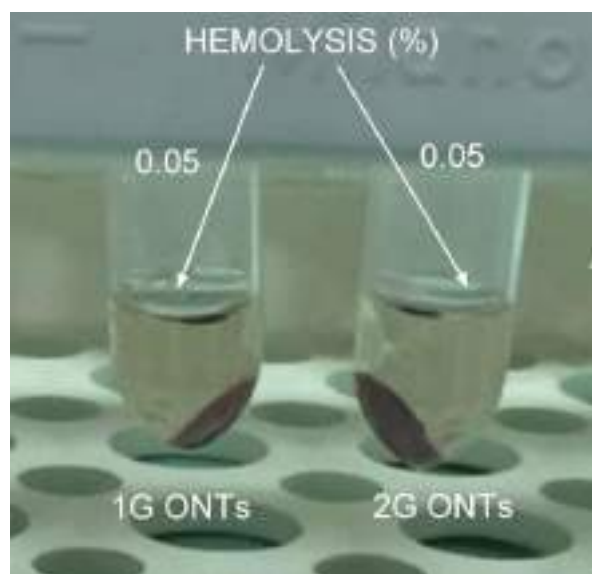
**Figure 7.** Image of a water drop on the surface the Ti-13Nb-13Zr alloy: (a) Non-anodized; (b) Anodized in 0.5 % HF; (c) Anodized in 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 2 %  $\text{NH}_4\text{F}$ ; (d) Anodized in 1 M  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$  + 4 %  $\text{NH}_4\text{F}$ .

The tests performed confirmed the favorable hydrophilic nature of the produced ONTs layers. Investigation of the contact angle of the individual sample surface showed that they were hydrophilic in nature both before and after anodization (Figure 7a-d). A reduction in  $\Theta$  value was observed for the samples after anodization, which indicates an increase in hydrophilicity. The most advantageous hydrophilic properties showed the 2G ONTs, then 3G ONTs, 1G ONTs, and the smallest Ti-13Nb-13Zr alloy. The obtained wettability results of nanotubular surfaces on titanium are similar [58]. Using anodization as a method of electrochemical modification enhance surface wettability of titanium and its alloys.

### 3.6. In Vitro Hemocompatibility Study

Currently, the most popular method of determining hemocompatibility is the hemolysis test. The process of hemolysis is based on the transition hemoglobin into the

cytoplasm due to the rupture of erythrocytes. According to the ASTM F756-17 standard [38] the biocompatibility of the 1G and 2G ONTs examinations were performed (Figure 8).



**Figure 8.** Anti-hemolytic activity of the 1G and 2G ONTs on the Ti-13Nb-13Zr alloy.

The value of the hemolytic index lower than 2 indicates that the biomaterial is nonhemolytic. The obtained results of in vitro hemocompatibility study shown in Figure 8 revealed the value of the hemolytic index of 0.05 for both the 1G and 2G ONTs. The hemolytic index for the 3G ONTs we found to be 0.00 [13]. The highest hemolytic index of 0.30 was reported for the non-anodized Ti-13Nb-13Zr alloy [13]. The obtained values prove that the proposed electrochemical modification ensures outstanding hemocompatibility. In case of the 3G ONTs it is even possible to completely eliminate hemolysis.

### 3.7. Cytotoxicity and Cell Adhesion Assay

The interaction of the substrate material with a nanotubular structure with the biological environment can also be assessed during the use of cell cultures and cellular response on the surface prepared in this way. In the past, in order to evaluate cytotoxicity of biomaterials for medicine, in vitro mammalian cell culture tests were used. At present morphology, chemistry surface and type of cells especially concentration and time of exposure determine cytotoxicity of nanomaterials. The test article showed no cytotoxic potential to L-929 mouse fibroblast cells for the non-anodized Ti-13Nb-13Zr alloy and with the obtained 1G, 2G and 3G ONTs layers (Table 4). It can be noticed that in the case of oxide nanotubes produced on the vital Ti-13Nb-13Zr alloy by the anodizing method, the obtained cytotoxicity for mouse fibroblast cells is similar. The adhesion, proliferation and migration of cells forming bone tissue is related to the diameters of nanotubes. This is confirmed by numerous studies showing that the ONTs surface is conducive to the growth of cells. It should be noted that different research groups used different cell colonies, which affected the results of the study [59–61].

Based on the prepared samples for cytotoxicity testing, cell adhesion to layers obtained via anodization and to the starting material was also tested. The cells adhere with different efficiency which can be seen in Table 5. The obtained results of the adhesion test showed a different degree of adhesion depending on the tested oxide layer. For the self-passive oxide layer present on the Ti-13Nb-13Zr alloy and for the 1G ONTs, high cell adhesion was obtained. For the 2G and 3G ONTs the medium adhesion was revealed. It can be correlated with diameter and length of the obtained nanotubes in

dependence of generation. Cell adhesion decreased with the growth and length of the ONTs.

**Table 4.** Cell response for the Ti-13Nb-13Zr alloy before and after formation of 1G, 2G and 3G ONTs.

Material	Percent Viability [%]	System Suitability
Positive control	0.54	No Cytotoxic Potential
Negative control	98.33	No Cytotoxic Potential
Ti-13Nb-13Zr (1x)	92.26	No Cytotoxic Potential
Ti-13Nb-13Zr (2x)	97.18	No Cytotoxic Potential
Ti-13Nb-13Zr (3x)	97.49	No Cytotoxic Potential
Ti-13Nb-13Zr (4x)	99.63	No Cytotoxic Potential
1G ONTs (1x)	100.6	No Cytotoxic Potential
1G ONTs (2x)	85.29	No Cytotoxic Potential
1G ONTs (3x)	103.8	No Cytotoxic Potential
1G ONTs (4x)	98.67	No Cytotoxic Potential
2G ONTs (1x)	87.91	No Cytotoxic Potential
2G ONTs (2x)	99.59	No Cytotoxic Potential
2G ONTs (3x)	106.3	No Cytotoxic Potential
2G ONTs (4x)	106.2	No Cytotoxic Potential
3G ONTs (1x)	88.45	No Cytotoxic Potential
3G ONTs (2x)	89.97	No Cytotoxic Potential
3G ONTs (3x)	95.02	No Cytotoxic Potential
3G ONTs (4x)	96.63	No Cytotoxic Potential

**Table 5.** Estimated cell adherence to the Ti-13Nb-13Zr alloy before and after formation of 1G, 2G and 3G ONTs.

Material	Level of adhesion
Ti-13Nb-13Zr	High
1G ONTs	High
2G ONTs	Medium
3G ONTs	Medium

ONTs layers are able to increase the bioactivity of the implant surface. First of all, they increase the surface roughness at the nano-scale, forming a biomimetic nanostructure, which is similar to natural rough bone tissue. Bone-forming cells (osteoblasts) have been proven in numerous studies [62,63] to adhere to a surface that is morphologically and chemically similar to natural bone tissue. The interaction of the nanotube-structured substrate material with the biological environment can also be assessed during the use of cell culture. Cell adhesion is related to the diameter of the nanotubes, research shows in [64]. The authors showed that oxide nanotubes with a smaller diameter had a more stimulating effect on cell growth and differentiation.



3.8. Thrombogenicity Test

The alpha Kappendorf coefficient was 0.88, which proved very good compatibility of thrombogenicity assesment carried out by the two experts. The relationship between the evaluations is shown in Table 6. Numbers in the table cells represent the number of samples.

Table 6. Number of samples assigned to each expert.

		Expert 2				
		Class 1	Class 2	Class 3	Class 4	Class 5
Expert 1	Class 1	5	0	0	0	0
	Class 2	1	4	0	0	0
	Class 3	0	1	8	1	0
	Class 4	0	0	1	9	1
	Class 5	0	0	0	0	7

The result of the Kruskal – Wallis test was significant (p=0.0000) which means that at least one group differs from the rest. Results of the post-hoc test is shown in Table 7 and Figure 9.

Table 7. Results of the post-hoc test.

	1G ONTs	2G ONTs	3G ONTs	Ti-13Nb-13Zr
1G ONTs		0.0030	0.1520	0.5908
2G ONTs	0.0030		0.0000	0.4582
3G ONTs	0.1520	0.0000		0.0017
Ti-13Nb-13Zr	0.5908	0.4582	0.0017	

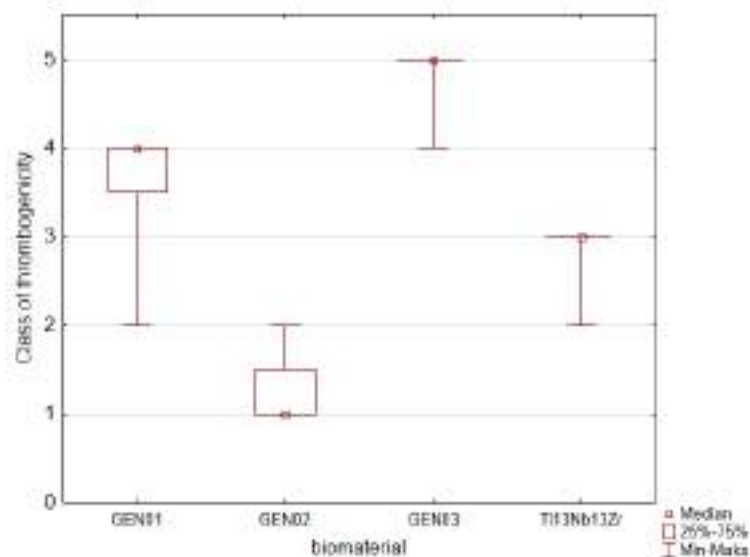


Figure 9. Thrombogenicity of the studied Ti-13Nb-13Zr alloy before and after formation of 1G, 2G and 3G ONTs (in six-level ordinal scale).

The class 0 meant very small thrombogenicity comparable with negative control. The class 5 meant very high thrombogenicity comparable with positive control. Meaning of a

588 given class was described in Table 1 and each description was exemplified by images of  
589 the biomaterial surfaces (Bionate 55D polymer, PEEK, Ti6Al7Nb alloy with layer of TiN,  
590 PEEK polymer, ZrO<sub>2</sub>+Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ceramics and oraz glass covered by collagen) dotted by  
591 thrombocytes and their aggregates. Usage of the interval scale limited the possibility of  
592 applying of advanced statistical methods and made worse the quality of inference but, on  
593 the other hand, made carrying out a statistical proof possible.

594 In order to study how the expert assessments differ the alfa Kappenrorf coefficient  
595 was used. Taken values from 0 to 1 where 0 means total discrepancy of the expert as-  
596 sessments and 1 means their total agreement. It is accepted in literature data that the co-  
597 efficient value larger than 0.8 means a very good agreement in the assessments. The alfa  
598 Kappendorf coefficient for the presented studies was 0.88, thus, the expert's opinions  
599 were practically equal. Further analysis was carried out with the use of the  
600 Kruskal–Wallis test with post-hoc multiple comparison method.

601 Thrombogenicity of the 1G and 3G ONTs layers is practically the same and those  
602 biomaterials strongly unfavorably influence activation of coagulation factors. They  
603 were classified to class 4 and 5, respectively. The class 5 contains samples of positive  
604 control, so the 3G ONTs biomaterial activates the coagulation system in the same degree  
605 as strongly thrombogenic collagen. Athorombogenic properties of the 1G ONTs bio-  
606 material are only slightly better that these of the 3G ONTs, but one should remember that  
607 there are no differences statistically important between those two materials ( $p=0.1520$  –  
608 see Table 4). Thrombogenicity of the 2G ONTs and Ti-13Nb-13Zr does not differ, how-  
609 ever these biomaterials show much better athrombogenic properties than the 1G and 3G  
610 ONTs. The 2G ONTs and Ti-13Nb-13Zr were classified into class 1 and 3, respectively.  
611 The class 1 contained biomaterials slightly worse from the positive control (Table 1).  
612 Thus, the 2G ONTs biomaterial has small effect on coagulation system. The Ti-13Nb-13Zr  
613 alloy is situated in class 3, however there are no statistical proofs that it differs from the  
614 2G ONTs ( $p=0.4582$ , compare Table 4).

### 615 3.9. Drug Release Kinetics

617 To check the possibility of a potential use of ibuprofen loaded Hep-DOPA/ONTs as  
618 carriers for the controlled release of drug, was compared the ibuprofen release profiles for  
619 three generation of oxide nanotubes on the Ti-13Nb-13Zr alloy obtained via anodization.  
620 The analysis of the obtained results showed a rapid increase in the released ibuprofen in  
621 the first 10 minutes for the 1G ONTs (Figure 10). A continuous increase in drug content is  
622 observed up to 30 minutes. After this time, the ibuprofen content began to decrease, and  
623 after 60 minutes, the drug content dropped to 0. In the first 10 minutes ibuprofen is re-  
624 leased from 16.25 % for the 2G ONTs and 10.96 % for the 3G ONTs. Between 20 and 30  
625 minutes, there is an increase in drug release to about 35 and 36 %. From 40 minutes, the  
626 release of the drug decreases to less than 10 % at 60 minutes. The high dose released from  
627 the 1G ONTs in the first minutes proves the possibility of rapid anti-inflammatory and  
628 analgesic effect by releasing the substance from the nanotubular coating, which is neces-  
629 sary to relieve pain in peri-implantation tissues and reduce inflammation without using  
630 oral analgesic therapy [65].

631 Ibuprofen (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>) is a non-steroidal anti-inflammatory drug, a derivative of  
632 propionic acid [66]. It has anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties. It in-  
633 hibits platelet aggregation. The action mechanism of ibuprofen is based on the inhibition  
634 of the activity of the COX-1 and COX-2 cyclooxygenase enzymes [66]. COX-2 enzyme ac-  
635 tivity increases rapidly in inflamed tissues. The inhibition of this enzyme by ibuprofen  
636 reduces the inflammatory process from the first moments of action. Orally administered  
637 ibuprofen has a number of side effects. Therefore, administration of the ibuprofen in the  
638 form of a drug release system reduces the risk of side effects without irritating the gas-  
639 trointestinal mucosa, which is especially important in ulceration and bleeding from the  
640 stomach and duodenum [67]. Ibuprofen is a drug that cannot be used long-term like an-  
641 tibiotics [67]. Therefore, the rapid release of a dose of ibuprofen in the first moment after

implantation can effectively inhibit the action of the COX-2 enzyme and thus limit the development of the first inflammation in the tissues surrounding the implant. Orally administered ibuprofen disintegrates very rapidly. The disintegration time of ibuprofen in the liver is about 2 hours, therefore ibuprofen is an excellent substance for application in controlled drug release systems [68–70]. The drug immobilized inside the nanotubes must be soluble in water environments so that they dissolve in body fluids, in particular in blood. This condition must be met to achieve full biodistribution in the human body. The advantage of using ibuprofen is that it is 90% bound to plasma proteins [70].

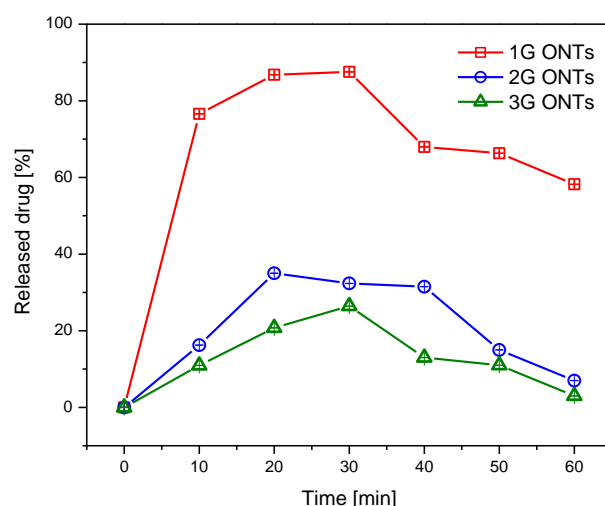


Figure 10. Ibuprofen release profile from the 1G, 2G and 3G ONTs on the Ti-13Nb-13Zr alloy in function of the time.

In addition, the material to which the drug is applied must be biocompatible. Oxide nanotubes belong to a group of materials characterized by a developed and diversified surface, and thus a greater possibility of application of therapeutics [71]. In the case of ONTs of the 1G, 2G and 3G with a single-walled structure, the drug is applied to the inside of the nanotube by attaching the drug to the surface with covalent amide or ester bonds [72,73]. Ibuprofen from the nanotubes is released through the so-called "burst effect", i.e. a rapid release of the drug within the first 15 minutes [71,74]. The primary mechanism of drug release is the Gallagher-Corrigan model. This model describes a two-stage drug release kinetics. According to the Gallagher-Corrigan model, the first phase of drug release is its burst from the polymer Hep-DOPA matrix. The second stage is slow release determined by the matrix degradation. The rate of the drug release process in this type of drug delivery systems is high in the initial period, then it decreases [71].

## 5. Conclusions

The obtained FE-SEM and TEM results confirmed the presence of the 1G, 2G and 3G oxide nanotubes on the Ti-13Nb-13Zr alloy surface obtained via anodization in different conditions. The morphological parameters of the obtained oxide nanotubes increased with the increase in the fluorine ions content in the solution causing the increase in the surface roughness. The  $R_a$  parameter for the 3G ONTs was over 8 times higher in comparison with the 1G ONTs and 10 times higher in relation to the 2G ONTs. XPS studies showed that these nanotubular layers of three generations were composed of  $TiO_2$ ,  $Nb_2O_5$ ,  $ZrO_2$ , and  $ZrO_x$ . The electronic properties of the 1G, 2G and 3G ONTs tested by the SKP method depended on the content of  $F^-$  ions. Statistical analysis of the contact potential difference maps showed that the quantitative parameters in the form of the arithmetic mean and the square root of the height irregularity increased with the increase in the content of fluorine ions in the solution from 0.5 % to 4 %. The 2G nanotubular oxide layers

show the best hydrophilic properties. Biological assessment of hemocompatibility of the obtained ONTs revealed no hemolytic effects confirming the fulfillment of the requirements for clinical use. The best adhesion was shown by the 1G ONTs and the alloy before surface modification. The thrombogenicity of the 2G ONTs and Ti-13Nb-13Zr alloy does not differ from each other, but they have much better athrombogenic properties than the 1G and 3G ONTs. The ibuprofen release profile from the Hep-DOPA matrix from three type of oxide nanotube generation was investigated. A two-stage Gallagher-Corrigan model was selected to describe the kinetics of ibuprofen release mechanism.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.Ł.; methodology, A.S. and M.G.; software, J.K.; validation, A.S. and M.G.; formal analysis, M.G., K.B., P.O., J.K., M.Z., J.M. and K.D.; investigation, A.S., M.G., K.B., P.O., J.K., M.Z., J.M. and K.D.; resources, A.S.; data curation, A.S.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, B.Ł., M.G., K.B., P.O. and J.K.; visualization, A.S., M.G., K.B., P.O., J.K., M.Z., J.M. and K.D.; investigation, A.S., M.G., K.B., P.O., J.K., M.Z., J.M. and K.D.; supervision, B.Ł.; project administration, A.S.; funding acquisition, B.Ł. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Data Availability Statement:** MDPI Research Data Policies.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Davis, R.; Singh, A.; Jackson, M.J.; Coelho, R.T.; Prakash, D.; Charalambous, C.P.; Ahmed, W.; da Silva, L.R.R.; Lawrence, A.A. A comprehensive review on metallic implant biomaterials and their subtractive manufacturing. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* **2022**, *120*, 1473–1530. <https://doi.org/doi:10.1007/s00170-022-08770-8>.
2. Branemark, P.I. *The Osseointegration Book: From Calvarium to Calcaneus*, 1st ed.; Publisher: Quintessence, 2007, ISBN-10: 1850970904, ISBN-13: 978-1850970903.
3. Dudek, K.; Dulski, M.; Łosiewicz, B. Functionalization of the NiTi Shape Memory Alloy Surface by HAP/SiO<sub>2</sub>/Ag Hybrid Coatings Formed on SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> Glass Interlayer. *Materials* **2020**, *13*, 1648. <https://doi.org/doi:10.3390/ma13071648>.
4. Stróż, A.; Maszybrocka, J.; Goryczka, T.; Dudek, K.; Osak, P.; Łosiewicz, B. Influence of Anodizing Conditions on Biotribological and Micromechanical Properties of Ti-13Zr-13Nb Alloy. *Materials* **2023**, *16*, 1237. <https://doi.org/doi:10.3390/ma16031237>.
5. Łosiewicz, B.; Stróż, A.; Osak, P.; Maszybrocka, J.; Gerle, A.; Dudek, K.; Balin, K.; Łukowiec, D.; Gawlikowski, M.; Bogunia, S. Production, Characterization and Application of Oxide Nanotubes on Ti-6Al-7Nb Alloy as a Potential Drug Carrier. *Materials* **2021**, *14*, 6142. <https://doi.org/doi:10.3390/ma14206142>.
6. Aniołek, K.; Łosiewicz, B.; Kubisztal, J.; Osak, P.; Stróż, A.; Barylski, A.; Kaptacz, S. Mechanical properties, corrosion resistance and bioactivity of oxide layers formed by isothermal oxidation of Ti-6Al-7Nb alloy. *Coatings* **2021**, *11*, 505. <https://doi.org/doi:10.3390/coatings11050505>.
7. Wang, W.; Yeung, K.W.K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact. Mater.* **2017**, *2*, 224–247. <https://doi.org/doi:10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>.
8. Ti-Based Biomaterials. In *Ti-Based Biomaterials*; MDPI: Basel, Switzerland, 2020.
9. Stróż, A.; Goryczka, T.; Łosiewicz, B. Electrochemical formation of self-organized nanotubular oxide layers on niobium (Review). *Curr. Nanosci.* **2019**, *15*, 42–48. <https://doi.org/doi:10.2174/1573413714666180115141012>.
10. Stróż, A.; Dercz, G.; Chmiela, B.; Łosiewicz, B. Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy with potential use as bone implant. *AIP Conf. Proc.* **2019**, *2083*, 030004. <https://doi.org/doi:10.1063/1.5094314>.
11. Szklarska, M.; Dercz, G.; Simka, W.; Łosiewicz, B. A.c. impedance study on the interfacial properties of passivated Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution. *Surf. Interface Anal.* **2014**, *46*, 698–701. <https://doi.org/doi:10.1002/sia.5383>.
12. Stróż, A.; Luxbacher, T.; Dudek, K.; Chmiela, B.; Osak, P.; Łosiewicz, B. In Vitro Bioelectrochemical Properties of Second-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Biomedical Alloy. *Materials* **2023**, *16*, 1408. <https://doi.org/doi:10.3390/ma16041408>.
13. Stróż, A.; Łosiewicz, B.; Zubko, M.; Chmiela, B.; Balin, K.; Dercz, G.; Gawlikowski, M.; Goryczka, T. Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications. *Mater. Charact.* **2017**, *132*, 363–372. <https://doi.org/doi:10.1016/j.matchar.2017.09.004>.
14. Łosiewicz, B.; Stróż, A.; Kubisztal, J.; Osak, P.; Zubko, M. EIS and LEIS Study on In Vitro Corrosion Resistance of Anodic Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Alloy in Saline Solution. *Coatings* **2023**, *13*, 875. <https://doi.org/10.3390/coatings13050875>.
15. Sowa, M.; Piotrowska, M.; Widziołek, M.; Dercz, G.; Tylko, G.; Gorewoda, T.; Osyczka, A.M.; Simka, W. Bioactivity of coatings formed on Ti-13Nb-13Zr alloy using plasma electrolytic oxidation. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2015**, *49*, 159–173. <https://doi.org/doi:10.1016/j.msec.2014.12.073>.

- 736 16. Levin, M.; Spiro, R.C.; Jain, H.; Falk, M.M. Effects of Titanium Implant Surface Topology on Bone Cell Attachment and Prolif-  
737 eration in vitro. *Med Devices (Auckl)* **2022**, *15*, 103–119. <https://doi.org/doi:10.2147/MDER.S360297>.
- 738 17. Seramak, T.; Zieliński, A.; Serbiński, W.; Zasińska, K. Powder metallurgy of the porous Ti-13Nb-13Zr alloy of different powder  
739 grain size. *Mater. Manuf.* **2019**, *34*, 915–920. <https://doi.org/doi:10.1080/10426914.2019.1605178>.
- 740 18. Eisenbarth, E.; Velten, D.; Müller, M.; Thull, R.; Breme, J. Biocompatibility of  $\beta$ -stabilizing elements of titanium alloys. *Bio-*  
741 *materials* **2004**, *25*, 5705–5713. <https://doi.org/doi:10.1016/j.biomaterials.2004.01.021>.
- 742 19. Albrektsson, T.; Brånemark, P.I.; Hansson, H.A.; Lindström, J. Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a  
743 long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop. Scand.* **1981**, *52*, 155–170. doi:10.3109/17453678108991776.
- 744 20. Shivaram, A.; Bose, S.; Bandyopadhyay, A. Mechanical degradation of TiO<sub>2</sub> nanotubes with and without nanoparticulate silver  
745 coating. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2016**, *59*, 508–518. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jmbbm.2016.02.028>.
- 746 21. Williams, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2941–2953. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
- 747 22. Schenk, R.K.; Buser, D. Osseointegration: a reality. *Periodontol.* **2000**, *17*, 22–35. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1600-0757.1998.tb00120.x>.
- 748 23. Gulati, K.; Maher, S.; Findlay, D.M.; Losic, D. Titania nanotubes for orchestrating osteogenesis at the bone–implant interface.  
749 *Nanomedicine (Lond)* **2016**, *11*, 1847–1864. <https://doi.org/doi:10.2217/nnm-2016-0169>.
- 750 24. Kulkarni, M.; Mazare, A.; Gongadze, E.; Perutkova, Š.; Kralj-Iglič, V.; Milošev, I.; Schmuki, P.; Iglič, A.; Mozetič, M. Titanium  
751 nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology* **2015**, *26*, 062002. <https://doi.org/doi:10.1088/0957-4484/26/6/062002>.
- 752 25. Hanawa, T. Titanium–Tissue Interface Reaction and Its Control With Surface Treatment. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*, 170.  
753 <https://doi.org/doi:10.3389/fbioe.2019.00170>.
- 754 26. Awad, N.K.; Edwards, S.L.; Morsi, Y.S. A review of TiO<sub>2</sub> NTs on Ti metal: Electrochemical synthesis, functionalization and  
755 potential use as bone implants. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *76*, 1401–1412. <https://doi.org/doi:10.1016/j.msec.2017.02.150>.
- 756 27. Li, Y.; Yang, Y.; Li, R.; Tang, X.; Guo, D.; Qing, Y.; Qin, Y. Enhanced antibacterial properties of orthopedic implants by titanium  
757 nanotube surface modification: a review of current techniques. *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *14*, 7217–7236.  
758 <https://doi.org/doi:10.2147/IJN.S216175>.
- 759 28. Rani, S.; Roy, S.C.; Paulose, M.; Varghese, O.K.; Mor, G.K.; Kim, S.; Yoriya, S.; LaTempa, T.J.; Grimes, C.A. Synthesis and ap-  
760 plications of electrochemically self-assembled titania nanotube arrays. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 2780–2800.  
761 <https://doi.org/doi:10.1039/B924125F>.
- 762 29. Lyndon, J.A.; Boyd, B.J.; Birbilis, N. Metallic implant drug/device combinations for controlled drug release in orthopaedic  
763 applications. *J. Control. Release* **2014**, *179*, 63–75. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jconrel.2014.01.026>.
- 764 30. Al-Dubai, H.; Pittner, G.; Pittner, F.; Gabor, F. Biocompatible medical implant materials with binding sites for a biodegradable  
765 drug-delivery system. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2011**, *4*, 87–94. <https://doi.org/doi:10.2147/NSA.S23605>.
- 766 31. Wu, B.; Tang, Y.; Wang, K.; Zhou, X.; Xiang, L. Nanostructured Titanium Implant Surface Facilitating Osseointegration from  
767 Protein Adsorption to Osteogenesis: The Example of TiO<sub>2</sub> NTAs. *Int. J. Nanomedicine* **2022**, *17*, 1865–1879.  
768 <https://doi.org/doi:10.2147/IJN.S362720>.
- 769 32. Roy, P.; Berger, S.; Schmuki, P. TiO<sub>2</sub> Nanotubes: Synthesis and Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2904–2939.  
770 <https://doi.org/doi:10.1002/anie.201001374>.
- 771 33. Smolka, A.; Rodak, K.; Dercz, G.; Dudek, K.; Łosiewicz, B. Electrochemical Formation of Self-Organized Nanotubular Oxide  
772 Layers on Ti13Zr13Nb Alloy for Biomedical Applications. *Acta Phys. Pol. A* **2014**, *125*, 932–935.  
773 <https://doi.org/doi:10.12693/APhysPolA.125.932>.
- 774 34. Smolka, A.; Dercz, G.; Rodak, K.; Łosiewicz, B. Evaluation of Corrosion Resistance of Nanotubular Oxide Layers on the  
775 Ti13Zr13Nb Alloy in Physiological Saline Solution. *Arch. Metall. Mater.* **2015**, *60*, 2681–2686.  
776 <https://doi.org/doi:10.1515/amm-2015-0432>.
- 777 35. Stróż, A.; Dercz, G.; Chmiela, B.; Stróż, D.; Łosiewicz, B. Electrochemical Formation of Second Generation TiO<sub>2</sub> Nanotubes on  
778 Ti13Nb13Zr Alloy for Biomedical Applications. *Acta Phys. Pol. A.* **2016**, *130*, 1079–1080.  
779 <https://doi.org/doi:10.12693/APhysPolA.130.1079>.
- 780 36. Ainouche, L.; Hamadou, L.; Kadri, A.; Benbrahim, N.; Bradai, D. Interfacial Barrier Layer Properties of Three Generations of  
781 TiO<sub>2</sub> Nanotube Arrays. *Electrochim. Acta* **2014**, *133*, 597–609. <https://doi.org/doi:10.1016/j.electacta.2014.04.086>.
- 782 37. Panaitescu, E.; Richter, C.; Menon, L. A Study of Titania Nanotube Synthesis in Chloride-Ion-Containing Media. *J. Electrochem.*  
783 *Soc.* **2008**, *155*, E7. <https://doi.org/doi:10.1149/1.2800170>.
- 784 38. ASTM F756-17: *Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials*. ASTM International: West Conshohocken PA,  
785 USA, 2017.
- 786 39. ISO 10993-5:2009: *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Geneva, Switzerland, 2009.
- 787 40. Dhurat, R.; Sukesh, M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J.*  
788 *Cutan. Aesthet. Surg.* **2014**, *7*, 189–197. <https://doi.org/doi:10.4103/0974-2077.150734>.
- 789 41. Gawlikowski, M.; Major, R.; Mika, B.; Komorowski, D.; Janiczak, K.; Tkacz, E.; Tamulewicz, A.; Piaseczna, N. Semi-Quantitative  
790 Method of Assessing the Thrombogenicity of Biomaterials Intended for Long-Term Blood Contact. *Materials* **2023**, *16*, 38. <https://doi.org/10.3390/ma16010038>.
- 791 42. Handzlik, P.; Gutkowski, K. Synthesis of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy by the electrochemical method. *J. Porous Mater.*  
792 **2019**, *26*, 1631–1637. <https://doi.org/doi:10.1007/s10934-019-00759-1>.
- 793  
794  
795

- 796 43. Łosiewicz, B.; Skwarek, S.; Stróż, A.; Osak, P.; Dudek, K.; Kubisztal, J.; Maszybrocka, J. Production and Characterization of the  
797 Third-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Alloy. *Materials* **2022**, *15*, 2321. <https://doi.org/doi:10.3390/ma15062321>.
- 798 44. Łosiewicz, B.; Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Stach, S. Effect of Autoclaving Time on Corrosion Resistance of Sand-  
799 blasted Ti G4 in Artificial Saliva. *Materials* **2020**, *13*, 4154. <https://doi.org/doi:10.3390/ma13184154>.
- 800 45. Ossowska, A.; Sobieszczyk, S.; Supernak, M.; Zielinski, A. Morphology and properties of nanotubular oxide layer on the  
801 "Ti-13Zr-13Nb" alloy. *Surf. Coat. Technol.* **2014**, *258*, 1239–1248. <https://doi.org/doi:10.1016/j.surfcoat.2014.06.054>.
- 802 46. Suzuki, K.; Aoki, K.; Ohya, K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rab-  
803 bits. *Bone* **1997**, *21*, 507–514. [https://doi.org/doi:10.1016/s8756-3282\(97\)00204-4](https://doi.org/doi:10.1016/s8756-3282(97)00204-4).
- 804 47. Schmidt, C.; Kaspar, D.; Sarkar, M.R.; Claes, L.E.; Ignatius, A.A. A scanning electron microscopy study of human osteoblast  
805 morphology on five orthopedic metals. *J. Biomed. Mater.* **2002**, *63*, 252–261. <https://doi.org/doi:10.1002/jbm.10185>.
- 806 48. Biesinger, M.C.; Lau, L.W.M.; Gerson, A.R.; Smart, R.St.C. Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row tran-  
807 sition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, *257*, 887–898.  
808 <https://doi.org/doi:10.1016/j.apsusc.2010.07.086>.
- 809 49. Vikulova, E.S.; Karakovskaya, K.I.; Korolkov, I.V.; Koretskaya, T.P.; Chepeleva, E.V.; Kuz'min, N.B.; Fedorenko, A.D.; Pischur,  
810 D.P.; Gusel'nikova, T.Y.; Maksimovskii, E.A.; Marchenko, E.S.; Zheravin, A.A.; Morozova, N.B. Application of Biocompatible  
811 Noble Metal Film Materials to Medical Implants: TiNi Surface Modification. *Coatings* **2023**, *13*, 222.  
812 <https://doi.org/doi:10.3390/coatings13020222>.
- 813 50. Naumkin, A.V.; Kraut-Vass, A.; Gaarenstroom, S.W.; Powell, C.J. *NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database*, 2012.
- 814 51. Gondal, M.A.; Fasasi, T.A.; Baig, U.; Mekki, A. Effects of Oxidizing Media on the Composition, Morphology and Optical  
815 Properties of Colloidal Zirconium Oxide Nanoparticles Synthesized via Pulsed Laser Ablation in Liquid Technique. *J. Nanosci.*  
816 *Nanotechnol.* **2018**, *18*, 4030–4039. <https://doi.org/doi:10.1166/jnn.2018.15244>.
- 817 52. Kubisztal, J.; Łosiewicz, B.; Dybał, P.; Kozik, V.; Bąk, A. Water-Induced Corrosion Damage of Carbon Steel in  
818 Sulfolane. *Energies* **2020**, *13*, 4580. <https://doi.org/doi:10.3390/en13174580>.
- 819 53. Łosiewicz, B.; Osak, P.; Maszybrocka, J.; Kubisztal, J.; Bogunia, S.; Ratajczak, P.; Aniolek, K. Effect of Temperature on Electro-  
820 chemically Assisted Deposition and Bioactivity of CaP Coatings on CpTi Grade 4. *Materials* **2021**, *14*, 5081.  
821 <https://doi.org/doi:10.3390/ma14175081>.
- 822 54. Kubisztal, J.; Łosiewicz, B.; Dybał, P.; Kozik, V.; Bak, A. Temperature-Related Corrosion Resistance of AISI 1010 Carbon Steel in  
823 Sulfolane. *Materials* **2020**, *13*, 2563. <https://doi.org/doi:10.3390/ma13112563>.
- 824 55. Grigorescu, S.; Pruna, V.; Titorencu, I.; Jinga, V.V.; Mazare, A.; Schmuki, P.; Demetrescu, I. The two step nanotube formation on  
825 TiZr as scaffolds for cell growth. *Bioelectrochemistry* **2014**, *98*, 39–45. <https://doi.org/doi:10.1016/j.bioelechem.2014.03.002>.
- 826 56. Grigorescu, S.; Ungureanu, C.; Kirchgeorg, R.; Schmuki, P.; Demetrescu, I. Various sized nanotubes on TiZr for antibacterial  
827 surfaces. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, *270*, 190–196. <https://doi.org/doi:10.1016/j.apsusc.2012.12.165>.
- 828 57. Kulkarni, M.; Patil-Sen, Y.; Junkar, I.; Kulkarni, C.V.; Lorenzetti, M.; Igljič, A. Wettability studies of topologically distinct tita-  
829 nium surfaces. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2015**, *129*, 47–53. <https://doi.org/doi:10.1016/j.colsurfb.2015.03.024>.
- 830 58. Shin, D.H.; Shokuhfar, T.; Choi, C.K.; Lee, S.H.; Friedrich, C. Wettability changes of TiO<sub>2</sub> nanotube surfaces. *Nanotechnology*  
831 **2011**, *22*, 315704. <https://doi.org/doi:10.1088/0957-4484/22/31/315704>.
- 832 59. Brammer, K.S.; Oh, S.; Cobb, C.J.; Bjursten, L.M.; Heyde, H.; van der Jin, S. Improved bone-forming functionality on diame-  
833 ter-controlled TiO<sub>2</sub> nanotube surface. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 3215–3223. <https://doi.org/doi:10.1016/j.actbio.2009.05.008>.
- 834 60. Citeau, A.; Guicheux, J.; Vinatier, C.; Layrolle, P.; Nguyen, T.P.; Pilet, P.; Daculsi, G. In vitro biological effects of titanium rough  
835 surface obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials* **2005**, *26*,  
836 157–165. <https://doi.org/doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.033>.
- 837 61. Wang, N.; Li, H.; Lü, W.; Li, J.; Wang, J.; Zhang, Z.; Liu, Y. Effects of TiO<sub>2</sub> nanotubes with different diameters on gene expres-  
838 sion and osseointegration of implants in minipigs. *Biomaterials* **2011**, *32*,  
839 6900–6911. <https://doi.org/doi:10.1016/j.biomaterials.2011.06.023>.
- 840 62. Aninwene, G.E.I.; Yao, C.; Webster, T.J. Enhanced osteoblast adhesion to drug-coated anodized nanotubular titanium surfaces.  
841 *Int. J. Nanomedicine* **2008**, *3*, 257–264. <https://doi.org/doi:10.2147/ijn.s2552>.
- 842 63. Oh, S.; Daraio, C.; Chen, L.H.; Pisanic, T.R.; Fiñones, R.R.; Jin, S. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub>  
843 nanotubes. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *78A*, 97–103. <https://doi.org/doi:10.1002/jbm.a.30722>.
- 844 64. Bauer, S.; Pittrof, A.; Tsuchiya, H.; Schmuki, P. Size-effects in TiO<sub>2</sub> nanotubes: Diameter dependent anatase/rutile stabilization.  
845 *Electrochem. Commun.* **2011**, *13*, 538–541. <https://doi.org/doi:10.1016/j.elecom.2011.03.003>.
- 846 65. Shankland, N.; Wilson, C.C.; Florence, A.J.; Cox, P.J. Refinement of Ibuprofen at 100 K by Single-Crystal Pulsed Neutron Dif-  
847 fraction Connaent. *Acta Cryst.* **1997**, *C53*, 951–954. <https://doi.org/doi:10.1107/S0108270197003193>.
- 848 66. Bushra, R.; Aslam, N. An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen. *Oman Med. J.* **2010**, *25*,  
849 155–161. <https://doi.org/doi:10.5001/omj.2010.49>.
- 850 67. Al-Janabi, A.A. In vitro antibacterial activity of Ibuprofen and acetaminophen. *J. Glob. Infect. Dis.* **2010**, *2*, 105–108.  
851 <https://doi.org/doi:10.4103/0974-777X.62880>.
- 852 68. Zhao, P.; Liu, H.; Deng, H.; Xiao, L.; Qin, C.; Du, Y.; Shi, X. A study of chitosan hydrogel with embedded mesoporous silica  
853 nanoparticles loaded by ibuprofen as a dual stimuli-responsive drug release system for surface coating of titanium implants.  
854 *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, *123*, 657–663. <https://doi.org/doi:10.1016/j.colsurfb.2014.10.013>.

- 855 69. Ren, Z.; Romar, H.; Varila, T.; Xu, X.; Wang, Z.; Sillanpää, M.; Leiviskä, T. Ibuprofen degradation using a Co-doped carbon  
856 matrix derived from peat as a peroxymonosulphate activator. *Environ. Res.* **2021**, *193*,  
857 110564. <https://doi.org/doi:10.1016/j.envres.2020.110564>.
- 858 70. Jia, H.; Kerr, L.L. Sustained ibuprofen release using composite poly(lactic-co-glycolic acid)/titanium dioxide nanotubes from Ti  
859 implant surface. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 2341-2348. <https://doi.org/doi:10.1002/jps.23580>.
- 860 71. Jarosz, M.; Pawlik, A.; Szuwarzyński, M.; Jaskuła, M.; Sulka, G.D. Nanoporous anodic titanium dioxide layers as potential  
861 drug delivery systems: Drug release kinetics and mechanism. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *143*, 447-454. [https://doi.org/doi:](https://doi.org/doi:10.1016/j.colsurfb.2016.03.073)  
862 [10.1016/j.colsurfb.2016.03.073](https://doi.org/doi:10.1016/j.colsurfb.2016.03.073).
- 863 72. Oyetade, O.A.; Martincigh, B.S.; Skelton, A.A. The Interplay between Electrostatic and Hydrophobic Interactions in the  
864 pH-Dependent Adsorption of Ibuprofen onto Acid-Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes. *J. Phys. Chem. C.* **2018**, *122*,  
865 22556–22568. <https://doi.org/doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b06841>.
- 866 73. Kurtoglu, Y.E.; Mishra, M.K.; Kannan, S.; Kannan, R.M. Drug release characteristics of PAMAM dendrimer-drug conjugates  
867 with different linkers. *Int. J. Pharm.* **2010**, *384*, 189-194. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.017>.
- 868 74. Saravanan, M.; Bhaskar, K.; Srinivasa Rao, G.; Dhanaraju, M.D. Ibuprofen-loaded ethylcellulose/polystyrene microspheres: an  
869 approach to get prolonged drug release with reduced burst effect and low ethylcellulose content. *J. Microencapsul.* **2003**, *20*,  
870 289-302. <https://doi.org/doi:10.1080/0265204031000093087>.
- 871

872 **Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual  
873 author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury  
874 to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

---

## ***VI. Oświadczenia współautorów***



Dr Katarzyna Balin

Chorzów, 29.06.2023

Instytut Fizyki  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Łosiewicz B., Zubko M., Chmiela B., Balin K., Dercz G., Gawlikowski M., Goryczka T., *"Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications"*, in: *Materials Characterization*, Vol.132, DOI:10.1016/j.matchar.2017.09.004, ISSN 10445803, 2017, 363-372, mój udział polegał na: wykonaniu pomiarów techniką XPS (spektroskopia fotoelektronów wzbudzanych promieniowaniem rentgenowskim), przeprowadzeniu analiz uzyskanych wyników i przygotowaniu tekstu opisującego wyniki badania tą metodą.

  
.....  
Podpis

Dr Katarzyna Balin

Chorzów, 29.06.2023

Instytut Fizyki  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A, Gawlikowski M, Balin K, Osak P, Kubisztal J, Zubko M, Maszybrocka J, Dudek K, Łosiewicz B. Biological activity and thrombogenic properties of oxide nanotubes on the Ti-13Nb-13Zr biomedical alloy. *J. Func. Biomater.*, 2023

mój udział polegał na wykonaniu pomiarów techniką XPS (spektroskopia fotoelektronów wzbudzanych promieniowaniem rentgenowskim), przeprowadzeniu analiz uzyskanych wyników i przygotowaniu tekstu opisującego wyniki badania tą metodą

  
.....  
Podpis



dr Bartosz Chmiela

Katowice, 12.06.2023

Katedra Technologii Materiałowych  
Wydział Inżynierii Materiałowej  
Politechnika Śląska  
ul. Krasińskiego 8, 40-019 Katowice

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Dercz G., Chmiela B., Stróż D., Losiewicz B. „*Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for biomedical applications*”  
in: Acta Physica Polonica A, Vol. 130, No. 4, 1079-1080;  
DOI:10.12693/APhysPolA.130.1079, ISSN 05874246, 2016 mój udział polegał na:  
wykonaniu badań strukturalnych za pomocą elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM).



Podpis

dr inż. Bartosz Chmiela

Katowice, 12.06.2023

Katedra Technologii Materiałowych  
Wydział Inżynierii Materiałowej  
Politechnika Śląska w Katowicach  
ul. Krasińskiego 8, 40-019 Katowice

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Łosiewicz B., Zubko M., Chmiela B., Balin K., Dercz G., Gawlikowski M., Goryczka T., *"Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications"*, in: Materials Characterization, Vol.132, DOI:10.1016/j.matchar.2017.09.004, ISSN 10445803, 2017, 363-372, mój udział polegał na: wykonaniu badań strukturalnych za pomocą elektronicznej mikroskopii skaningowej (SEM).

  
.....  
Podpis

dr Bartosz Chmiela

Katowice, 12.06.2023

Katedra Technologii Materiałowych  
Wydział Inżynierii Materiałowej  
Politechnika Śląska  
ul. Krasińskiego 8, 40-019 Katowice

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., G. Dercz, B., Chmiela, B. Łosiewicz, "*Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy with potential use as bone implant*" in: AIP Conference Proceedings, DOI:10.1063/1.5094314, ISSN 0094243X, 2019, mój udział polegał na: wykonaniu badań strukturalnych za pomocą elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM).



.....  
Podpis

Katedra Technologii Materiałowych  
Wydział Inżynierii Materiałowej  
Politechnika Śląska  
ul. Krasińskiego 8, 40-019 Katowice

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Luxbacher T., Dudek K., Chmiela B., Osak P., Łosiewicz B., "In Vitro Bioelectrochemical Properties of Second-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Biomedical Alloy" in: *Materials*, vol. 16, DOI: 10.3390/ma16041408, ISSN19961944, 2023, mój udział polegał na: wykonaniu badań strukturalnych za pomocą elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM).

  
.....  
Podpis



Dr hab. Grzegorz Dercz prof. UŚ,

Chorzów, 20.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., G. Dercz, B., Chmiela, B. Losiewicz, "Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy with potential use as bone implant" in: AIP Conference Proceedings, DOI:10.1063/1.5094314, ISSN 0094243X, 2019, mój udział polegał na wykonaniu badań XRD oraz dostarczenia podłoża w postaci stopu Ti13Nb13Zr.

Podpis



Dr hab. Grzegorz Dercz prof. UŚ.


Chorzów, 20.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Dercz G., Chmiela B., Stróż D., Łosiewicz B. „*Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for biomedical applications*” in: Acta Physica Polonica A, Vol. 130, No. 4, 1079-1080; DOI:10.12693/APhysPolA.130.1079, ISSN 05874246, 2016 mój udział polegał na wykonaniu badań XRD oraz dostarczenia podłoża w postaci stopu Ti13Nb13Zr.



.....  
Podpis





Dr hab. Grzegorz Dercz prof. UŚ,

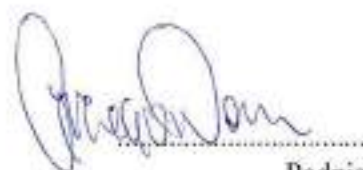
Chorzów, 20.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Smółka A., Rodak K., Dercz G., Simka W., Dudek K., Łosiewicz B., *"Electrochemical Formation of self-organized nanotubular oxide layers on Ti13Zr13Nb alloy for biomedical applications"*, in: Acta Physica Polonica A, Vol.125, No.4 DOI:10.12693/APhysPolA.125.932, ISSN 05874246, 2014, mój udział polegał na wykonaniu badań XRD oraz dostarczenia podłoża w postaci stopu Ti13Nb13Zr.



Podpis



Dr hab. Grzegorz Dercz prof. US.


Chorzów, 20.06.2023r.

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Łosiewicz B., Zubko M., Chmiela B., Balin K., Dercz G., Gawlikowski M., Goryczka T., *'Characterization and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications'*, in: Materials Characterization, Vol.132, DOI:10.1016/j.matchar.2017.09.004, ISSN 10445803, 2017, 363-372, mój udział polegał na wykonaniu części badań XRD oraz dostarczenia podłoża w postaci stopu Ti13Nb13Zr.



Podpis



Dr hab. Grzegorz Dercz prof. UŚ,

Chorzów, 20.06.2023r.

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Dercz G., Chmiela B., Stróż D., Losiewicz B. „*Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for biomedical applications*” in: *Acta Physica Polonica A*, Vol. 130, No. 4, 1079-1080; DOI:10.12693/APhysPolA.130.1079, ISSN 05874246, 2016 mój udział polegał na wykonaniu badań XRD oraz dostarczenia podłoża w postaci stopu Ti13Nb13Zr.

Podpis





Łukasiewicz  
ICiMB

dr inż. Karolina Dudek  
Sieć Badawcza Łukasiewicz  
Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych  
Centrum Materiałów Ogniotrwałych  
ul. Toszecka 99, 44-100 Gliwice

Gliwice, 22.05.2023

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Luxbacher T., Dudek K., Chmiela B., Osak P., Losiewicz B., "*In Vitro Bioelectrochemical Properties of Second-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Biomedical Alloy*" in: *Materials*, vol. 16, DOI: 10.3390/ma16041408, ISSN19961944, 2023, mój udział polegał na:

Preparatyce próbek do pomiarów SEM, wykonaniu pomiarów SEM, analizie i interpretacji wyników

Podpis



Łukasiewicz  
ICIMB

dr inż. Karolina Dudek  
Sieć Badawcza Łukasiewicz  
Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych  
Centrum Materiałów Ogniotrwałych  
ul. Toszecka 99, 44-100 Gliwice

Gliwice, 22.05.2023

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Maszybrocka J., Goryczka T., Dudek K., Osak P., Losiewicz B., "*Influence of Anodizing Conditions on Biotribological and Micromechanical Properties of Ti-13Zr-13Nb Alloy*" in: *Materials*, vol.16, DOI: 10.3390/ma16031237, ISSN 19961944, 2023, mój udział polegał na:

Preparatyce próbek do pomiarów SEM, wykonaniu pomiarów SEM, analizie i interpretacji wyników

Podpis



dr inż. Karolina Dudek  
Sieć Badawcza Łukasiewicz  
Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych  
Centrum Materiałów Ogniotrwałych  
ul. Toszecka 99, 44-100 Gliwice

Gliwice, 22.05.2023

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Łosiewicz B., Skwarek S., Stróż A., Osak P., Dudek K., Kubisztal J., Maszybrocka J., *"Production and Characterization of the Third-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Alloy"*, in: *Materials*, vol. 15, DOI: 10.3390/ma15062321, ISSN 19961944, 2022, mój udział polegał na:

Preparatyce próbek do pomiarów SEM, wykonaniu pomiarów SEM, analizie i interpretacji wyników

  
.....  
Podpis



Łukasiewicz  
ICiMB

dr inż. Karolina Dudek  
Sieć Badawcza Łukasiewicz  
Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych  
Centrum Materiałów Ogniotrwałych  
ul. Toszecka 99, 44-100 Gliwice

Gliwice, 22.05.2023

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Smolka A., Rodak K., Dercz G., Simka W., Dudek K., Losiewicz B., "*Electrochemical Formation of self-organized nanotubular oxide layers on Ti13Zr13Nb alloy for biomedical applications*", in: Acta Physica Polonica A, Vol.125, No.4 DOI:10.12693/APhysPolA.125.932, ISSN 05874246, 2014, mój udział polegał na :

Wykonaniu pomiarów AFM, analizie wyników i wizualizacji danych

Podpis



Dr inż. Maciej Gawlikowski

Zabrze, 28.06.2023 r.

Katedra Biosensorów i  
Przetwarzania Sygnałów Biomedycznych  
Wydział Inżynierii Materiałowej  
Politechnika Śląska  
ul. Roosevelta 40  
41-800 Zabrze

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A, Gawlikowski M, Balin K, Osak P, Kubieźtal J, Zubko M, Maszybrocka J, Dudek K, Losiewicz B. Biological activity and thrombogenic properties of oxide nanotubes on the Ti-13Nb-13Zr biomedical alloy. *J. Func. Biomater.*, 2023  
mój udział polegał na: przeprowadzaniu badań oceny trombogenności otrzymanych materiałów oraz analizie wyników.

Maciej Gawlikowski  
28.06.2023 Podpis





Dr inż. Maciej Gawlikowski

Zabrze, 13/06/2023

Katedra Biosensorów i  
Przetwarzania Sygnałów Biomedycznych  
Wydział Inżynierii Materiałowej  
Politechnika Śląska  
ul. Roosevelta 40  
41-800 Zabrze

oraz

Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii im. prof. Zbigniewa Religi  
ul. Wolności 345a  
41-800 Zabrze

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Łosiewicz B., Zubko M., Chmiela B., Balin K., Dercz G., Gawlikowski M., Goryczka T. "*Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications*", in: Materials Characterization, Vol.132, DOI:10.1016/j.matchar.2017.09.004, ISSN 10445803, 2017, 363-372, mój udział polegał na: wykonaniu pomiaru hemolizy wytworzonych materiałów.



Z-CADREKTORA INSTYTUTU  
PROTEZ SERCA I NAUKOWYCH

dr inż. Maciej Gawlikowski

Dr hab. Tomasz Goryczka, prof. UŚ.


Chorzów, 28.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Łosiewicz B., Zubko M., Chmiela B., Balin K., Dercz G., Gawlikowski M., Goryczka T. "*Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications*", in: *Materials Characterization*, Vol.132, DOI:10.1016/j.matchar.2017.09.004, ISSN 10445803, 2017, 363-372, mój udział polegał na: przeprowadzeniu badań rentgenowskich techniką stałego kąta padania wiązki pierwotnej oraz interpretacji wyników.



.....  
Podpis



Dr hab. Tomasz Goryczka prof. UŚ.

Chorzów, 28 maj 2023r.

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Maszybrocka J., Goryczka T., Dudek K., Osak P., Łosiewicz B., *"Influence of Anodizing Conditions on Biotribological and Micromechanical Properties of Ti-13Zr-13Nb Alloy"* in: *Materials*, vol.16, DOI: 10.3390/ma16031237, ISSN 19961944, 2023, mój współudział polegał na: interpretacji korelacji pomiędzy strukturą ONT a właściwościami tribologicznymi.

  
.....  
Podpis



Dr Julian Kubisztal

Chorzów, 25.05.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Łosiewicz B., Stróż A., Kubisztal J., Osak P., Zubko M., "EIS and LEIS Study on In Vitro Corrosion Resistance of Anodic Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Alloy in Saline Solution" in: Coatings, 13(5), DOI: 10.3390/coatings13050875, 2023, mój udział polegał na: wykonaniu metodami LEIS i SVET map rozkładu modułu impedancji i prądu jonowego nad powierzchnią badanych materiałów oraz interpretacji otrzymanych wyników.

Podpis



Dr Julian Kubisztal

Chorzów, 25.05.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Łosiewicz B., Skwarek S., Stróż A., Osak P., Dudek K., Kubisztal J., Maszybrocka J.,  
*"Production and Characterization of the Third-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Alloy"*, in: *Materials*, vol. 15, DOI: 10.3390/ma15062321, ISSN 19961944, 2022, mój udział polegał na: wykonaniu metodą SKP map rozkładu napięcia kontaktowego na powierzchni badanych materiałów i liniowych skanów topografii powierzchni oraz interpretacji otrzymanych wyników.

  
Podpis



Dr Julian Kubisztal

Chorzów, 29.06.2023

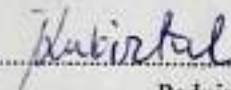
Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A, Gawlikowski M, Balin K, Osak P, Kubisztal J, Zubko M, Maszybrocka J, Dudek K, Łosiewicz B. Biological activity and thrombogenic properties of oxide nanotubes on the Ti-13Nb-13Zr biomedical alloy. *J. Func. Biomater.*, 2023

mój udział polegał na: wykonaniu metoda SKP map rozkładu napięcia kontaktowego na powierzchni badanych materiałów oraz interpretacji otrzymanych wyników.

  
Podpis

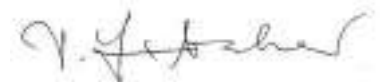
Dr. Thomas Luxbacher  
Principal Scientist  
Surface Charge and Zeta-Potential  
Anton Paar GmbH  
Anton-Paar-Str. 20  
8054 Graz Austria

date: June 16, 2023

## Declaration

I declare that in the work:

Stróż A., Luxbacher T., Dudek K., Chmiela B., Osak P., Łosiewicz B., "*In Vitro Bioelectrochemical Properties of Second-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Biomedical Alloy*" in: *Materials*, vol. 16, DOI: 10.3390/ma16041408, ISSN19961944, 2023, my contribution was as follows: Zeta potential measurements for the tested materials and analysis of results.



.....  
signature



Dr hab. Bożena Łosiewicz, prof. UŚ

Chorzów, dn. 15.06.2023 r.

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A, Dercz G, Chmiela B, Łosiewicz B. Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy with potential use as bone implant. *AIP Conf. Proc.*, 2019, 2083, 030004-1–030004-5. DOI:10.1063/1.5094314

mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji badań, dyskusji wyników i przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu.

Podpis





Dr hab. Bożena Łosiewicz, prof. UŚ

Chorzów, dn. 15.06.2023 r.

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Łosiewicz B, Stróż A, Kubisztal J, Osak P, Zubko M. EIS and LEIS study on in vitro corrosion resistance of anodic oxide nanotubes on Ti-13Zr-13Nb alloy in saline solution. *Coatings*, 2023, 13(5), 875. DOI:10.3390/coatings13050875

mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji badań, interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu.

Podpis



Dr hab. Bożena Łosiewicz, prof. UŚ

Chorzów, dn. 15.06.2023 r.

Institut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Smolka A, Rodak K, Dercz G, Dudek K, Łosiewicz B. Electrochemical formation of self-organized nanotubular oxide layers on Ti13Zr13Nb alloy for biomedical applications. *Acta Phys. Pol.*, 2014, 125(4), 932-935. DOI:10.12693/APhysPolA.125.932

mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji badań, dyskusji wyników i przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu.

  
Podpis



Dr hab. Bożena Łosiewicz, prof. UŚ

Chorzów, dn. 15.06.2023 r.

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Smolka A, Dercz G, Rodak K, Łosiewicz B. Evaluation of corrosion resistance of nanotubular oxide layers on the Ti<sub>13</sub>Zr<sub>13</sub>Nb alloy in physiological saline solution. *Arch. Metall. Mater.*, 2015, 60(4), 2681-2686. DOI:10.1515/amm-2015-0432

mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji badań, dyskusji wyników i przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu.

Podpis



Dr hab. Bożena Łosiewicz, prof. UŚ

Chorzów, dn. 15.06.2023 r.

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A, Dercz G, Chmiela B, Stróż D, Łosiewicz B. Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr alloy for biomedical applications. *Acta Phys. Pol.*, 2016, 130(4), 1079-1080. DOI:10.12693/APhysPolA.130.1079

mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji badań, dyskusji wyników i przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu.

Podpis



Dr hab. Bożena Łosiewicz, prof. UŚ

Chorzów, dn. 15.06.2023 r.

Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A, Luxbacher T, Dudek K, Chmiela B, Osak P, Łosiewicz B. In vitro bioelectrochemical properties of second-generation oxide nanotubes on Ti-13Zr-13Nb biomedical alloy. *Materials*, 2023, 16(4), 1408. DOI: 10.3390/ma16041408

mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji badań, dyskusji wyników i przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu.

Podpis



Dr hab. Bożena Łosiewicz, prof. UŚ

Chorzów, dn. 15.06.2023 r.

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Łosiewicz B, Skwarek S, Stróż A, Osak P, Dudek K, Kubisztal J, Maszybrocka J.  
Production and characterization of the third-generation oxide nanotubes on Ti-13Zr-  
13Nb alloy. *Materials*, 2022, 15(6), 2321. DOI:10.3390/ma15062321

mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu przyspieszonych badań korozyjnych w atmosferze obojętnej mgły solnej, interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu.

Podpis





Dr hab. Bożena Łosiewicz, prof. UŚ

Chorzów, dn. 15.06.2023 r.

Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A, Łosiewicz B, Zubko M, Chmiela B, Balin K, Dercz G, Gawlikowski M, Goryczka T.  
Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr  
alloy for medical applications. *Mater. Charact.*, 2017, 132, 363-372.  
DOI:10.1016/j.matchar.2017.09.004

mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji badań, dyskusji wyników i przygotowaniu  
końcowej wersji manuskryptu.

Podpis



Dr hab. Bożena Łosiewicz, prof. UŚ

Chorzów, dn. 15.06.2023 r.

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A, Maszybrocka J, Goryczka T, Dudek K, Osak P, Łosiewicz B. Influence of anodizing conditions on biotribological and micromechanical properties of Ti-13Zr-13Nb alloy. *Materials*, 2023, 16(3), 1237. DOI:10.3390/ma16031237

mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji badań, dyskusji wyników i przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu.

Podpis



Dr hab. Bożena Łosiewicz, prof. UŚ.

Chorzów, dn. 11.07.2023 r

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A, Gawlikowski M, Balin K, Osak P, Kubisztal J, Zubko M, Maszybrocka J, Dudek K, Łosiewicz B. Biological activity and thrombogenic properties of oxide nanotubes on the Ti-13Nb-13Zr biomedical alloy., *J. Func. Biomater.*, 2023

mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji badań, dyskusji wyników i przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu.

*Bożena Łosiewicz*

.....  
Podpis



Dr Joanna Maszybrocka

Chorzów, 01/06/2023

Institut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Łosiewicz B., Skwarek S., Stróż A., Osak P., Dudek K., Kubisztal J., Maszybrocka J.,  
*"Production and Characterization of the Third-Generation Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb  
Alloy"*, in: *Materials*, vol. 15, DOI: 10.3390/ma15062321, ISSN 19961944, 2022, mój  
udział polegał na: przeprowadzeniu pomiarów chropowatości badanego materiału wraz z  
analiza wyników.

  
.....  
Podpis



Dr Joanna Maszybrocka

Chorzów,

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Maszybrocka J., Goryczka T., Dudek K., Osak P., Łosiewicz B., "Influence of Anodizing Conditions on Biotribological and Micromechanical Properties of Ti-13Zr-13Nb Alloy" in: *Materials*, vol.16, DOI: 10.3390/ma16031237, ISSN 19961944, 2023, mój udział polegał na: pomiarach biotribologicznych otrzymanych materiałów, wyznaczeniu parametrów chropowatości oraz analizie wyników.

  
Podpis



Dr inż. Patrycja Osak

Chorzów, dn. 13.06.2023 r.

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A, Maszybrocka J, Goryczka T, Dudek K, Osak P, Łosiewicz B. Influence of anodizing conditions on biotribological and micromechanical properties of Ti-13Zr-13Nb alloy. *Materials*, 2023, 16(3), 1237. DOI:10.3390/ma16031237

mój udział polegał na: edycji i interpretacji wyników badań biotribologicznych oraz współudziale w przygotowaniu manuskryptu.

  
Podpis



Dr inż. Patrycja Osak

Chorzów, dn. 13.06.2023 r.

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Łosiewicz B, Skwarek S, Stróż A, Osak P, Dudek K, Kubisztal J, Maszybrocka J.  
Production and characterization of the third-generation oxide nanotubes on Ti-13Zr-  
13Nb alloy. *Materials*, 2022, 15(6), 2321. DOI:10.3390/ma15062321

mój udział polegał na: współudziale w przeprowadzeniu przyspieszonych badań  
korozyjnych w atmosferze obojętnej mgły solnej, dyskusji wyników i przygotowaniu  
końcowej wersji manuskryptu.

  
.....  
Podpis





Dr inż. Patrycja Osak

Chorzów, dn. 13.06.2023 r.

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A, Luxbacher T, Dudek K, Chmiela B, Osak P, Łosiewicz B. In vitro bioelectrochemical properties of second-generation oxide nanotubes on Ti-13Zr-13Nb biomedical alloy. *Materials*, 2023, 16(4), 1408. DOI: 10.3390/ma16041408

mój udział polegał na: współudziale w przeprowadzeniu badań odporności korozyjnej in vitro i dyskusji wyników oraz współudziale w przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu.

*Osak Patrycja*  
.....  
Podpis





Dr inż. Patrycja Osak

Chorzów, dn. 13.06.2023 r.

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Łosiewicz B, Stróż A, Kubisztal J, Osak P, Zubko M. EIS and LEIS study on in vitro corrosion resistance of anodic oxide nanotubes on Ti-13Zr-13Nb alloy in saline solution. *Coatings*, 2023, 13(5), 875. DOI:10.3390/coatings13050875

mój udział polegał na: przeprowadzeniu badań metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera i interpretacji wyników, współudziale w przeprowadzeniu badań odporności korozyjnej i dyskusji wyników oraz współudziale w przygotowaniu końcowej wersji manuskryptu.

*Osak Patrycja*  
.....  
Podpis

dr hab. inż. Kinga Rodak prof. Pol. Śl.

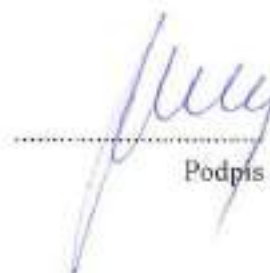
Katowice, 24/05/2023

Katedra Technologii Materiałowych  
Wydział Inżynierii Materiałowej  
Politechnika Śląska w Katowicach  
ul. Krasńskiego 8, 40-019 Katowice

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Smołka A., Dercz G., Rodak K., Łosiewicz B., *"Evaluation of corrosion resistance of nanotubular oxide layers on the Ti13Zr13Nb alloy in physiological saline solution"* ;  
in: Archives of Metallurgy and Materials, vol. 60, 2681-2686 DOI: 10.1515/amm-2015-0432, 2015, mój udział polegał na wykonaniu analizy morfologii otrzymanych próbek z wykorzystaniem skaningowo-transmisyjnego mikroskopu elektronowego (STEM).



.....  
Podpis



dr hab. inż. Kinga Rodak prof. Pol. Śl.

Katowice, 24/05/2023

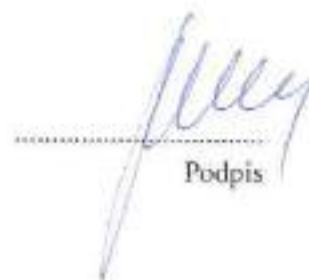
Katedra Technologii Materiałowych  
Wydział Inżynierii Materiałowej  
Politechnika Śląska w Katowicach  
ul. Krasińskiego 8, 40-019 Katowice

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Smolka A., Rodak K., Dercz G., Simka W., Dudek K., Losiewicz B., "*Electrochemical Formation of self-organized nanotubular oxide layers on Ti13Zr13Nb alloy for biomedical applications*", in: Acta Physica Polonica A, Vol.125, No.4

DOI:10.12693/APhysPolA.125.932, ISSN 05874246, 2014, mój udział polegał na: wykonaniu analizy morfologii oraz składu chemicznego uzyskanych próbek z wykorzystaniem skaningowo-transmisyjnego mikroskopu elektronowego (STEM).



Podpis

mgr inż. Agnieszka Stróż

Chorzów, 26.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Smołka A., Rodak K., Dercz G., Dudek K., Łosiewicz B., *“Electrochemical formation of self-organized nanotubular oxide layers on Ti13Zr13Nb alloy for biomedical applications”*, in: Acta Physica Polonica A, Vol.125, No.4 DOI:10.12693/APhysPolA.125.932, ISSN 05874246, 2014, mój udział polegał na : wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 2G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, analizie i dyskusji wyników oraz przygotowaniu tekstu publikacji.



Podpis

mgr inż. Agnieszka Stróż

Chorzów, 26.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Smołka A., Dercz G., Rodak K., Łosiewicz B., *"Evaluation of corrosion resistance of nanotubular oxide layers on the Ti<sub>13</sub>Zr<sub>13</sub>Nb alloy in physiological saline solution"* ; in: Archives of Metallurgy and Materials, vol. 60, 2681-2686 DOI: 10.1515/amm-2015-0432, 2015, mój udział polegał na: wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 2G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, wykonaniu pomiarów odporności korozyjnej, opracowaniu uzyskanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.



.....  
Podpis



mgr inż. Agnieszka Stróż

Chorzów, 26.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Dercz G., Chmiela B., Stróż D., Łosiewicz B. „*Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti<sub>13</sub>Nb<sub>13</sub>Zr alloy for biomedical applications*” in: Acta Physica Polonica A, Vol. 130, No. 4, 1079-1080; DOI:10.12693/APhysPolA.130.1079, ISSN 05874246, 2016 mój udział polegał na: wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 2G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, opracowaniu uzyskanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.



Podpis

mgr inż. Agnieszka Stróż

Chorzów, 26.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Łosiewicz B., Zubko M., Chmiela B., Balin K., Dercz G., Gawlikowski M., Goryczka T., "*Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications*", in: *Materials Characterization*, Vol.132, DOI:10.1016/j.matchar.2017.09.004, ISSN 10445803, 2017, 363-372, mój udział polegał na wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 3G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, wykonaniu pomiarów odporności korozyjnej, opracowaniu uzyskanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.



.....  
Podpis

mgr inż. Agnieszka Stróż

Chorzów, 28.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., G. Dercz, B., Chmiela, B. Łosiewicz, "*Electrochemical synthesis of oxide nanotubes on biomedical Ti13Nb13Zr alloy with potential use as bone implant*" in: AIP Conference Proceedings, DOI:10.1063/1.5094314, ISSN 0094243X, 2019, mój udział polegał na: wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 1G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, interpretacji uzyskanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.



Podpis

mgr inż. Agnieszka Stróż

Chorzów, 26.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Łosiewicz B., Skwarek S., Stróż A., Osak P., Dudek K., Kubisztal J., Maszybrocka J.,  
"Production and characterization of the third-generation oxide nanotubes on Ti-13Zr-13Nb alloy",  
in: Materials, vol. 15, DOI: 10.3390/ma15062321, ISSN 19961944, 2022, mój udział polegał  
na: wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 3G, opracowaniu metodologii  
badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, współudziale w przeprowadzonych  
badaniach chropowatości powierzchni, opracowaniu uzyskanych wyników  
i współudziale w przygotowaniu tekstu publikacji.



Podpis



mgr inż. Agnieszka Stróż

Chorzów, 26.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Maszybrocka J., Goryczka T., Dudek K., Osak P., Łosiewicz B., "*Influence of anodizing conditions on biotribological and micromechanical properties of Ti-13Zr-13Nb alloy*" in: *Materials*, vol.16, DOI: 10.3390/ma16031237, ISSN 19961944, 2023, mój udział polegał na wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 1G, 2G, 3G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, współudziale w badaniach mikromechanicznych i biotribologicznych, interpretacji otrzymanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.



.....  
Podpis

mgr inż. Agnieszka Stróż

Chorzów, 26.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Łosiewicz B., Stróż A., Kubisztal J., Osak P., Zubko M., "EIS and LEIS Study on In Vitro Corrosion Resistance of Anodic Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Alloy in Saline Solution" in: *Coatings*, 13(5), DOI: 10.3390/coatings13050875, 2023, mój udział polegał na: wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 1G, współudziale w przeprowadzeniu badań odporności korozyjnej, analizie i dyskusji wyników oraz przygotowaniu tekstu publikacji.



Podpis

mgr inż. Agnieszka Stróż

Chorzów, 26.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A, Gawlikowski M, Balin K, Osak P, Kubisztal J, Zubko M, Maszybrocka J, Dudek K, Łosiewicz B. Biological activity and thrombogenic properties of oxide nanotubes on the Ti-13Nb-13Zr biomedical alloy. *J. Func. Biomater.*, 2023 mój udział polegał na: wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 1G, 2G, 3G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, współudziale w przeprowadzonych badaniach, interpretacji otrzymanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.



Podpis

mgr inż. Agnieszka Stróż

Chorzów, 26.06.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Luxbacher T., Dudek K., Chmiela B., Osak P., Łosiewicz B., "In Vitro bioelectrochemical properties of second-generation oxide nanotubes on Ti-13Zr-13Nb biomedical alloy" in: *Materials*, vol. 16, DOI: 10.3390/ma16041408, ISSN19961944, 2023, mój udział polegał na: wytworzeniu materiału badań w postaci warstw NT 2G, opracowaniu metodologii badań, kierowaniu całością prac eksperymentalnych, współudziale w przeprowadzonych badaniach korozyjnych, opracowaniu uzyskanych wyników i przygotowaniu tekstu publikacji.



.....  
Podpis



Prof. dr hab. Danuta Stróż

Chorzów, 13/06/2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Dercz G., Chmiela B., Stróż D., Łosiewicz B. „*Electrochemical formation of second generation TiO<sub>2</sub> nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for biomedical applications*” in: *Acta Physica Polonica A*, Vol. 130, No. 4, 1079-1080;  
DOI:10.12693/APhysPolA.130.1079, ISSN 05874246, 2016 mój udział polegał na współudziale w opracowaniu publikacji.

.....  
Podpis



dr Maciej Zubko, prof. UŚ.

Chorzów, 22 maja 2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Łosiewicz B., Stróż A., Kubisztal J., Osak P., Zubko M., "EIS and LEIS Study on In Vitro Corrosion Resistance of Anodic Oxide Nanotubes on Ti-13Zr-13Nb Alloy in Saline Solution" in: Coatings, 13(5), DOI: 10.3390/coatings13050875, 2023, mój udział polegał na przeprowadzaniu badań materiałowych z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej wraz z opisem otrzymanych wyników.

  
.....  
Podpis

Dr Maciej Zubko, prof. UŚ.

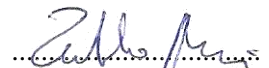
Chorzów, 22.05.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A., Łosiewicz B., Zubko M., Chmiela B., Balin K., Dercz G., Gawlikowski M., Goryczka T. "*Production, structure and biocompatible properties of oxide nanotubes on Ti13Nb13Zr alloy for medical applications*", in: *Materials Characterization*, Vol.132, DOI:10.1016/j.matchar.2017.09.004, ISSN 10445803, 2017, 363-372, mój udział polegał na przeprowadzeniu badań materiałów z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej wraz z opisem otrzymanych wyników.



Podpis

Dr Maciej Zubko, prof. UŚ.

Chorzów, 10.07.2023

Instytut Inżynierii Materiałowej  
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. 75 Pułku Piechoty 1A  
41-500 Chorzów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Stróż A, Gawlikowski M, Balin K, Osak P, Kubisztal J, Zubko M, Maszybrocka J, Dudek K, Łosiewicz B. Biological activity and thrombogenic properties of oxide nanotubes on the Ti-13Nb-13Zr biomedical alloy. *J. Func. Biomater.*, 2023 mój udział polegał na: przeprowadzeniu badań materiałowych z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej wraz z opisem otrzymanych wyników.



Podpis