

UNESP - Universidade Estadual Paulista
FC - Faculdade de Ciências - Câmpus de Bauru
Departamento de Física - Física de Materiais

MILENA YUMI KASAMA NAKATA

**FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE TiO_2 POROSAS PELA ESTRATÉGIA
DE IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

Bauru
2023

UNESP - Universidade Estadual Paulista
FC - Faculdade de Ciências - Câmpus de Bauru
Departamento de Física - Física de Materiais

MILENA YUMI KASAMA NAKATA

**Funcionalização de Superfícies de TiO_2 Porosas pela Estratégia de Imobilização
Covalente de Peptídeos Antimicrobianos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito para obtenção de título de
Bacharel em Física de Materiais pela
Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Orientador: Profº Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho

Bauru
2023

N163f

Nakata, Milena Yumi Kasama

Funcionalização de Superfícies de TiO₂ Porosas pela Estratégia de Imobilização Covalente de Peptídeos Antimicrobianos / Milena Yumi Kasama Nakata. -- Bauru, 2023

21 p. : tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Física) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências,
Bauru

Orientador: Paulo Noronha Lisboa Filho

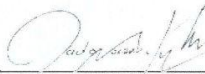
1. Titânio. 2. Biomaterial. 3. micro arc-oxidation (MAO). 4. NaOH.
5. Caracterização de Superfícies. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências, Bauru. Dados fornecidos pelo autor(a).

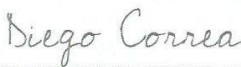
Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

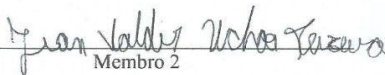
Aos 13 dias do mês de fevereiro de 2023, às 14h00, em sessão pública em formato presencial/virtual via Google Meet, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Prof. Titular Paulo Noronha Lisboa Filho e composta pelos examinadores Prof. Dr. Diego Rafael Nespeque Correa e Eng. MSc Jean Valdir Uchoa Teixeira, a aluna Milena Yumi Kasama Nakata apresentou o trabalho de conclusão de curso intitulado: "Funcionalização de Superfícies de TiO₂ Porosas pela Estratégia de Imobilização Covalente de Peptídeos Antimicrobianos", como requisito curricular indispensável para a integralização do curso de Física – Bacharelado em Física de Materiais. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao aluno e demais presentes e eu, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais examinadores e pelo aluno.



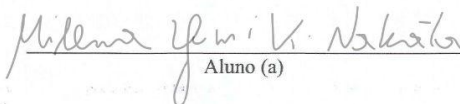
Orientador



Membro 1



Membro 2



Aluno (a)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - MEV 500X das amostras de MAO (controle) e após diferentes tempos de imersão (4, 16 e 24h) em NaOH 5M, a 60°C.....	12
Figura 2 - MEV 1000X das amostras de MAO (controle) e após diferentes tempos de imersão (4, 16 e 24h) em NaOH 5M, a 60°C.....	13
Figura 3 - MEV 2000X das amostras de MAO (controle) e após diferentes tempos de imersão (4, 16 e 24h) em NaOH 5M, a 60°C.....	13
Figura 4 - MEV 4000X das amostras de MAO (controle) e após diferentes tempos de imersão (4, 16 e 24h) em NaOH 5M, a 60°C.....	14
Figura 5 - AFM da amostra de MAO <i>Control</i>	14
Figura 6 - AFM da amostra de MAO após 4h de imersão em NaOH 5M, a 60°C.....	15
Figura 7 - AFM da amostra de MAO após 16h de imersão em NaOH 5M, a 60°C.....	15
Figura 8 - AFM da amostra de MAO após 24h de imersão em NaOH 5M, a 60°C.....	16
Figura 9 - DRX em todas as amostras de MAO analisadas.....	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - EDS MAO <i>control</i>	17
--	----

Resumo

A indústria biomédica atual utiliza o titânio metálico e suas ligas com um tipo de superfície para realizar implantes em tecido humano. Porém, ainda há dúvidas quanto a compatibilidade entre o material e o corpo. Principalmente, por causa do contato direto da peça com o material biológico. Assim, ocorrem estudos sobre os resultados quando o titânio tem um filme de peptídeos antimicrobianos (AMPs), com o objetivo de alterar as características do metal, que estão ligadas com a biocompatibilidade. O objetivo central do trabalho é, utilizando a técnica de *micro arc-oxidation* (MAO) ou oxidação por micro-arco e imobilização covalente de peptídeos antimicrobianos (AMPs), realizar o desenvolvimento de superfícies osseointegráveis, antibacterianas e com resistência a corrosão. As análises foram feitas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS), difração de raios-X (DRX) e microscopia de força atômica (AFM).

Palavras-chave

Titânio; Biomaterial; *micro arc-oxidation* (MAO); NaOH; Caracterização de Superfícies.

Abstract

The current biomedical industry uses metallic titanium and its alloys with a type of surface to perform implants in human tissue. However, there are still doubts about the compatibility between the material and the body. Mainly, because of the direct contact of the piece with the biological material. Thus, there are studies on the results when titanium has a film of antimicrobial peptides (AMPs), with the aim of changing the characteristics of the metal, which are linked to biocompatibility. The main objective of the work is, using the technique of micro-arc-oxidation (MAO) or oxidation by micro-arc and covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs), to carry out the development of osseointegrated, antibacterial and corrosion-resistant surfaces. Analyzes were performed using scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS), X-ray diffraction (XRD) and atomic force microscopy (AFM).

Key words

Titanium; Biomaterial; micro arc-oxidation (MAO); NaOH; Surface Characterization.

Sumário

I.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	9
II.	OBJETIVOS.....	11
III.	ETAPAS E EXECUÇÃO.....	11
IV.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
	- Preparação dos substratos e funcionalização da superfície por MAO.....	11
	- Tratamento com NaOH.....	11
V.	FORMA E ANÁLISE DOS RESULTADOS	12
	- Caracterização Estrutural e de Superfícies.....	12
VI.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
VII.	CONCLUSÃO.....	19
VIII.	ETAPAS A REALIZAR.....	19
	- Imobilização covalente de peptídeos antimicrobianos.....	19
	REFERÊNCIAS.....	20

I. Introdução e justificativa

Inovação tecnológica pode ser caracterizada pela melhoria em produtos, processos e serviços, associada ao empreendedorismo, tendo como propósito otimizar os resultados e agregar valor ao negócio. Na odontologia, em especial na área de implantes, a inovação tecnológica tem um terreno fértil considerado um mercado de 3 milhões de implantes dentários vendidos no Brasil no ano de 2020. Embora promissor, este mercado está baseado em tecnologias já exploradas e dominadas, o que deve causar uma estagnação da indústria, a menos que haja o aparecimento de uma tecnologia disruptiva ou muito inovadora. Um dos aspectos que podem induzir uma nova onda de desenvolvimento tecnológico é a customização dos implantes e odontologia personalizada, tendo, contudo, com fator limitante o custo dos implantes e a escalabilidade da tecnologia.

Qualquer que venha a ser a inovação tecnológica associada à área de implantes odontológicos, a interface implante – osso é o conceito chave a ser trabalhado, pois é nesta região que ocorre o processo de osseointegração. O fenômeno da osseointegração é um processo diretamente dependente da adesão de um coágulo de fibrina e do povoamento da superfície do implante pelas células derivadas do sangue e pelas células tronco mesenquimais, resultando na formação de tecido osteóide e sua subsequente mineralização. A topografia da superfície do implante dentário é um fator chave que influencia a osseointegração através da diferenciação de células osteoprogenitoras e da formação de matriz óssea ao redor do implante, sendo que ainda existem muitas questões em aberto nessa relação superfície-osseointegração, levando à falta de consenso quanto aos tratamentos de superfície necessários para que os materiais possam ser direcionados à prática clínica [1]. Ao ser implantado na cavidade oral, o biomaterial metálico permanece exposto a condições que podem ser extremamente corrosivas, devido ao contato de sua superfície com uma série de fluidos fisiológicos que variam em termos de pH, temperatura e composição química.

O titânio passou a ser um dos materiais mais requeridos como implante dentário na década de 1960, quando demonstrou ser um metal não apenas tolerado pelo corpo humano, mas também capaz de alcançar uma ancoragem no tecido ósseo [2]. Adicionalmente, o titânio é considerado como um material bastante atraente para aplicações biomédicas por possuir alta afinidade com o oxigênio. De fato, quando em contato com ar atmosférico ou soluções aquosas aeradas, o titânio forma espontaneamente uma camada de óxido fina (com espessura <10 nm) sobre sua superfície, tipicamente consistindo de TiO_2 , mas pode também coexistir com outros compostos tais como TiO e Ti_2O_3 [3]. Esta camada comumente referida como filme passivo protetivo age como uma proteção contra o ambiente agressivo ao redor,

permitindo retardar a corrosão ativa do metal em muitas ordens de magnitude. Também, durante o procedimento de inserção no osso, a superfície dos implantes dentários também pode sofrer danos críticos de desgaste devido a movimentos relativos de alta amplitude (sliding) na interface osso-implante [4]. Após a implantação, as cargas fisiológicas resultantes dos ciclos de mastigação são transferidas para o material osseointegrado, levando à ocorrência de movimentos relativos de baixa amplitude (*fretting*) entre as duas superfícies de contato (osso e implante) [5]. Para minimizar esse tipo de degradação, uma promissora estratégia é agir sobre a superfície do material. Atualmente, há muitas maneiras de se modificar e funcionalizar a superfície de um implante, contudo do ponto de vista econômico muitas vezes pesa demasiadamente na escolha de qual método utilizar. A técnica de micro-arc oxidation (MAO) pode ser uma abordagem de baixo custo e eficaz em produzir resultados imediatos e otimizados, sendo já empregada como tratamento superficial na indústria de implantes odontológicos. Basicamente, trata-se de um processo anódico que permite crescer revestimentos espessos de óxido de Ti, apresentando tipicamente uma diversidade de poros, além de serem incorporados com diferentes elementos bioativos e/ou antibacterianos previamente adicionados no eletrólito. O tratamento de MAO também pode contribuir para o aumento da resistência à tribocorrosão do material, devido à formação favorável de fases anatase e rutilo gradualmente distribuídas no filme crescido [6]. Adicionalmente, tais filmes anódicos demonstram maior proteção contra corrosão quando comparados a amostras de Ti não tratadas. Embora a literatura especializada reporte que a existência de camada porosa externa tem grande efeito na proteção à corrosão do material, poros maiores e maior quantidade de rachaduras criados no processo de MAO podem resultar em maior suscetibilidade à colonização bacteriana [7], que pode ser evitada se associada à imobilização covalente de peptídeos antimicrobianos (AMPs), constituindo uma alternativa inovadora e mais eficiente para conferir atividade antibacteriana a revestimentos de MAO. De fato, AMPs são biomoléculas do sistema imunológico de todas as classes de vida, tendo como vantagem adicional os alvos microbiais de AMPs que raramente desenvolvem fenótipos resistentes. Apesar dos extensos dados disponíveis até o momento, superfícies de MAO carregadas com AMPs através de imobilização covalente, ao melhor de nosso conhecimento, não são ainda documentadas, o que expressa uma evidente necessidade para adquirir os primeiros conceitos sobre essa promissora aplicação biomédica.

II. Objetivos

O principal foco foi no desenvolvimento de superfícies osseointegradas, antibacterianas e resistentes à corrosão e à tribocorrosão, através do estudo e otimização dos parâmetros da técnica de micro-arc oxidation (MAO) e imobilização covalente de peptídeos antimicrobianos (AMPs). A partir dessa estratégia inovadora, espera-se conferir uma atividade antibacteriana duradoura e de amplo espectro a promissoras superfícies de MAO, as quais são bem conhecidas por sua morfologia porosa e, mais recentemente, por seu gradiente químico e estrutural.

III. Etapas e Execução

Cronograma de execução; o projeto proposto foi desenvolvido em um período de 12 meses, com as seguintes atividades planejadas:

Atividade A – Preparação dos substratos e funcionalização da superfície por MAO

Atividade B - Caracterização Estrutural e de Superfícies

Atividade C – Revisão bibliográfica e leituras complementares objetivando a formação empreendedora e inovadora do estudante.

Atividade D – mobilização covalente de peptídeos antimicrobianos (a realizar).

Atividade E - Participação em eventos e elaboração de relatórios.

IV. Materiais e Métodos

- Preparação dos substratos e funcionalização da superfície por MAO

Discos de titânio grau 4 foram utilizados como material de substrato. O tratamento de superfície foi através da técnica de MAO. Seguindo protocolos com resultados promissores [25,28,30-32], eletrólitos baseados na mistura de acetato de cálcio monohidratado [0,35 M] (CaA) e β -glicerol fosfato sal dissódico penta-hidratado [0,02M] (β -GP) foram utilizados, de forma a incorporar Ca e P na superfície, respectivamente. O processo de anodização foi executado em modo galvanostático/potenciostático. Uma fonte de tensão DC foi utilizada para aplicar 300 V entre as amostras (ânodo) e uma placa de Ti comercialmente puro (grau 2) (cátodo), com uma corrente elétrica limitada em 2,5 A. O tratamento de superfície foi realizado durante 1 min à temperatura ambiente, sob agitação magnética.

- Tratamento com NaOH

A amostra após a funcionalização da superfície por MAO foi imersa em NaOH 5M, a 60°C, em tempos diferentes (4, 16, 24h) com o objetivo de formar grupos OH funcionais e então, facilitar a imobilização de peptídeos antimicrobianos.

V. Forma e análise dos resultados

- Caracterização Estrutural e de Superfícies

A morfologia e a composição elementar das amostras de MAO foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM) e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS). As características estruturais dos revestimentos foram avaliadas por difração de raios-X (DRX).

VI. Resultados e discussão

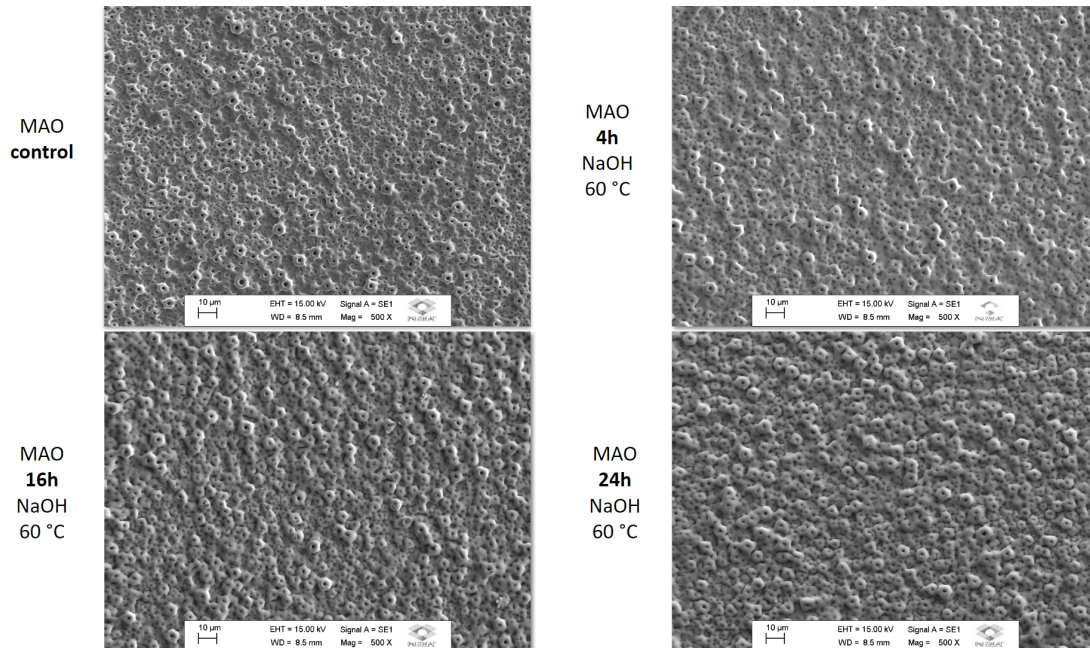
Como pode ser observado na Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3 e Fig. 4, as amostras de titânio tratadas pela estratégia de MAO apresentaram poros. Isso acontece devido às descargas elétricas que ocasionam a elevação da temperatura [8]. Assim, conseguindo agir localmente no óxido.

Nas amostras MAO control foi possível observar poros com um diâmetro maior e sem rachaduras notáveis. Porém, quanto maior o tempo da amostra na solução NaOH após o MAO, menor os poros ficam e mais rachaduras ficam presentes. O que é possível observar também nas Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7 e Fig. 8, já que há formação de nanoestruturas.

Quanto maior a deformação encontrada, a resistência do filme é menor [11]. Dessa forma, pode ocorrer alguma ruptura e afetar todo o material. Assim, a formação de rachaduras é prejudicial à resistência à corrosão e tribocorrosão da superfície.

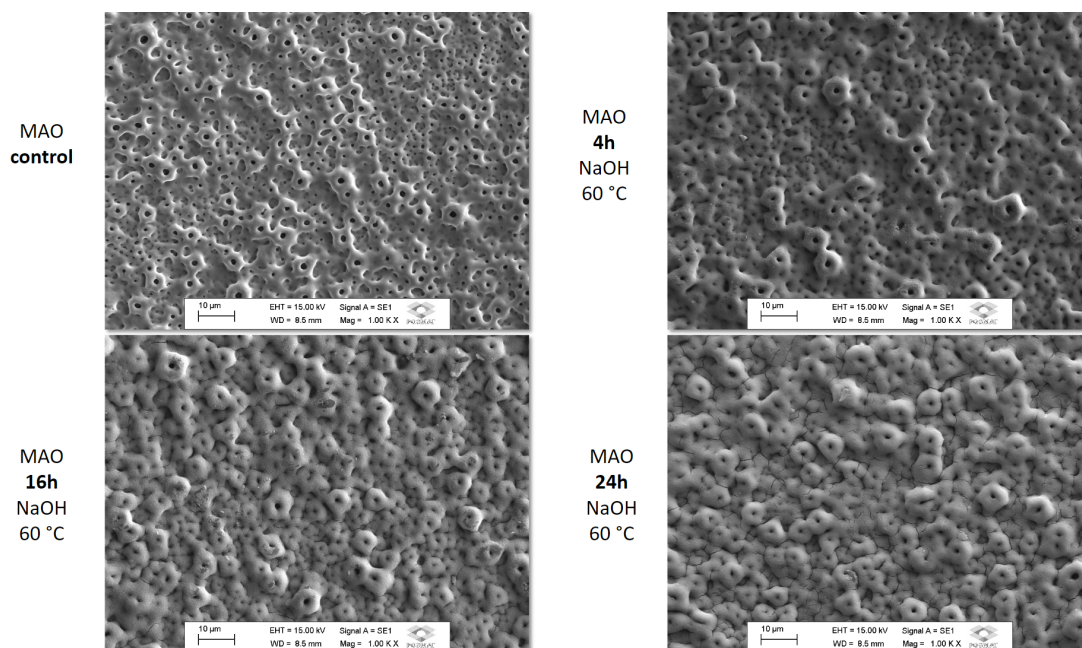
Geralmente, a presença de poros maiores ou mais quantidade de poros na superfície de MAO significa que facilita a entrada de solução de forma mais rápida [9]. No caso deste estudo, seria um benefício para a biocompatibilidade, porque, assim, facilita a imobilização covalente de peptídeos.

Figura 1 - MEV 500X das amostras de MAO (controle) e após diferentes tempos de imersão (4, 16 e 24h) em NaOH 5M, a 60°C.



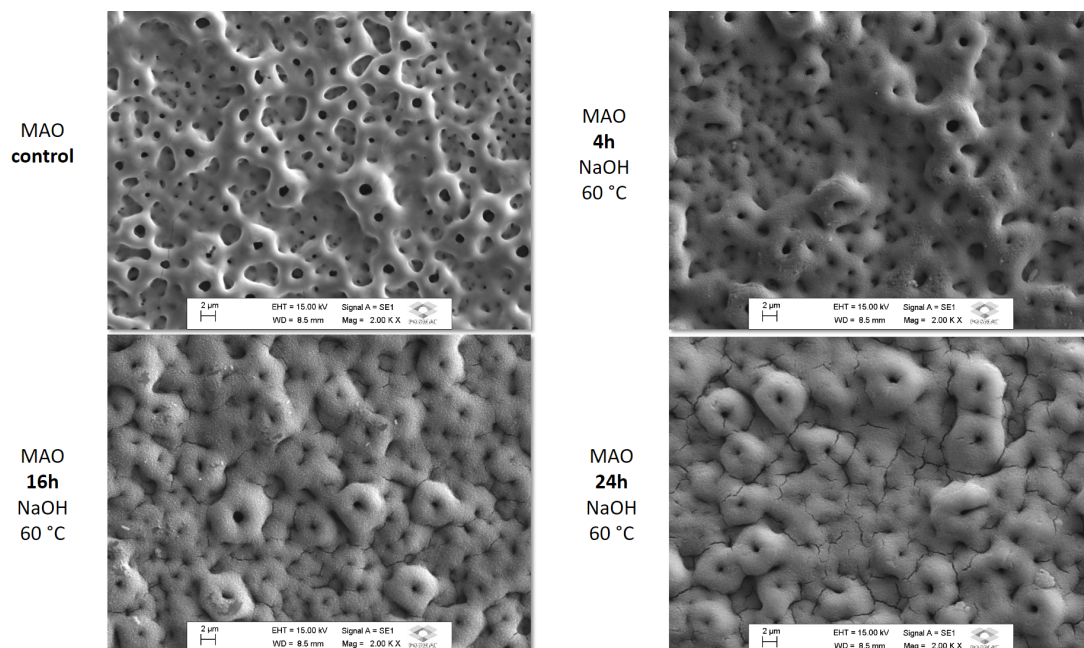
Fonte: Natália De Araújo Da Costa

Figura 2 - MEV 1000X das amostras de MAO (controle) e após diferentes tempos de imersão (4, 16 e 24h) em NaOH 5M, a 60°C.



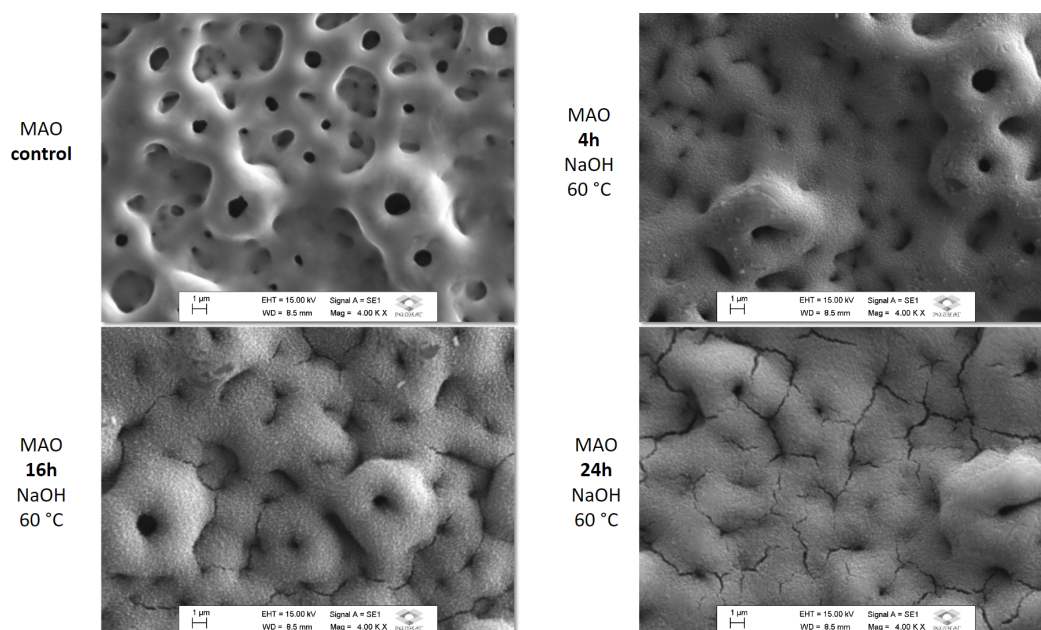
Fonte: Natália De Araújo Da Costa

Figura 3 - MEV 2000X das amostras de MAO (controle) e após diferentes tempos de imersão (4, 16 e 24h) em NaOH 5M, a 60°C.



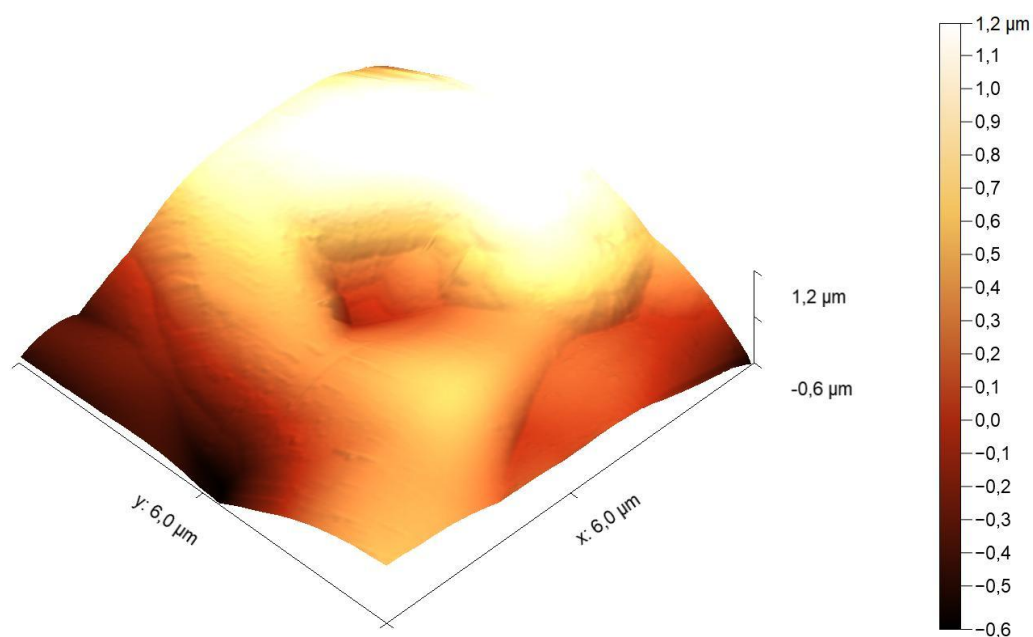
Fonte: Natália De Araújo Da Costa

Figura 4 - MEV 4000X das amostras de MAO (controle) e após diferentes tempos de imersão (4, 16 e 24h) em NaOH 5M, a 60°C.



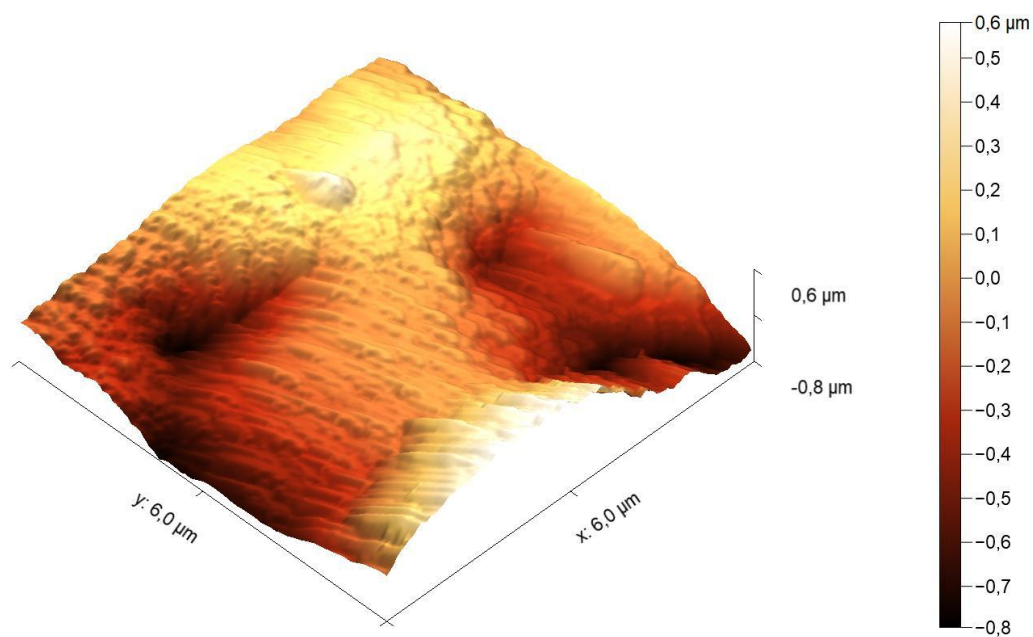
Fonte: Natália De Araújo Da Costa

Figura 5 - AFM da amostra de MAO *Control*



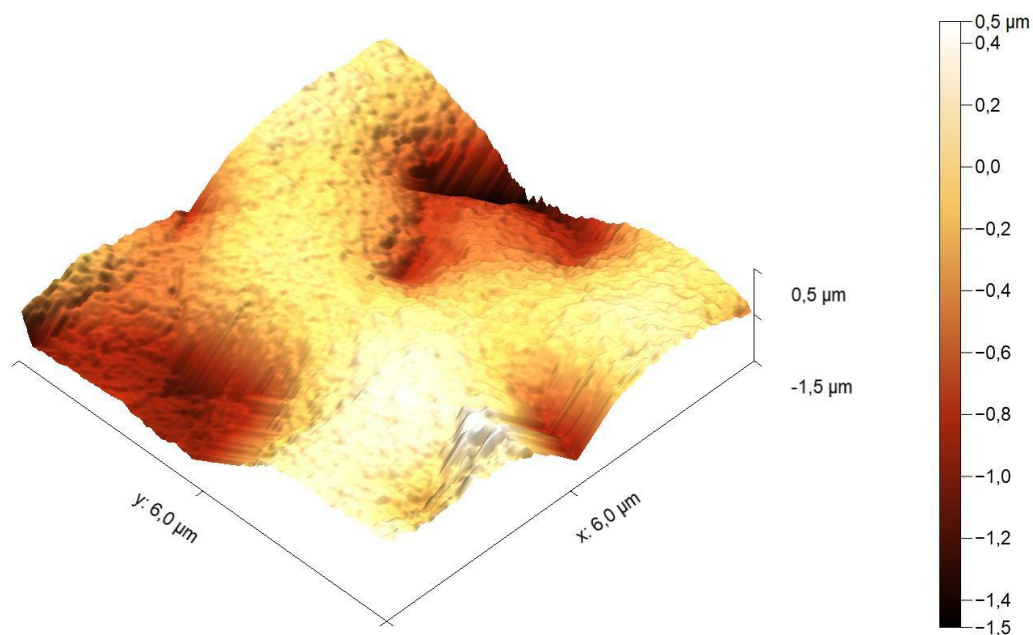
Fonte: Milena Yumi Kasama Nakata

Figura 6 - AFM da amostra de MAO após 4h de imersão em NaOH 5M, a 60°C.



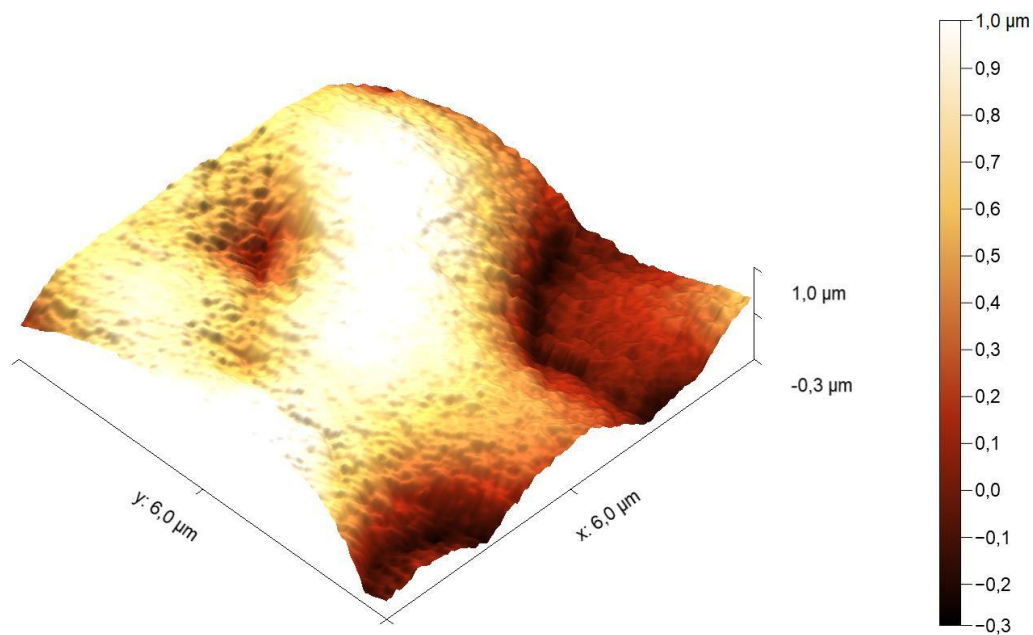
Fonte: Milena Yumi Kasama Nakata

Figura 7 - AFM da amostra de MAO após 16h de imersão em NaOH 5M, a 60°C.



Fonte: Milena Yumi Kasama Nakata

Figura 8 - AFM da amostra de MAO após 24h de imersão em NaOH 5M, a 60°C.



Fonte: Milena Yumi Kasama Nakata

Como apresentado na Tabela 2, a composição química da amostra de titânio com a técnica de MAO apresenta Ti, O, Ca e P. Em que, os elementos Ca e P foram incorporados quando a amostra entrou em contato com o eletrólito ao realizar o MAO [10]. Sugere-se que a incorporação desses elementos bioativos (Ca e P) é promovida quando o óxido é localmente

fundido nos locais de micro-arcos (sparks), sendo posteriormente re-solidificado ao entrar em contato com o eletrólito.

Tabela 1 - EDS MAO *control*.

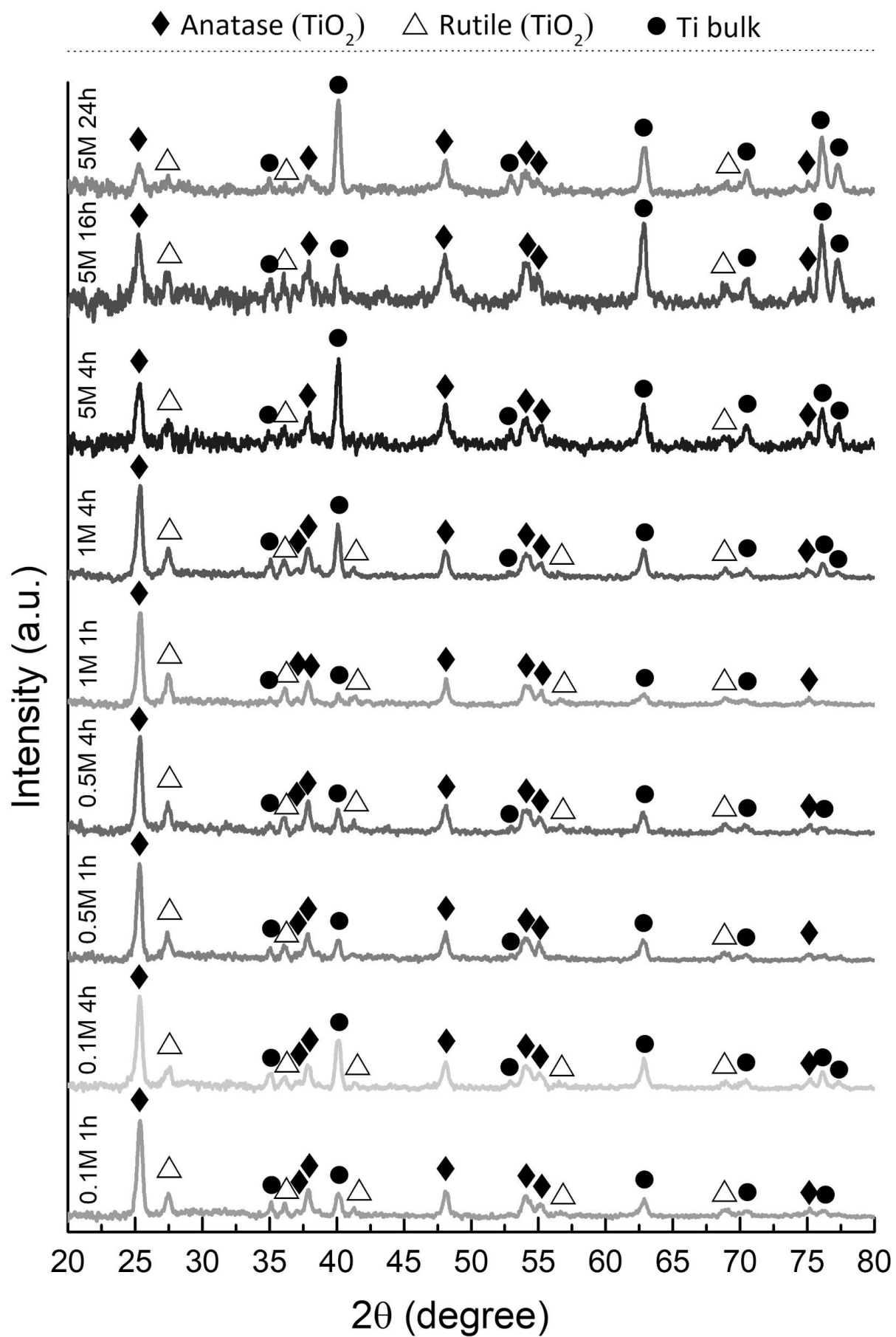
	(at%)
Ti	23.2 ± 0.3
O	68.5 ± 0.5
Ca	6.1 ± 0.2
P	2.3 ± 0.1

Fonte: Natália De Araújo Da Costa

Na Figura 9, há a análise da estrutura cristalina do filme de MAO após tratamento com NaOH com diferentes concentrações e tempos de imersão. A presença de picos de Ti provém do substrato metálico [8]. Enquanto ao TiO₂, segundo o DRX, foram a anatase e o rutilo. A função dessa mistura de fases é a resistência à tribocorrosão, sendo uma atrativa barreira amortecedora contra o desgaste, porque o rutilo tem a capacidade de tornar o material mais duro e a anatase tem o efeito de torná-lo mais dúctil [6]. No trabalho de Oliveira, identificou-se que a anatase estava uniformemente distribuída pela seção transversal dos filmes de MAO, já o rutilo ao redor dos poros superiores. Assim, neste projeto, as fases podem estar distribuídas dessa maneira.

A partir da análise de DRX também é possível notar que os picos de Ti aumentam e os de anatase e de rutilo diminuem, conforme a amostra é submetida as concentrações de NaOH mais altas. Isso indica que provavelmente o NaOH em concentrações maiores e em tempos de imersão maiores causa a dissolução do filme formado.

Figura 9 - DRX em todas as amostras de MAO analisadas.



VII. Conclusão

Através dos resultados obtidos, foi possível concluir que a técnica de MAO com pós-tratamento de NaOH 5M pode não ser adequada para aplicações biomédicas, devido ao aparecimento de rachaduras que podem prejudicar a resistência à corrosão e tribocorrosão da superfície, além da intensa dissolução dos filmes de óxido causada pelo ataque de íons OH⁻. Sugerem-se testes com concentrações menores de NaOH e tempos de imersão reduzidos. Tal estudo e otimização tem o objetivo de encontrar um equilíbrio entre dissolução do filme e formação de grupos OH funcionais, os quais são importantes para uma posterior imobilização covalente de peptídeos antimicrobianos (AMPs) e outras biomoléculas. Um implante ideal, dentre outras propriedades, deve apresentar uma superfície osseointegrada, antibacteriana e resistente à corrosão e à tribocorrosão.

VIII. Etapas a realizar

- Imobilização covalente de peptídeos antimicrobianos

Antes da imobilização covalente, os revestimentos de MAO serão expostos à luz ultravioleta (UV), de forma a serem esterilizados e, concomitantemente, homogeneizar sua molhabilidade e aumentar seus grupos hidroxila na superfície. Posteriormente, os AMPs serão imobilizados em duas etapas: i) ativação dos grupos OH das amostras com 1,1'-Carbonildiimidazol (CDI) (3 e 30 mg mL⁻¹) em tetrahidrofurano anidro (THF) por 2 h à temperatura ambiente, e ii) imobilização dos AMPs (MSI-78, sequência: GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKK 22 AA, ou alternativo CLS001, sequência: ILRWPWWPWRRK 12 AA) por meio de um dos grupos amina (NH₂) livres do peptídeo usando uma concentração de 0,5 mg mL⁻¹ em 0,01 M de Borato de sódio (borax), pH 9,15 por 24 h, 40 °C e 100 rpm. Após incubação, as amostras serão sequencialmente lavadas com 1% dodecilsulfato de sódio em solução tampão fosfato-salino (PBS), e água tipo 1, sendo então secas gentilmente com gás argônio. O processo de imobilização de AMPs será realizado em condições esterilizadas.

Após imobilização, as amostras serão caracterizadas em termos de: i) molhabilidade por medidas de ângulo de contato em água, ii) morfologia de superfície por SEM, e iii) imobilização dos AMPs, nomeadamente pela presença dos grupos funcionais característicos dos peptídeos (amidas I, II e III) por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier utilizando um sensor de reflectância total atenuada (ATR-FTIR)

REFERÊNCIAS

- [1] J. Li, J.A. Jansen, X.F. Walboomers, J.J. van den Beucken, Mechanical aspects of dental implants and osseointegration: A narrative review, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 103 (2020) 103574.
- [2] P.I. Branemark, Osseointegration and its experimental background, *J. Prosthet. Dent.* 50 (1983) 399–410.
- [3] J.C.M. Souza, M. Henriques, W. Teughels, P. Ponthiaux, J.P. Celis, L.A. Rocha, Wear and Corrosion Interactions on Titanium in Oral Environment: Literature Review, *J. Bio-Tribo-Corrosion.* 1 (2015).
- [4] P. Senna, A. Antoninha Del Bel Cury, S. Kates, L. Meirelles, Surface damage on dental implants with release of loose particles after insertion into bone, *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 17 (2015) 681–692.
- [5] S.S. Gao, Y.R. Zhang, Z.L. Zhu, H.Y. Yu, Micromotions and combined damages at the dental implant/bone interface, *Int. J. Oral Sci.* 4 (2012) 182–188.
- [6] F.G. Oliveira, A.R. Ribeiro, G. Perez, B.S. Archanjo, C.P. Gouvea, J.R. Araújo, A.P.C. Campos, A. Kuznetsov, C.M. Almeida, M.M. Maru, C.A. Achete, P. Ponthiaux, J.P. Celis, L.A. Rocha, Understanding growth mechanisms and tribocorrosion behaviour of porous TiO₂ anodic films containing calcium, phosphorous and magnesium, *Appl. Surf. Sci.* 341 (2015) 1–12.
- [7] F. Verdugo, T. Laksmana, A. Uribarri, Systemic antibiotics and the risk of superinfection in peri-implantitis, *Arch. Oral Biol.* 64 (2016) 39–50.
- [8] N.A. Costa, D.R.N. Correa, P.N. Lisboa-Filho, T.S.P. Sousa, C.R. Grandini, L.A. Rocha, Influence of the molybdenum on characteristics of oxide films produced by micro-arc oxidation on Ti-15Zr-based alloys, *Surface and Coatings Technology*, Volume 408, 2021, 126856.
- [9] A. Fattah-alhosseini and M. Sabaghi Joni, Effect of KOH Concentration on the Microstructure and Electrochemical Properties of MAO-Coated Mg Alloy AZ31B, *JMEPEG* (2015) 24:3444–3452.
- [10] Jung-Yun Ha, Yusuke Tsutsumi, Hisashi Doi, Naoyuki Nomura, Kyo-Han Kim, Takao Hanawa, Enhancement of calcium phosphate formation on zirconium by micro-arc oxidation and chemical treatments, *Surface and Coatings Technology*, Volume 205, Issues 21–22, 2011, Pages 4948-4955.

[11] FAZEL, M.; SALIMIJAZI, H.R.; GOLOZAR, M.A.; *et al.* A comparison of corrosion, tribocorrosion and electrochemical impedance properties of pure Ti and Ti6Al4V alloy treated by micro-arc oxidation process. *Applied Surface Science*, v. 324, p. 751–756, 2015.