

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CITOTOXICIDADE DE NOVAS LIGAS A BASE DE TITÂNIO
VISANDO APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

DANTE OLIVER GUIM CORRÊA

Orientador: Prof. Carlos Roberto Grandini, FBSE

**Bauru (SP)
2022**

DANTE OLIVER GUIM CORRÊA

**CITOTOXICIDADE DE NOVAS LIGAS A BASE DE TITÂNIO VISANDO
APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Ciências Biológicas, na Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho", como um dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Grandini, FBSE

Bauru (SP)

2022

Corrêa, Dante Oliver Guim.

Citotoxicidade de novas ligas a base de titânio
visando aplicações biomédicas / Dante Oliver Guim
Corrêa, 2022

40 f.: il. CDROM

Orientador: Carlos Roberto Grandini

Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade
Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru,
2022

1. Biomateriais. 2. Ligas de titânio. 3.
Citotoxicidade. I. Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Bauru



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 25 dias do mês de fevereiro de 2022, às 09h00, em sessão pública em formato virtual via Google Meet, na presença da Banca Examinadora presidida pelo(a) **Prof. Titular Carlos Roberto Grandini** e composta pelos examinadores:

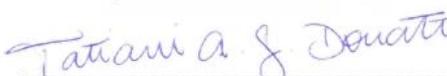
1. Dr^a. Tatiani Ayako Goto Donato
2. Dr. Diego Rafael Nespeque Correa

o(a) aluno(a) **Dante Oliver Guim Corrêa**

Apresentou o trabalho de conclusão de curso intitulado: "**Citotoxicidade de novas ligas a base de titânio visando aplicações biomédicas**", como requisito curricular indispensável para a integralização do curso de graduação em Ciências Biológicas – modalidade Bacharelado. 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.



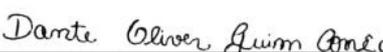
Prof. Titular Carlos Roberto Grandini



Dr^a. Tatiani Ayako Goto Donato



Dr. Diego Rafael Nespeque Correa



Dante Oliver Guim Corrêa

“Queria ser como uma criança de novo, meio selvagem, livre e atrevida, rindo das injúrias em vez de enlouquecer por causa delas.” (Emily Brontë)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Roberto Grandini, por confiar em mim e me dar uma grande oportunidade de iniciar minha vida acadêmica com uma área que vinha me fascinando há tempos. Obrigado pela paciência e pela compreensão em um momento tão delicado em que estamos passando.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de uma bolsa de iniciação científica (Proc. 2020/03.257-6), um apoio financeiro que foi tão necessário para que eu conseguisse concluir minha pesquisa em laboratório, bem como me formar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro à pesquisa.

Aos meus amigos que me acompanharam nessa longa jornada da graduação: Bruna, Lavínia, Gabriel e Lucas, obrigado pelos almoços, pelas risadas e por todos os momentos que trabalhamos juntos para seguir em frente durante o curso. Também gostaria de agradecer aos meus amigos que nada tinham a ver com a UNESP, mas mesmo assim se mantiveram ao meu lado quando pensei em desistir: Caio, João Matheus, João Tassa, Arthur, Douglas, Bianca, Thiago, Matheus, Kennedy e Anna, sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

À minha família, que mesmo pensando em desistir de mim fizeram de um tudo para que eu me mantivesse no curso e não abandonasse a jornada no meio do caminho. Obrigado mãe, tio Carlos, tio José e avó; mesmo que nunca me entendam, para sempre amarei vocês.

Aos alunos do Laboratório de Anelasticidade e Biomateriais por toda a ajuda e auxílio nos momentos que precisei, seja ajudando a preparar os materiais para análise ou então tirando minhas dúvidas, muitas vezes bobas, sobre o meio acadêmico.

À UNESP, pela oportunidade de realizar uma ótima graduação gratuitamente no curso que sempre sonhei, e aos professores que deram aulas para o curso, seja dentro ou fora do Departamento de Ciências Biológicas. Seus ensinamentos para sempre estarão comigo, seja pelas duras broncas ou pelos elogios sutis ao longo dos anos.

E por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer profundamente a todos os professores e funcionários da escola SESI de Pederneiras, que foram

essenciais para o meu desenvolvimento como ser humano e me ajudaram a entrar em uma faculdade pública. Gostaria de agradecer especialmente ao professor de biologia que me acompanhou desde o ensino fundamental, “seu” Lourival Pascucci Campagna, que me aguentou em todos os meus momentos de rebeldia infantil e mesmo assim não soltou minha mão até que eu estivesse onde sempre sonhei. Se não fosse por você, eu jamais estaria aqui. Você pavimentou meu caminho e me deu asas para voar após isso. Para sempre, muito obrigado.

CORRÊA, D.O.G. **Citotoxicidade de novas ligas a base de titânio visando aplicações biomédicas**. 2022. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Bacharelado em Ciências Biológicas). UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru (SP), 2022.

RESUMO

O titânio e suas ligas são utilizados em implantes ortopédicos e odontológicos devido às adequadas características de biocompatibilidade, elevada resistência à corrosão e ótima relação resistência mecânica/densidade, quando comparados a outras ligas metálicas usadas na área biomédica. Dentre as ligas de titânio utilizadas no Brasil e no mundo para implantes ortopédicos, a mais usada é a liga Ti-6Al-4V, uma vez que apresenta uma resistência mecânica bastante superior à do titânio comercialmente puro. Além disso, os implantes que estão presentes no mercado são suscetíveis a degradação por desgaste mecânico, corrosão ou tribocorrosão (ação conjunta de corrosão e desgaste mecânico), razão pela qual apresentam um tempo de vida útil relativamente curto. No entanto, a liga Ti-6Al-4V possui elementos considerados citotóxicos: o vanádio causa reações alérgicas em tecidos humanos e o alumínio está associado à desordens neurológicas a longo prazo. Sendo assim, buscas de novas ligas sem esses elementos estão sendo realizadas. Ligas contendo nióbio, zircônio, molibdênio e tântalo são as mais promissoras, já que esses elementos são considerados β -estabilizadores, não-tóxicos ou alergênicos. Portanto, a adição deles ao titânio altera sua microestrutura e propriedades mecânicas, podendo torná-lo mais eficiente como biomaterial. Além disso, é importante que esses novos materiais estimulem, ou não interfiram, no crescimento e proliferação celular. Testes preliminares podem ser efetuados a partir do sistema de cultura de células, em que é possível analisar minuciosamente eventos celulares e da matriz extracelular (MEC). Desta forma, o presente projeto tem como foco principal o estudo da citotoxicidade *in vitro* de novas ligas a base de titânio visando aplicações biomédicas. Os resultados obtidos demonstraram potencial primário para as novas ligas de titânio, que não apresentaram citotoxicidade.

Palavras-chave: Biomateriais, Citotoxicidade, Biocompatibilidade, Ligas de Titânio, Implantes.

CORRÊA, D.O.G. **Cytotoxicity of novel titanium-based alloys aiming biomedical applications.** 2022. 40 p. Undergraduate final project. (Biological Sciences Bachelor). UNESP, School of Sciences, Bauru (SP), 2022.

ABSTRACT

Titanium and its alloys are used in orthopedic and dental implants due to their adequate biocompatibility characteristics, high corrosion resistance and excellent mechanical strength to density ratio, when compared to other metallic alloys used in the biomedical field. Among the titanium alloys used in Brazil and worldwide for orthopedic implants, the most used is the Ti-6Al-4V alloy, since it has a higher mechanical resistance than commercially pure titanium. In addition, implants that are on the market are susceptible to degradation due to mechanical wear, corrosion or tribocorrosion (the joint action of corrosion and mechanical wear), resulting in relatively short service life. However, the Ti-6Al-4V alloy has elements considered cytotoxic: vanadium causes allergic reactions in human tissues and aluminum is associated with long-term neurological disorders. Therefore, searches for new alloys without these elements are being carried out. Alloys containing niobium, zirconium, molybdenum and tantalum are the most promising, as these elements are considered β -stabilizers, non-toxic and non-allergenic. Therefore, their alloying to titanium alters its microstructure and mechanical properties, making it more efficient as a biomaterial. Furthermore, it is important that these new materials stimulate, or not interfere with, cell growth and proliferation. Preliminary tests can be carried out from the cell culture system, where it is possible to thoroughly analyze cellular and extracellular matrix (ECM) events. Thus, this project is focused on the study of the in vitro cytotoxicity of new titanium-based alloys aiming at biomedical applications. The results obtained showed primary potential for the new titanium alloys, which did not show cytotoxicity.

Keywords: Biomaterials, Cytotoxicity, Biocompatibility, Titanium Alloys, Implants.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	9
2.	OBJETIVOS.....	13
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1	Preparação das ligas à base de titânio.....	14
3.2	Cultivo celular.....	16
3.3	Teste de viabilidade celular.....	16
3.4	Ensaio de adesão celular.....	17
3.5	Análise estatística.....	17
4.	RESULTADOS.....	19
4.1	Ensaio de viabilidade celular.....	19
4.2	Ensaio de adesão celular.....	25
5.	DISCUSSÃO.....	32
6.	CONCLUSÕES.....	36
7.	REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

Com o avanço tecnológico na área da saúde e a união da engenharia à outras áreas da Ciência, tem-se possibilitado o desenvolvimento de técnicas que procuram restabelecer e restaurar as funções totais ou parciais de órgãos ou tecidos do corpo que tenham sido perdidos ou danificados por algum motivo, sempre visando melhor qualidade e aumento da expectativa de vida (RODRIGUES, 2013). Essas técnicas se utilizam dos chamados biomateriais, que podem ser definidos como qualquer substância (que não seja uma droga) ou combinação de substâncias, podendo ter origem sintética ou natural (modificada quimicamente ou não), que pode ser usada por um determinado período de tempo, total ou parcialmente como parte de um sistema que tem como objetivo tratar, aumentar ou substituir um órgão, tecido ou então função do corpo (GHASEMI-MOBARAKEH, 2019; SPEZZIA, 2020). Dessa forma, o termo biomaterial é utilizado para se referir aos materiais que constituem implantes ou dispositivos usados na medicina, odontologia e medicina veterinária (MARIN; BOSCHETTO; PEZZOTI, 2020). Dentro da área biomédica, tem-se como exemplo de biomateriais os tubos de circulação sanguínea e os sistemas de hemodiálise, e dentro da área de implantes pode-se apontar as suturas, placas e telas. A vantagem do uso de biomateriais é a diminuição do uso de enxertos, como músculos e ossos, diminuindo também a morbidade dos doadores e também abrandando a deformidade e dores dos pacientes (SILVA et al., 2021).

No entanto, por mais que os avanços tecnológicos em cima dos biomateriais tenham se tornado cada vez mais notáveis nos últimos anos e esse seja um termo recente, é importante ressaltar que o uso de dispositivos externos ao corpo humano visando corrigir problemas de saúde data de milhares de anos atrás (SUVANEETH; NAIR, 2018). Hipócrates foi a primeira pessoa a registrar o tratamento de uma fratura mandibular utilizando fios de linho ou ouro, que eram enrolados nos dentes (CRIST et al., 2021). Também se tem registros de cirurgiões Incas que reparavam fraturas cranianas com placas de ouro, e antigas populações Maias que se utilizavam de conchas do mar para criação de dentes artificiais, atingindo adequadamente a osseointegração (TODROS; TODESCO; BAGNO, 2021).

Na atualidade, o mercado de biomateriais demonstrou ter um grande impacto econômico na área da saúde, evidenciando como a procura por esses materiais

apenas tem aumentado (HARRIS; LU; GABRIELE, 2018); estima-se que as vendas de biomateriais regenerativos ultrapassem 240 milhões de dólares por ano, e também há uma estimativa de que até o fim do ano de 2021, o mercado de biomateriais tenha gerado ao todo 149,17 bilhões de dólares (TOLEDANO et al., 2020).

Porém, no mesmo ritmo em que esse mercado disparou, também surgiram novos trabalhos questionando os efeitos citotóxicos de determinados biomateriais popularmente comercializados com alto uso clínico (KURODA; NASCIMENTO; GRANDINI, 2020). O efeito citotóxico é aquele que leva à morte celular, sendo causado por efeitos endógenos ou exógenos, e estes efeitos podem ser químicos, físicos ou biológicos (ISTIFLI; ILA, 2019). O aço inoxidável, por exemplo, é um biomaterial muito utilizado em próteses corporais e dentárias, porém não permite a posterior integração da matriz óssea; o ideal clínico é o uso de próteses que permitam o crescimento ósseo (KLOK, 2019). A liga majoritariamente utilizada para implantes ortopédicos é a Ti-6Al-4V, que representa 45% do uso e produção total do titânio (Ti) como biomaterial, que também levanta questionamentos sobre sua segurança graças a liberação de íons e partículas metálicas, comumente associados a respostas inflamatórias e ativação de células de reabsorção óssea a longo prazo (COSTA et al., 2019). O módulo elástico da liga Ti-6Al-4V (110 GPa) também é maior que a do osso cortical (20 GPa), gerando incompatibilidade entre o implante e o osso circundante, podendo causar estresse na região, dores para andar e até mesmo levar ao afrouxamento do implante (BRIZUELA et al., 2019; CHERNOZEM et al., 2020). Ainda assim, o titânio tem ótimas propriedades para ser utilizado como implante clínico quando comparado com outros materiais, como aqueles à base de cobalto ou o próprio aço inoxidável (SIEMERS et al., 2018).

Para evitar tais efeitos citotóxicos, pesquisadores têm buscado encontrar novas ligas à base de titânio com materiais que não tenham ação danosa ao organismo (BALATU et al., 2021); para tal, os biomateriais utilizados devem ser biocompatíveis, isso é, serem capazes de ter uma resposta apropriada quando em contato com um sistema biológico, em uma determinada aplicação (WILLIAMS, 2021). Essa biocompatibilidade pode ser avaliada a partir de testes *in vitro* e *in vivo*, embora os testes *in vitro* não possam representar a real biocompatibilidade de um implante, promovendo apenas resultados preliminares sobre a interação entre o material e o organismo, diminuindo os testes em animais. Os testes de citotoxicidade *in vitro* são

especificados pela ISO:10993, sendo considerados testes de avaliação inicial que usam técnicas de cultura celular (SANTOS, 2019). A ISO:100993-5 define que um material será considerado citotóxico se, no ensaio de viabilidade celular, a porcentagem de absorbância celular estiver abaixo de 70% (ISO:10993-5, 2009). A viabilidade celular, neste caso, se refere à capacidade de uma célula em continuar viva mesmo após ser condicionada a uma liga metálica, e vai ser definida pela porcentagem de células que se mantiveram viáveis no meio de cultura (YANG et al., 2021).

Para que se possa comparar a porcentagem de absorbância celular entre diferentes ligas e inferir se apresentam ação citotóxica ou não, é necessária a realização de testes estatísticos. A análise de variância (ANOVA) é utilizada para determinar se existem diferenças (variâncias) nas médias de 3 ou mais grupos diferentes, evitando dessa forma possíveis erros nos testes de hipóteses. O ANOVA compara a mediana entre os diferentes grupos para determinar se a diferença é estatisticamente relevante ou não. Já a ANOVA unilateral é utilizada quando se tem apenas uma variável independente com dois ou mais níveis (KIM, 2017). Entretanto, o ANOVA indica apenas que os grupos diferem, e não qual grupo tem uma diferença significativa; dessa forma, a análise de variância normalmente é acompanhada por uma análise que tem como objetivo identificar o padrão de diferença nos resultados, um teste de comparações múltiplas. O Teste de Tukey é popularmente utilizado por ser preciso e fazer comparações entre todos os pares, tendo uma aplicação simples. Este teste compara todos os possíveis pares de médias, baseando-se na diferença mínima significativa (DMS) considerando os percentis dos grupos, bem como o cálculo da DMS também utiliza o quadrado médio dos resíduos do ANOVA, a distribuição da amplitude estudentizada e o tamanho amostral dos grupos. A partir do Teste de Tukey pode-se obter o p valor, que vai determinar se as diferenças são estatisticamente significativas ou não (ABDI; WILLIAMS, 2010).

O titânio e as ligas criadas a partir dele se mostraram promissoras graças a combinação de excelentes propriedades mecânicas, químicas, baixa ação citotóxica e biocompatibilidade com o tecido humano; com isso, houve uma valorização do uso de titânio na engenharia tecidual, levando ao desenvolvimento de biomateriais de nova geração (SIDHU; SINGH; GEPREEL, 2021). Novas ligas envolvendo sistemas com titânio, tântalo e zircônio vem sendo pesquisadas, para testar sua ação citotóxica

e potencial como biomaterial (QUADROS et al., 2019), assim como podem-se encontrar estudos com sistemas contendo titânio e nióbio (LUZ et al., 2019) e titânio, molibdênio e manganês, que também se mostraram promissores (LOURENÇO et al., 2020).

Este conjunto de materiais foi escolhido com base em estudos prévios, em que cada uma dessas substâncias desempenha uma função para o melhoramento das ligas à base de titânio. O zircônio e molibdênio, por exemplo, tem um longo histórico demonstrando sua boa resistência mecânica à corrosão, alta biocompatibilidade e quando aliados ao titânio, apresentam melhor combinação de microdureza que a liga Ti-6Al-4V (TORRENTO; GRANDINI; CORREA, 2021). Já a liga Ti-25Ta-Zr é muito utilizada devido a bons resultados nos módulos de elasticidade, bem como o zircônio acaba sendo utilizado como um elemento β estabilizador na liga Ti-25Ta, que possui apenas a fase α quando submetida a tratamentos de resfriamento rápido; a adição de zircônio nessa liga é conhecida por estabilizar a fase β e diminuir o módulo de elasticidade (KURODA et al., 2021). As ligas com zircônio também apresentam boa resistência à corrosão e biocompatibilidade, enquanto o tântalo é considerado um elemento estabilizador fraco, sendo frequentemente utilizado para controlar estrutura e microestrutura de ligas de titânio (KURODA et al., 2021), levando também as ligas a terem boas propriedades mecânicas e um módulo de elasticidade menor que 70GPa. O tântalo só irá apresentar predominância da fase β quando sua concentração for superior a 60% (KURODA; NASCIMENTO; GRANDINI, 2020).

Desse modo, a busca por novas ligas de titânio se faz necessária para que haja uma melhora na qualidade de vida daqueles que têm implantes ou que se utilizem de biomateriais em seu cotidiano (BALATU et al., 2019; CORREA et al., 2020). Para que essa busca seja eficiente, é necessário que se faça os testes *in vitro* em novas ligas a base de titânio, realizando ensaios de viabilidade celular e também de adesão celular, que irão demonstrar o potencial inicial dessas ligas como biomateriais, sempre buscando aquela que tenha menor ação citotóxica; caso não demonstrem citotoxicidade, as ligas podem passar para as fases seguintes de testes *in vivo*, para que um dia possam chegar ao mercado e serem comercializadas de forma segura na área biomédica (ÇAHA, 2020).'

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos citotóxicos de novas ligas a base de titânio, pertencentes aos sistemas Ti-Mo-Mn, Ti-Ta-Zr, Ti-Nb, Ti-Ta-Nb-Zr, Ti-Zr-Mo e Ti-Mo-Nb em células osteogênicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação das ligas à base de titânio

Para a preparação dos lingotes das ligas dos sistemas Ti-Zr-Mo, Ti-Mo-Nb, Ti-Ta-Zr e Ti-Mo-Mn foram utilizados como material de partida metais comercialmente puros, barras de titânio grau 2 (ASTM F67) com diâmetro de 3,20 mm, adquirido da Sandinox, chapas de molibdênio, manganês e tântalo, com espessura de 2,0 mm, fios de zircônio, adquiridos da Aldrich e barras de nióbio fornecido pela Companhia Brasileira de Mineração e Metalurgia (CBMM). Os materiais foram cortados e pesados para se obter um lingote de 60 g. A Figura 1 mostra fotografias dos metais precursores que foram utilizados na fusão dos lingotes.



Figura 1: Materiais precursores utilizados para a fusão das ligas que serão analisadas neste trabalho.

Os materiais foram separados na concentração nominal de cada liga e foram decapados em uma solução de 50% água, 25% ácido nítrico, 15% ácido clorídrico e

10% ácido fluorídrico, posteriormente passando por uma lavagem ultrassônica com o objetivo de eliminar qualquer tipo de impureza superficial.

Com os precursores limpos, eles foram fundidos em um forno de fusão a arco-voltaico (Figura 2), com atmosfera inerte e controlada de argônio para evitar contaminações, em um cadinho de cobre refrigerado a água e eletrodo não consumível de tungstênio. A fusão foi efetuada após os precursores inseridos no cadinho; com o forno fechado feito vácuo de aproximadamente 10-2% Torr por 30 minutos, seguido pelo processo de purga, adicionando argônio, que é um gás inerte, mantido por 3 minutos, e posteriormente submetido a uma nova limpeza por vácuo e mantido por 10 minutos. Esse procedimento foi realizado em um total de 5 vezes. Assim iniciou-se a fusão, realizando o derretimento completo dos metais. Em seguida, o lingote foi fundido de uma extremidade a outra, sendo, posteriormente, girado por 180°. Esse procedimento de fusão foi repetido por mais 5 vezes, para garantir a boa homogeneidade da liga (CORREA et al., 2018).

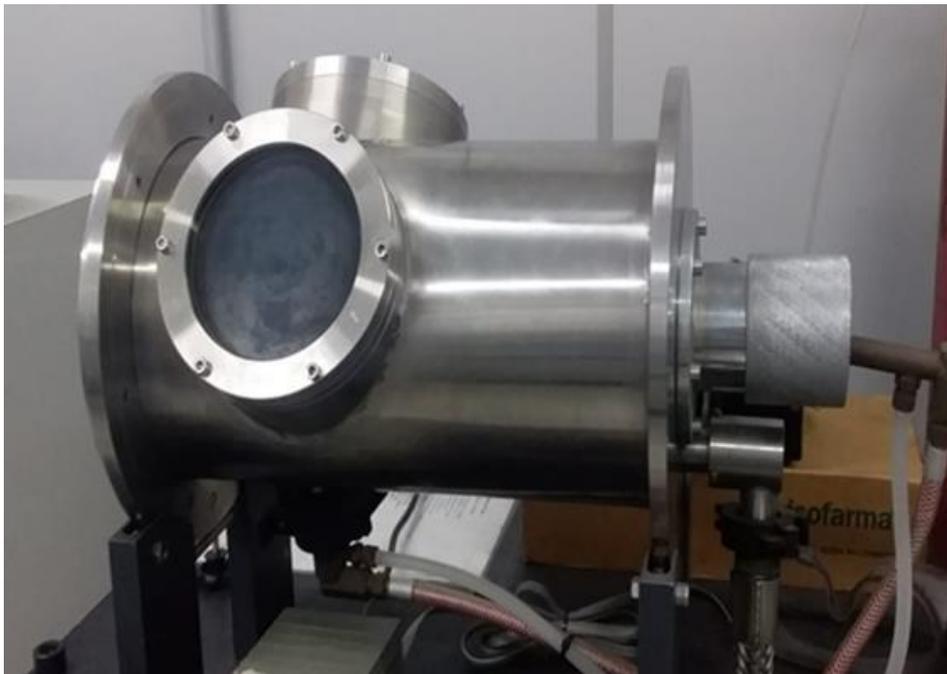


Figura 2: Forno para fusão a arco-voltaico.

Os lingotes foram produzidos no Laboratório de Anelasticidade e Biomateriais, da Faculdade de Ciências da UNESP – Campus de Bauru, coordenado pelo Prof. Carlos Roberto Grandini.

Com o lingote pronto, cortou-se o mesmo para análises futuras. O corte foi efetuado com disco diamantado refrigerado a água, em uma máquina de corte da Buehler, modelo Isomet Precision Saw 1000 (Figura 3).



Figura 3: Máquina para corte utilizada neste trabalho.

3.2 Cultivo celular

Pré-Osteoblastos (MC3T3-E1, subclone 4) foram cultivadas em meio alpha-minimum essencial médium (MEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e antibiótico (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 mg/mL) (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, até atingirem a confluência da placa. Este cultivo celular foi usado tanto para o grupo de controle (controle positivo) quanto para o meio de cultura que entrou em contato com as ligas de titânio.

3.3 Teste de viabilidade celular

Para verificar-se o potencial citotóxico, as ligas foram mantidas em meio de cultura por 24 horas, seguindo as normas da ISO: 10993-5. Após o período de condicionamento, o meio foi coletado e suplementado com 10% de SBF e utilizado para tratar os pré-osteoblastos pelo período de 24 horas. As células foram plaqueadas

24 horas antes do tratamento, em placa de 96 poços e na densidade de 5×10^4 células/mL. Após o tempo determinado de exposição ao meio condicionado, a viabilidade destas células foi medida por meio do ensaio de MTT indireto, onde o meio de cultura foi removido, adicionado o sal brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma Aldrich #M5455-1G) 1 mg/mL e levado em estufa por 3 horas adicionais. Após esse período, o meio foi removido e adicionado 0,1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização do corante formado por células viáveis (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). Na sequência, a absorbância foi medida a 570 nm utilizando um leitor de microplacas (leitor multimodo SYNERGY-HTX, Biotek, USA).

3.4 Ensaio de adesão celular

Os pré-osteoblastos foram tratados e plaqueados com meio condicionado pelas ligas por 24 horas iniciais. Após, as células foram tripsinizadas, contadas, e semeadas novamente em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^4 células/mL. Após 24 horas de tratamento, as células aderentes foram lavadas em tampão de fosfato e cloreto de sódio (PBS) a 37°C e fixadas em etanol-ácido acético glacial absoluto (3:1, v/v) durante 10 minutos, em temperatura ambiente; as células aderentes foram coradas com 0,1% de cristal violeta (w/v) por 10 minutos. O excesso de corante foi removido por decantação e lavado duas vezes com água destilada. A extração do corante foi feita com ácido acético a 10% (v/v) (MORAES et al., 2018). A absorbância foi medida a 540 nm em um leitor de microplacas (leitor multimodo SYNERGY-HTX, Biotek, EUA). O ensaio de adesão celular irá inferir se a célula está aderida na placa ou não, depois de passar por diversos processos de lavagem que poderiam fazer com que a célula perdesse essa aderência. Dessa forma, se a célula apresentar citotoxicidade, não será capaz de se manter aderida na placa (DA COSTA FERNANDES et al., 2018; DA SILVA et al., 2020).

3.5 Análise estatística

Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão (DP). Eles foram verificados utilizando One-Way ANOVA (paramétrico) com pós teste de Tukey,

a fim de comparar todos os pares de grupos. Neste caso, com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo e $p < 0,0001$ considerado altamente significativo. O software utilizado foi GraphPad Prism 7.

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de MTT indireto avaliou o nível de citotoxicidade de diferentes ligas à base de titânio, analisando a viabilidade celular com meios condicionados aos diferentes biomateriais.

Legenda	
Ctrl	Controle
Asteriscos (*)	P valor <0,05
Tracejado vermelho	Absorbância = 70%

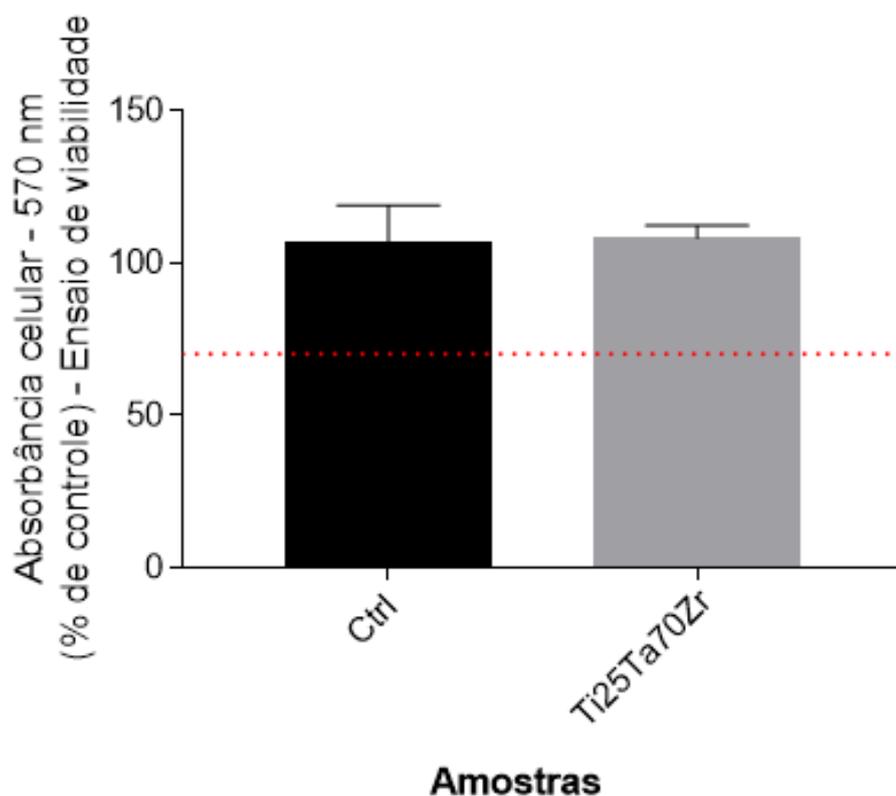


Figura 4: Comparação do ensaio de viabilidade celular entre grupo de controle e a liga Ti-25Ta-70Zr.

A liga Ti-25Ta-70Zr não apresentou citotoxicidade, seu percentual de absorbância celular ficando acima de 70%

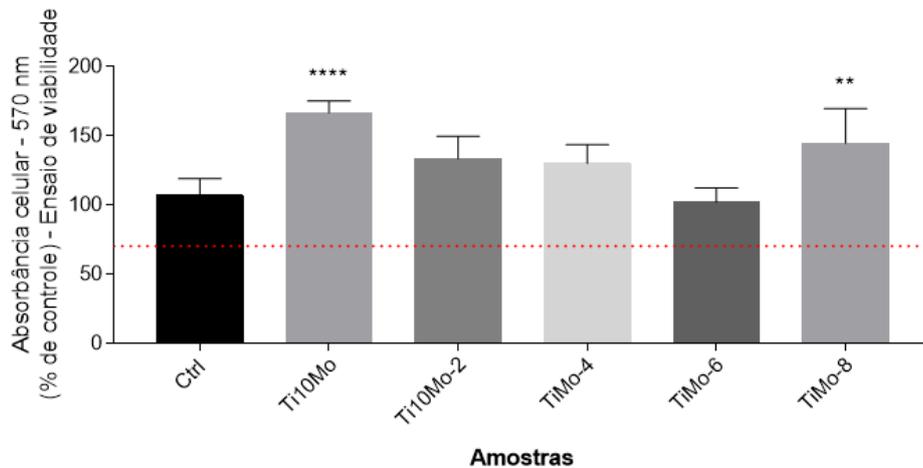


Figura 5: Comparação do ensaio de viabilidade celular entre grupo de controle e a liga Ti-10Mo.

**** = 0,0001

** = 0,0063

A liga Ti-10Mo não demonstrou ação citotóxica nos cinco testes realizados, sua porcentagem de absorbância celular sendo superior a 70%.

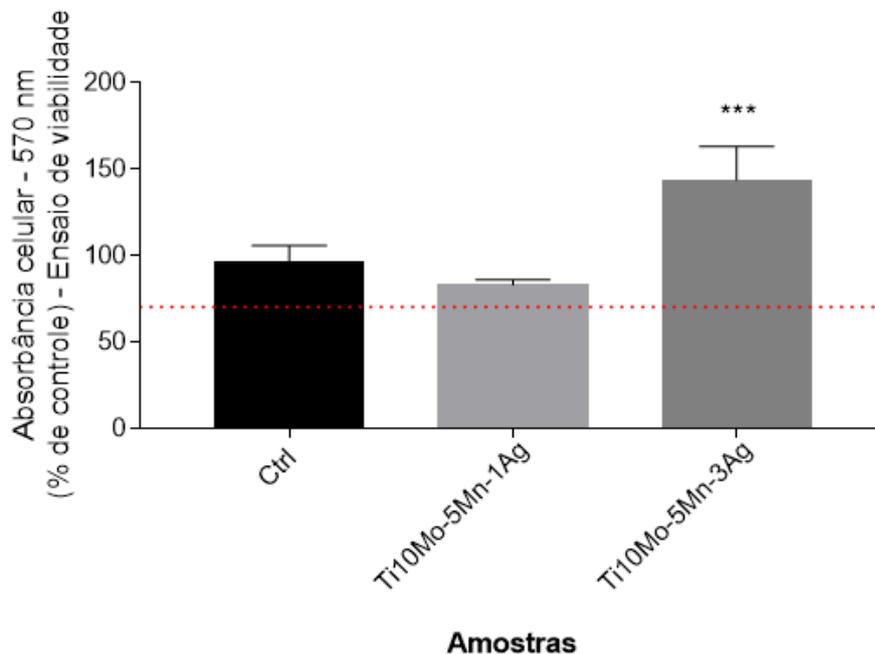


Figura 6: Comparação do ensaio de viabilidade celular entre grupo de controle e as ligas Ti-10Mo-5Mn-1Ag, Ti-10Mo-5Mn-3Ag.

* = 0,0341

** = 0,0077

As ligas Ti-10Mo-5Mg-1Ag e Ti-10Mo-5Mn-3Ag não apresentaram citotoxicidade, tendo sua porcentagem de absorbância celular acima de 70%.

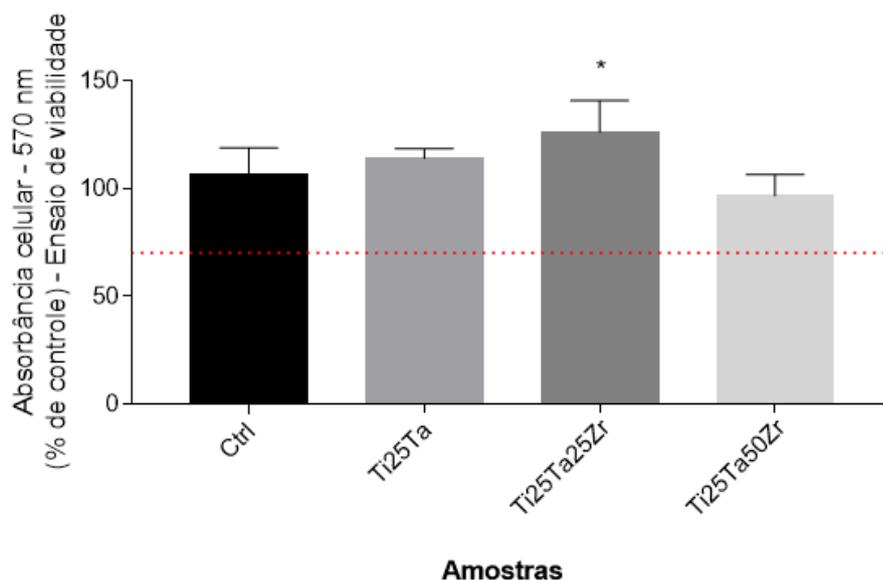


Figura 7: Comparação do ensaio de viabilidade celular entre grupo de controle e as ligas Ti-25Ta, Ti-25Ta-25Zr, Ti-25Ta-50Zr.

* = 0,0443

As ligas Ti-25Ta, Ti-25Ta-25Zr e Ti-25Ta-50Zr não demonstraram ação citotóxica, tendo seu percentual de absorbância celular acima de 70%.

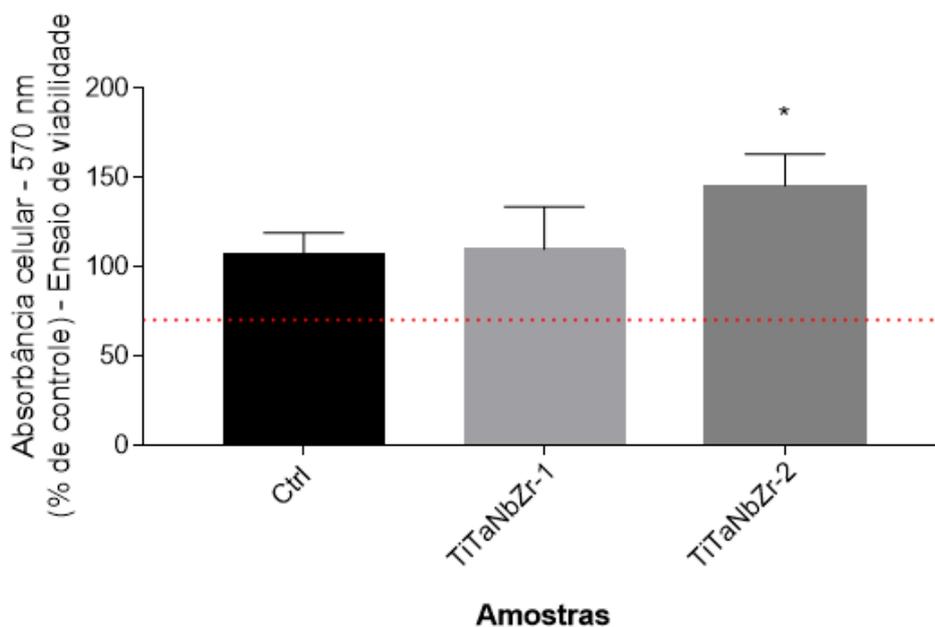


Figura 8: Comparação do ensaio de viabilidade celular entre grupo de controle e a liga Ti-Ta-Nb-Zr.

* = 0,0282

A liga Ti-Ta-Nb-Zr não demonstrou citotoxicidade nos dois testes realizados, com a porcentagem de absorbância celular acima de 70%.

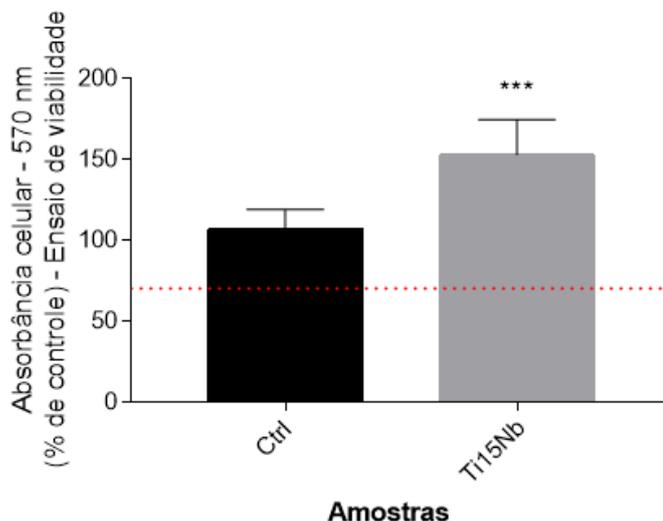


Figura 9: Comparação do ensaio de viabilidade celular entre grupo de controle e a liga Ti-15Nb.

*** = 0,0001

A liga Ti-15Nb também não apresentou citotoxicidade, com sua absorbância celular superior a 70%.

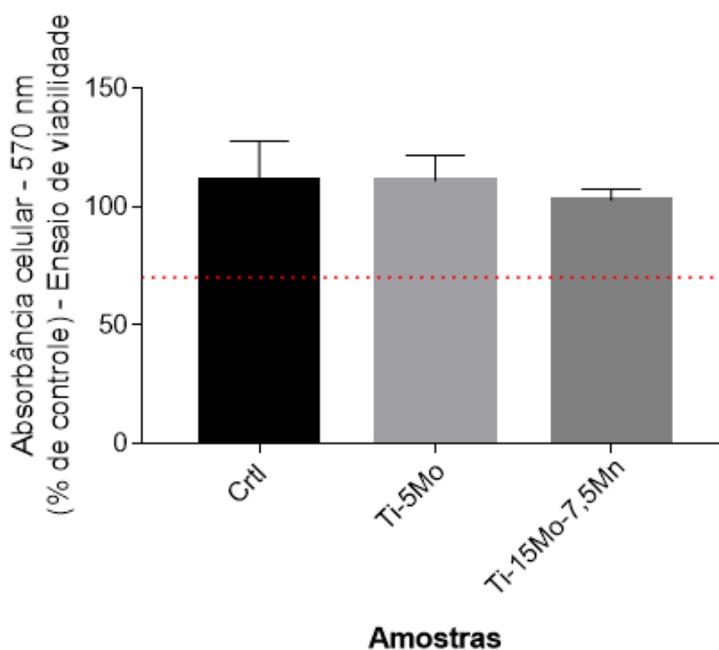


Figura 10: Comparação do ensaio de viabilidade celular entre grupo de controle e as ligas Ti-5Mo, Ti-15Mo-7,5Mn.

As ligas Ti-5Mo e Ti-15Mo-7,5Mn não demonstraram citotoxicidade, com um percentual de absorbância acima de 70%.

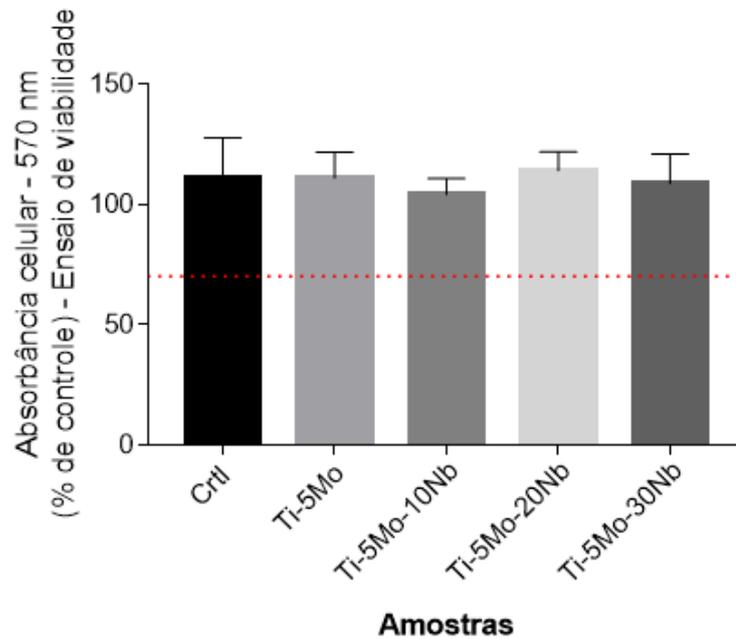


Figura 11: Comparação do ensaio de viabilidade celular entre grupo de controle e as ligas Ti-5Mo, Ti-5Mo-10Nb, Ti-5Mo-20Nb, Ti-5Mo-30Nb.

Novamente, a liga Ti-5Mo não apresentou citotoxicidade, assim como as ligas Ti-5Mo-10Nb, Ti-5Mo-20Nb e Ti-5Mo-30Nb que tiveram o percentual de absorbância celular acima de 70%.

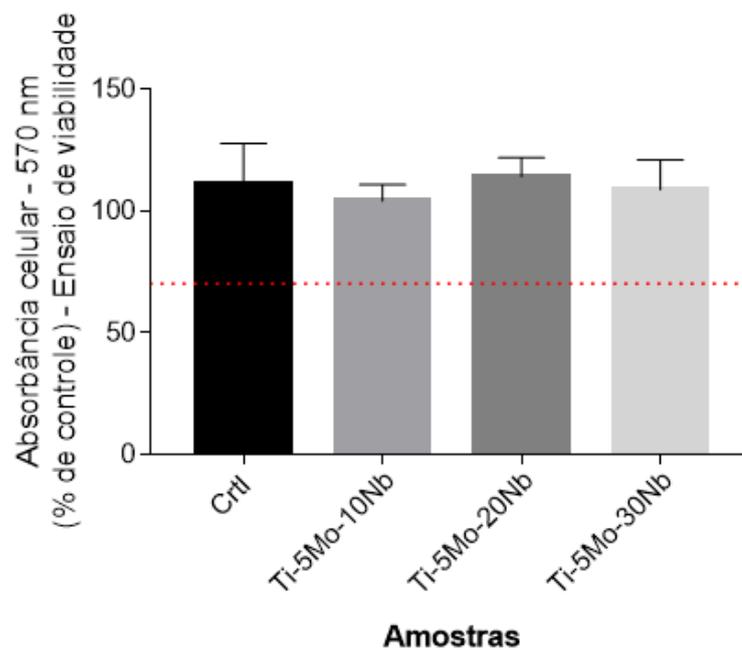


Figura 12: Comparação do ensaio de viabilidade celular entre grupo de controle e as ligas Ti-5Mo-10Nb, Ti-5Mo-20Nb, Ti-5Mo-30Nb.

Nessa figura, as mesmas ligas citadas anteriormente podem ser observadas, novamente não apresentando citotoxicidade.

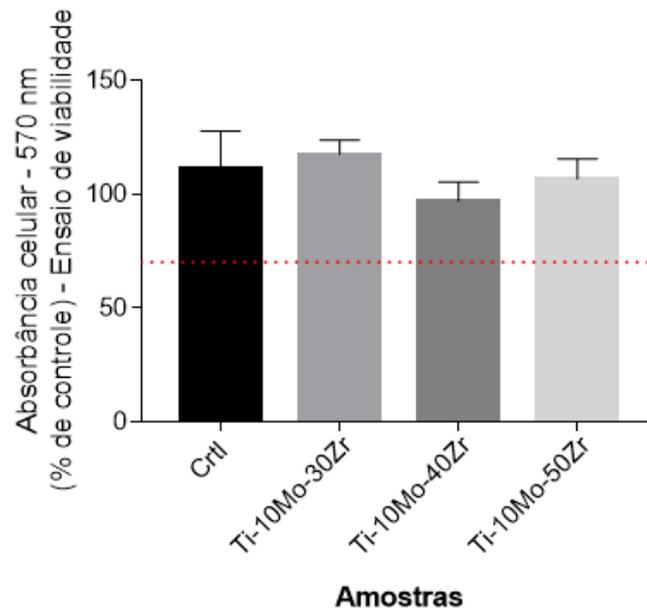


Figura 13: Comparação do ensaio de viabilidade celular entre grupo de controle e as ligas Ti-10Mo-30Zr, Ti-10Mo-40Zr, Ti-10Mo-50Zr.

As ligas Ti-10Mo-30Zr, Ti-10Mo-40Zr e Ti-10Mo-50Zr não demonstraram ação citotóxica, tendo sua porcentagem de absorvância celular superior a 70%.

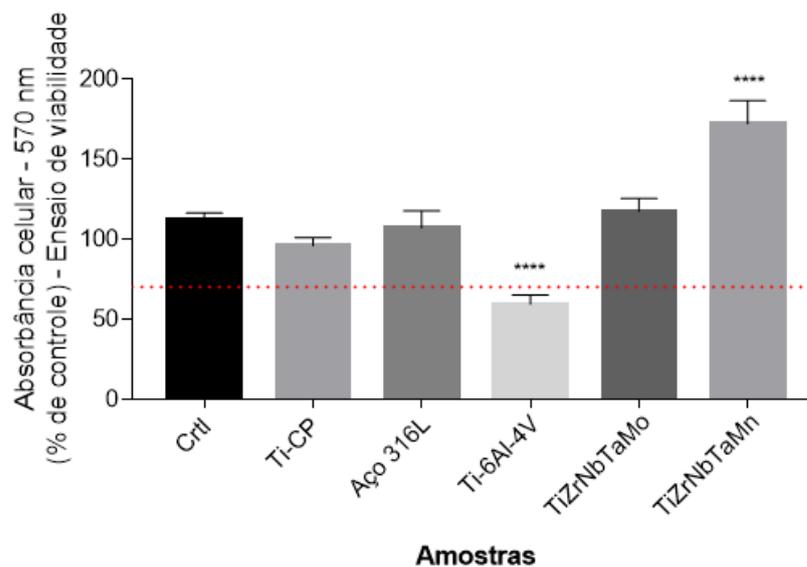


Figura 14: Comparação do ensaio de viabilidade celular entre grupo de controle e as ligas Ti-CP, Aço 316L, Ti-6Al-4V, Ti-Zr-Nb-Ta-Mo, Ti-Zr-Nb-Ta-Mn.

**** = 0,0001

**** = 0,0001

Nessa figura, pode-se fazer um comparativo entre as ligas estudadas, Ti-Zr-Nb-Ta-Mo e Ti-Zr-Nb-Ta-Mn, com as ligas popularmente comercializadas, como Ti-6Al-4V e o Aço 316L; enquanto o Aço 316L não apresentou citotoxicidade, a liga Ti-6Al-4V teve um percentual de absorbância celular abaixo de 70%.

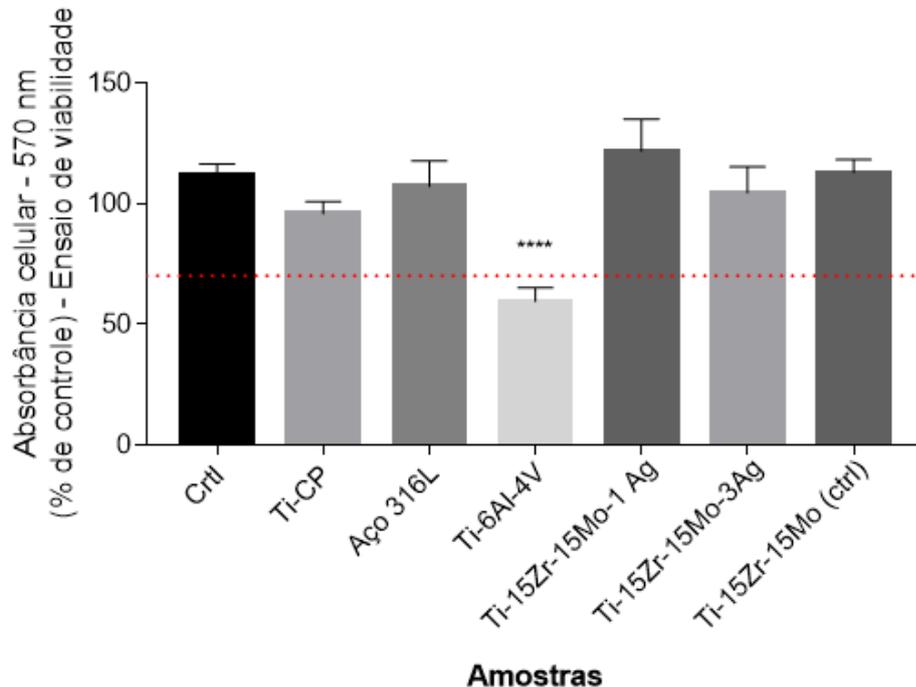


Figura 15: Comparação do ensaio de viabilidade celular entre grupo de controle e as ligas Ti-CP, Aço 316L, Ti-6Al-4V, Ti-15Zr-15Mo-1Ag, Ti-15Zr-15Mo-3Ag e Ti-15Zr-15Mo, também grupo de controle.

**** = 0,0001

Outra vez, há um comparativo entre as ligas estudadas, Ti-15Zr-15Mo-1Ag e Ti-15Zr-15Mo-3Ag, e as ligas popularmente comercializadas, Ti-6Al-4V e Aço 316L; neste ensaio, a liga Ti-6Al-4V também apresentou ação citotóxica, como pode ser observado por sua porcentagem de absorbância celular abaixo de 70%.

Pode-se observar que as novas ligas testadas nesses mesmos gráficos não apresentaram citotoxicidade, e também tiveram uma porcentagem de absorbância celular acima da liga Ti-6Al-4V e do grupo de controle, demonstrando que as células se mantiveram viáveis e que tem grande potencial primário para serem usadas futuramente como biomateriais.

4.2 Ensaio de adesão celular

Após o teste de citotoxicidade indireta, foram realizados os ensaios de adesão celular, que forneceram os resultados positivos para todas as novas ligas testadas. Elas não só tiveram uma porcentagem de absorbância celular superior a 70%, como também muitas vezes esteve acima do grupo de controle, parecendo haver um estímulo da proliferação celular. Estes dados podem ser observados nas figuras a seguir:

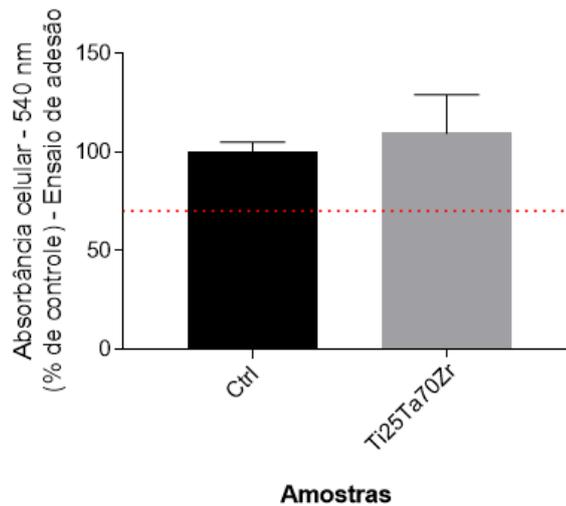


Figura 16: Comparação do ensaio de adesão celular entre o grupo controle e a ligaTi-25Ta-70Zr.

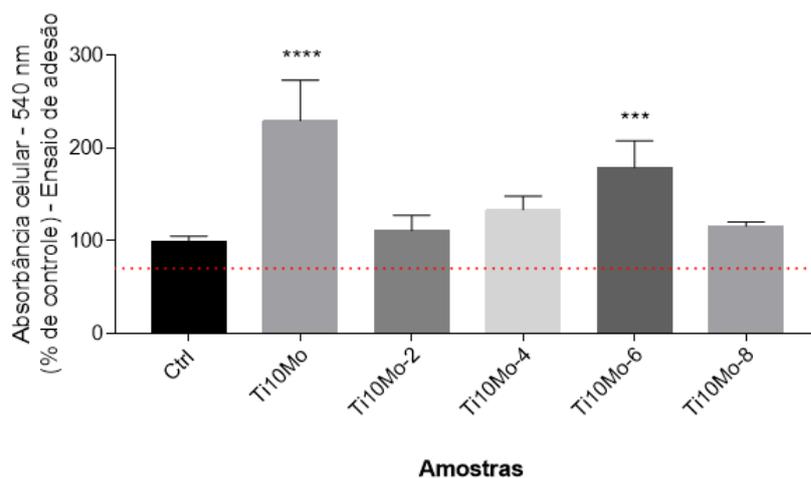


Figura 17: Comparação do ensaio de adesão celular entre o grupo controle e a liga Ti-10Mo.

**** = 0,0001

*** = 0,0005

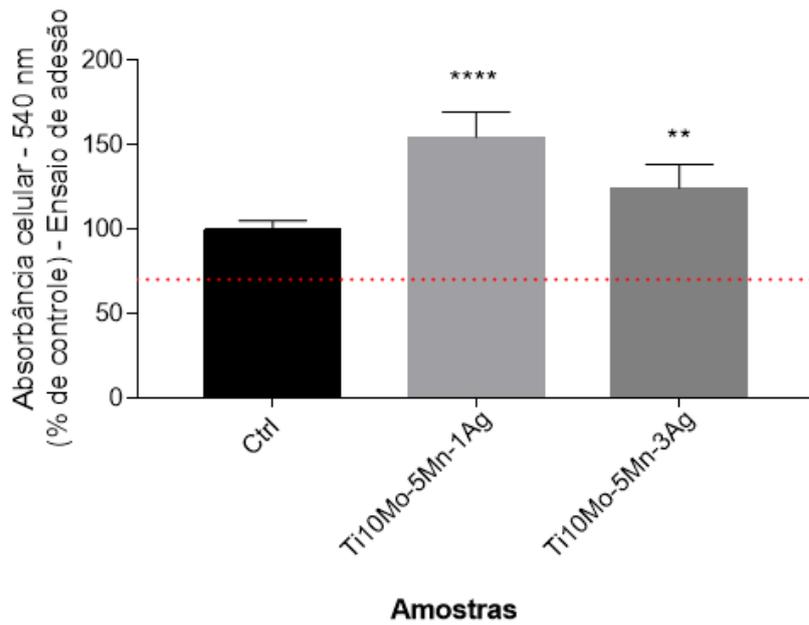


Figura 18: Comparação do ensaio de adesão celular entre o grupo controle e as ligas Ti-10Mo-Mn-1Ag e Ti-10Mo-5Mn-3Ag.

**** = 0,0001

** = 0,0053

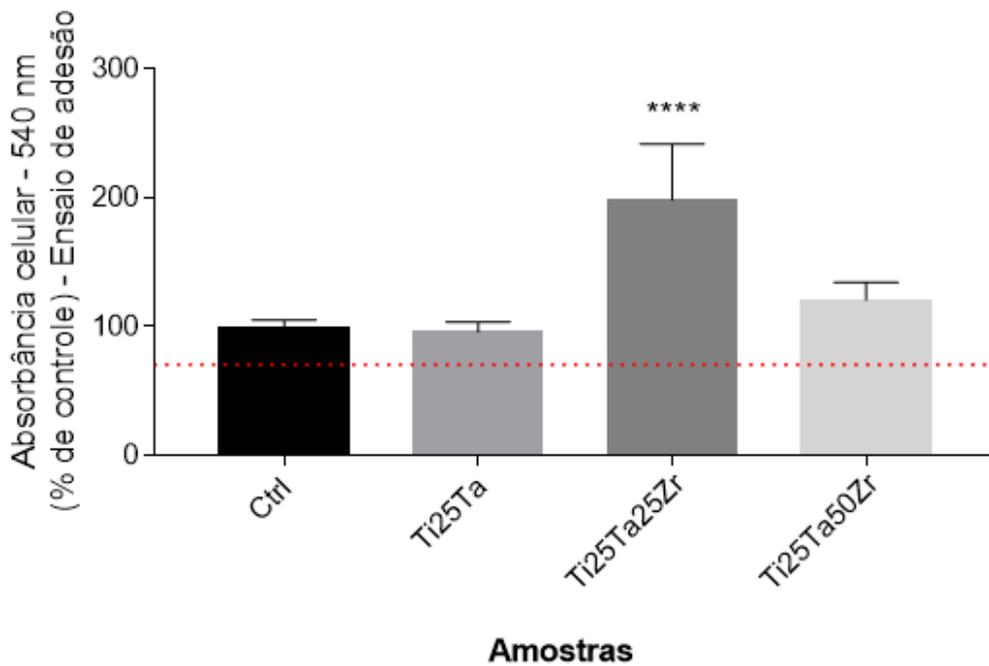


Figura 19: Comparação do ensaio de adesão celular entre o grupo controle e as ligas Ti-25Ta, Ti-25Ta-25Zr e Ti-25Ta-50Zr.

**** = 0,0001

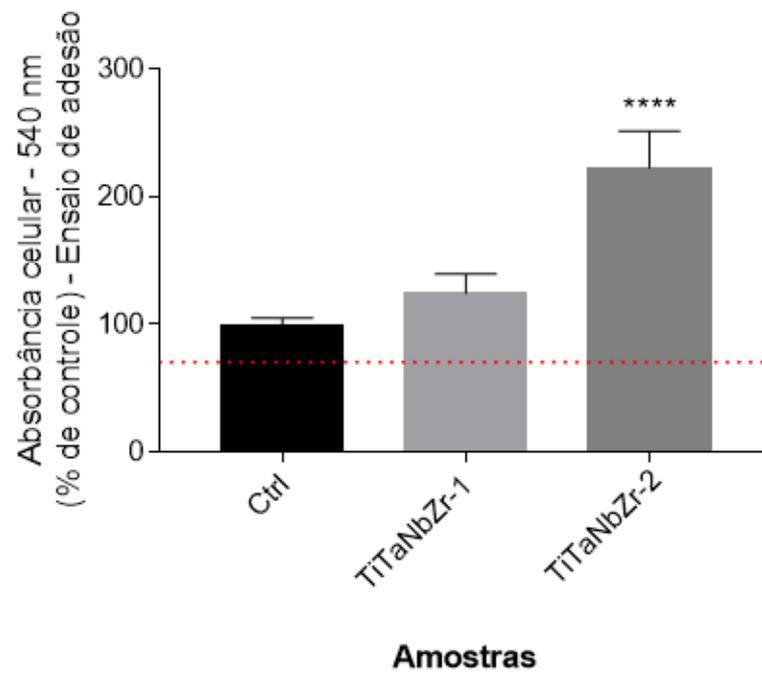


Figura 20: Comparação do ensaio de adesão celular entre o grupo controle e a liga Ti-Ta-Nb-Zr.

**** = 0,0001

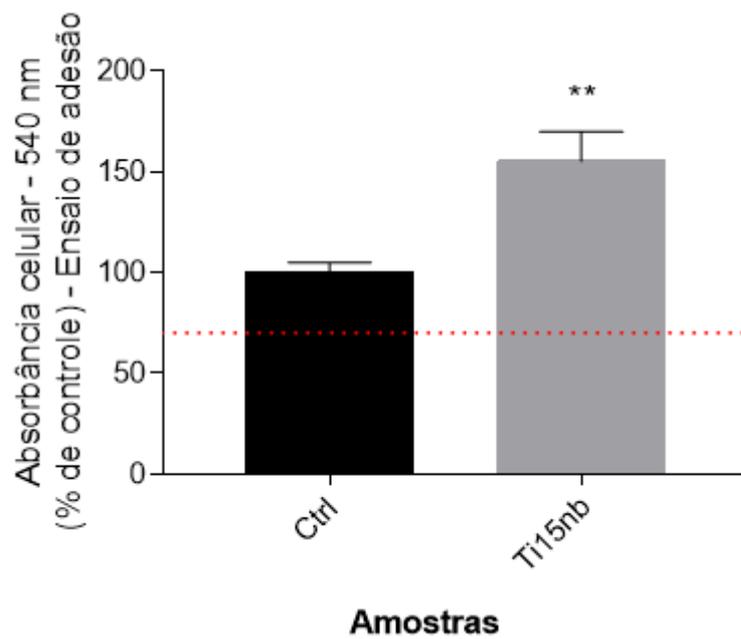


Figura 21: Comparação do ensaio de adesão celular entre o grupo controle e a liga Ti-15Nb.

** = 0,0027

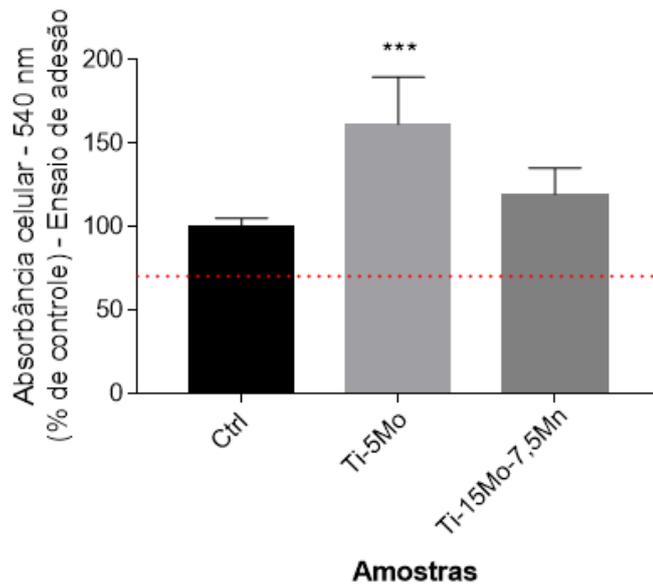


Figura 22: Comparação do ensaio de adesão celular entre o grupo controle e as ligas Ti-5Mo e Ti-15Mo-7,5Mn.

**** = 0,0005

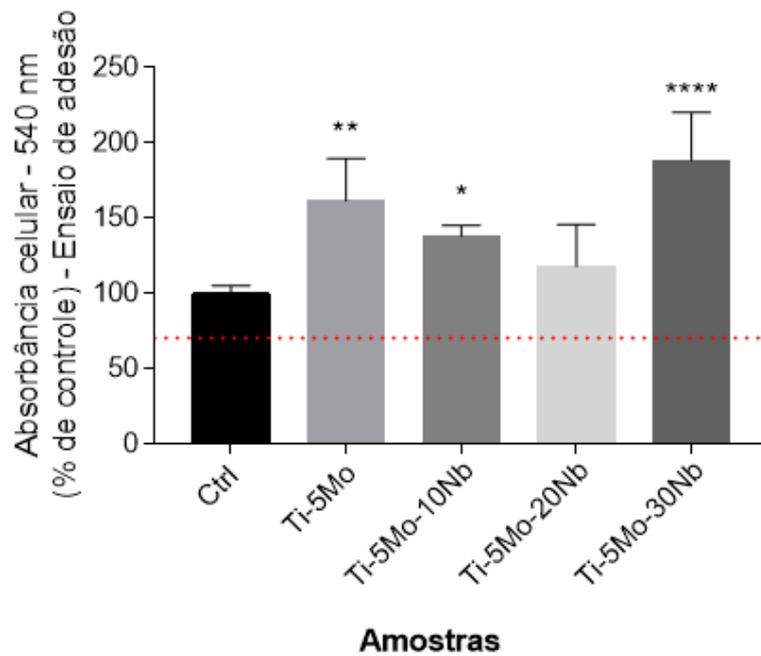


Figura 23: Comparação do ensaio de adesão celular entre o grupo controle e as ligas Ti-5Mo, Ti-5Mo-10Nb, Ti-5Mo-20Nb e Ti-5Mo-30Nb.

** = 0,0013

* = 0,0357

**** = 0,0001

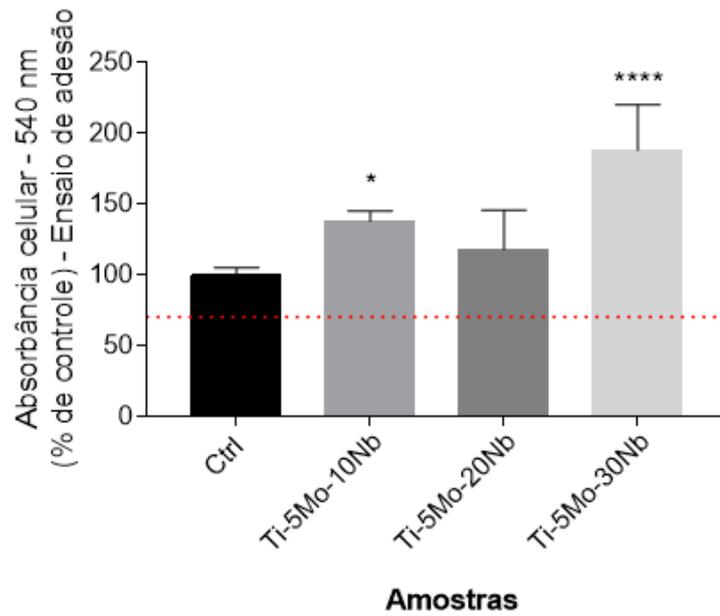


Figura 24: Comparação do ensaio de adesão celular entre o grupo controle e as ligas Ti-5Mo-10Nb, Ti-5Mo-20Nb e Ti-5Mo-30Nb.

* = 0,0225

**** = 0,0001

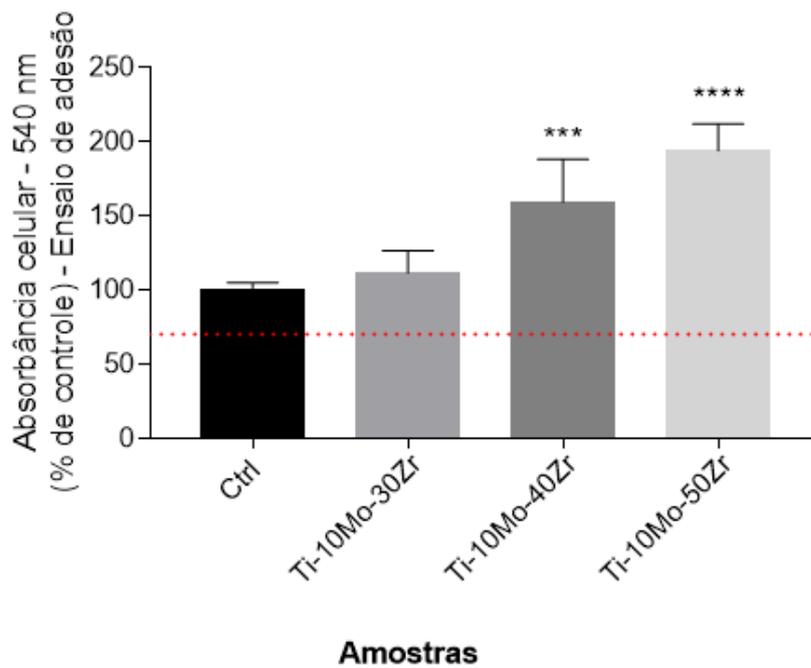


Figura 25: Comparação do ensaio de adesão celular entre o grupo controle e as ligas Ti-10Mo-30Zr, Ti-10Mo-40Zr e Ti-10Mo-50Zr.

*** = 0,0003

**** = 0,0001

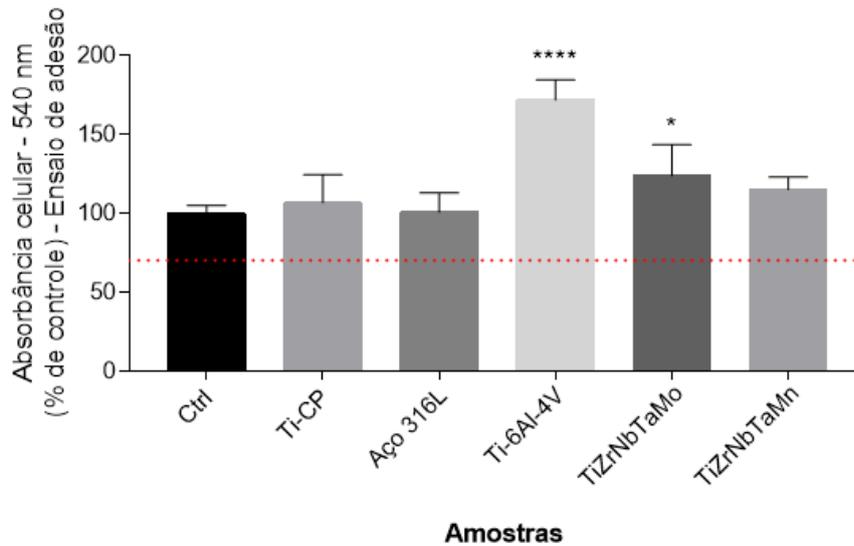


Figura 26: Comparação do ensaio de adesão celular entre o grupo controle e as ligas Ti-CP, Aço 316L, Ti-6Al-4V, Ti-Zr-Nb-Ta-Mo e Ti-Zr-Nb-Ta-Mn.

**** = 0,0001

* = 0,0393

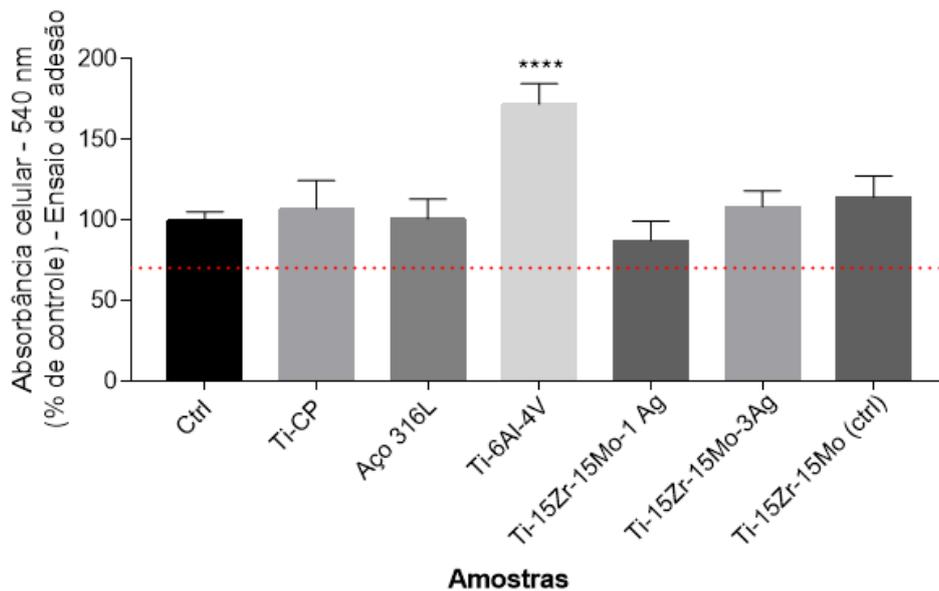


Figura 27: Comparação do ensaio de adesão celular entre o grupo controle e as ligas Ti-CP, Aço 316L, Ti-6Al-4V, Ti-15Zr-15Mo-1Ag, Ti-15Zr-15Mo-3Ag e Ti-15Zr-15Mo, também grupo de controle.

**** = 0,0001

Nas figuras 26 e 27, onde há novamente a comparação entre as novas ligas estudadas e as comerciais, pode-se observar que nesse teste a liga Ti-6Al-4V teve porcentagem de absorvância celular superior a das novas ligas, resultado que será discutido posteriormente.

5. DISCUSSÃO

Como pode ser observado nos gráficos apresentados anteriormente, todas as novas ligas à base de titânio estudadas obtiveram uma porcentagem de absorbância celular superior a 70% no ensaio de viabilidade celular, não demonstrando citotoxicidade relevante quando em contato com as células, levando em conta as normas propostas pela ISO:10993-5 de 2009. Algumas ligas se mantiveram abaixo do grupo de controle, como a Ti-10Mo-5Mg-1Ag (aproximadamente 19% a menos, 82% de absorbância celular total), entretanto, como dito no tópico de materiais e métodos, precisa-se levar em conta que o grupo de controle é um meio propício para sobrevivência celular, e que o dado que deve ser considerado para a definição da citotoxicidade é a porcentagem de absorbância celular. Assim, mesmo as ligas que se mantiveram abaixo do grupo de controle não necessariamente tiveram ação citotóxica.

Confirmando aquilo que já havia sido proposto por outros autores (MARCU et al., 2021; ZHANG; REN; YANG, 2021), em ambos os ensaios de viabilidade celular em que a liga Ti-6Al-4V se fez presente, nas figuras 14 e 15, ela demonstrou ter ação citotóxica nas células, tendo a porcentagem de absorbância celular abaixo de 70%. Isso apenas reforça a necessidade de se buscar novas ligas a base de titânio que tenham um melhor potencial primário que as ligas populares. Por sua vez, o aço inoxidável ou Aço 316L não demonstrou ação citotóxica no ensaio de viabilidade celular; como citado anteriormente, o problema associado a essa liga é que a longo prazo não permite a integração do material com a matriz óssea (ou osseointegração) (BRAGUIN, 2021), fator que não pode ser observado com o teste de citotoxicidade indireta, que mede apenas a sobrevivência celular e a proliferação de células osteogênicas. Mesmo assim, diversas outras ligas testadas obtiveram uma porcentagem de absorbância celular superior à do aço inoxidável, como a Ti-10Mo-30Zr (aproximadamente 11% de absorbância celular a mais), observada na figura 13, e Ti-10Mo (aproximadamente 60% a mais de absorbância celular a mais), na figura 5, dessa forma tendo ação menos citotóxica que o Aço 316L e sendo menos prejudiciais à atividade mitocondrial celular.

Previamente, ligas à base de titânio, tântalo e zircônio já haviam tido seu nível de citotoxicidade testado, embora a quantidade percentual de cada um destes

materiais tenha sido diferente do estudo atual; a liga de Ti-25Ta-10Zr não demonstrou ação citotóxica em pesquisas anteriores (QUADROS, 2019), de forma que novas ligas utilizando diferentes níveis tântalo e zircônio aliado ao titânio vieram a ser estudadas. As ligas Ti-25Ta-70Zr, figura 4, Ti-25Ta-25Zr e Ti-25Ta-50Zr, figura 7, também não tiveram ação citotóxica, demonstrando que essa combinação de materiais em específico parece ter um grande potencial no que se refere à ausência de citotoxicidade, corroborando com aquilo proposto por Quadros (2019).

Outro conjunto de materiais que já havia sido estudado antes era o Ti-10Nb e Ti-20Nb, que não apresentou ação citotóxica e levou a proposta que diferentes percentuais dessa mesma liga também não seriam citotóxicos (LUZ, 2019). Dessa forma buscou-se testar a liga Ti-15Nb, que assim como os estudos passados não demonstrou citotoxicidade, comprovando que essa combinação de materiais tem grande potencial primário e vão de acordo com os resultados obtidos por Luz (2019). Também pode-se encontrar pesquisas prévias envolvendo apenas os aspectos físico-químicos de ligas a base de titânio, zircônio e molibdênio, como as ligas Ti-20Zr-Mo (KURODA et al., 2020) e Ti-15Zr-Mo (CORREA et al., 2019), onde não se foram realizados testes de citotoxicidade; as ligas Ti-15Zr-15Mo-1Ag e Ti-15Zr-15Mo-3Ag, na figura 15, tem composição material semelhante àquelas citadas anteriormente, alterando apenas seu teor e acrescentando a prata, e não obtiveram ação citotóxica neste ensaio, evidenciando que estes materiais em conjunto parecem não ser prejudiciais à sobrevivência celular. Entretanto, devem ser realizados estudos específicos para as ligas pesquisadas por estes autores, para averiguar se os resultados serão semelhantes aos apresentados nesse presente trabalho ou não.

Para as ligas com os materiais Ti-5Mo-10Nb, Ti-5Mo-20Nb e Ti-5Mo-30Nb, os resultados obtidos por outros autores na literatura se assemelham dos resultados obtidos no estudo atual; as pesquisas realizadas por Neacsu et al. (2015) demonstram que ligas de Ti-Mo-Nb, com outros percentuais, não demonstraram citotoxicidade nos ensaios de viabilidade celular, enquanto os resultados dos ensaios de adesão celular também foram favoráveis. Entretanto, há grande diferença metodológica com os ensaios realizados por este autor, que se utilizou da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para inferir se a adesão celular realmente estava sendo favorecida; o artigo também vai além, estudando outros aspectos essenciais para a sobrevivência celular. Mesmo com a diferença metodológica existiram resultados semelhantes e

positivos, todavia, poderiam ser realizadas mudanças metodológicas neste presente trabalho para se garantir uma melhoria dos resultados, bem como poderia ser realizado a MEV para garantir que os processos de adesão celular estejam ocorrendo corretamente.

No que se refere as ligas Ti-10Mo-30Zr, Ti-10Mo-40Zr e Ti-10Mo-50Zr, podem ser encontrados estudos na literatura das ligas semelhantes Ti-10Mo-Zr e Ti-15Mo-Zr realizados por Araújo et al. (2016), que também não demonstraram ação citotóxica nos ensaios realizados, de forma a corroborar com os resultados obtidos nesse presente trabalho, embora não seja apresentada a metodologia utilizada em detalhes. As ligas inicialmente citadas têm apenas estudos físico-químicos como indicadores de potencial para serem utilizado como biomaterial (RODRIGUES; LOPES; GRANDINI, 2021), de forma que esta pesquisa complementa os estudos prévios, podendo inferir que esse conjunto de ligas tem potencial primário para ser utilizado como biomaterial. Quanto a liga Ti-Ta-Nb-Zr, os resultados foram semelhantes a aqueles encontrados na literatura (STENLUND et al., 2015), onde a liga não apresentou citotoxicidade seguindo as mesmas normas para a ISO:10993-5, embora tenha sido utilizada uma metodologia diferente. Já a liga Ti-Zr-Nb-Ta-Mo apresenta um longo estudo envolvendo suas propriedades físico-químicas, mas as análises de biocompatibilidade são apenas comparações com outras ligas compostas por materiais semelhantes, sem existir uma análise própria para viabilidade ou adesão celular neste trabalho (HUA et al., 2021), fazendo com que não exista uma forma de comparar os resultados obtidos com pesquisas anteriores.

Por fim, as ligas Ti-10Mo-5Zr-1Ag, Ti-10Mo-5Zr-3Ag, Ti-15Mo-7,5Mg, Ti-Zr-Nb-Ta-Mg, Ti-10Mo-5Mg-1Ag, Ti-10Mo-5Mg-3Ag não apresentam estudos acerca de sua atividade citotóxica, de forma que as análises realizadas neste presente trabalho são as primeiras feitas para esses conjuntos de ligas, inferindo que esses materiais apresentaram potencial primário para serem utilizados como biomateriais, podendo passar para fases seguintes de testes.

Em relação aos ensaios de adesão celular, podem-se encontrar alguns dos resultados mais interessantes do trabalho: quase todas as ligas estudadas obtiveram resultados não só acima de 70% de absorvência celular, como também superiores aos do grupo de controle. Enquanto a liga Ti-6Al-4V demonstrou ter ação citotóxica no ensaio de viabilidade celular, no teste de adesão celular essa mesma liga esteve

muito acima do grupo de controle e de outras ligas também estudadas no trabalho. Todavia, é importante ressaltar que mesmo estudos posteriores envolvendo o teste de cristal violeta já evidenciaram que este se trata de um método simples, porém pouco específico, que deve ser realizado em conjunto com outros testes, (CHIBA; KWAKAMI; TOHYAMA, 1998) como o próprio ensaio de MTT indireto. Dessa forma, é importante se levar em conta os resultados de ambos os ensaios realizados, em que a liga não demonstra citotoxicidade após passar pelo MTT indireto e cristal violeta em conjunto, o que pode ser observado em todas as novas ligas estudadas, demonstrando que os testes obtiveram resultados duplamente positivos em que as células se mantiveram viáveis nos dois testes.

Para trabalhos futuros podem ser realizadas mudanças metodológicas para garantir melhor confiabilidade dos resultados, como por exemplo aumentar o tempo de exposição do material com o meio de cultura para 32 horas ou 48 horas, bem analisar as células a partir do MEV para inferir a qualidade das células após o contato com as ligas, atestando assim se os biomateriais apresentaram ou não atividade citotóxica sobre novas condições.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que as novas ligas de titânio estudadas neste presente trabalho não obtiveram ação citotóxica em nenhum dos ensaios realizados, seguindo as normas propostas pela ISO:10993-5. Assim, todas as novas ligas demonstraram potencial primário para serem utilizadas como biomateriais, podendo passar para as fases seguintes de testes, buscando a osseointegração e outros fatores associados a biocompatibilidade, para que possam chegar ao mercado e garantirem uma melhor qualidade de vida àqueles que precisam se utilizar de biomateriais no dia a dia.

7. REFERÊNCIAS

ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Newman-Keuls test and Tukey test. *Encyclopedia of research design*, v. 2, p. 897-902, 2010.

ARAÚJO, R. O. et al. Development of novel beta Ti-Mo-Zr alloys for biomedical applications. **10th World Biomaterials Congress**, 2016.

BALTATU, M. S. et al. Biocompatible titanium alloys used in medical applications. **Rev. Chim**, v. 70, n. 4, p. 1302-1306, 2019.

BALTATU, M. S. et al. New Titanium Alloys, Promising Materials for Medical Devices. **Materials**, v. 14, n. 20, p. 5934, 2021.

BRAGUIN, L. N. M. Caracterização química, eletroquímica e de citotoxicidade do aço inoxidável AISI 316L para uso como biomaterial. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

BRIZUELA, A. et al. Influence of the elastic modulus on the osseointegration of dental implants. **Materials**, v. 12, n. 6, p. 980, 2019.

CAHA, I. et al. Degradation behavior of Ti-Nb alloys: Corrosion behavior through 21 days of immersion and tribocorrosion behavior against alumina. **Corrosion Science**, v. 167, p. 108488, 2020.

CHERNOZEM, R. V. et al. Comprehensive Characterization of Titania Nanotubes Fabricated on Ti-Nb Alloys: Surface Topography, Structure, Physicomechanical Behavior, and a Cell Culture Assay. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 6, n. 3, p. 1487-1499, 2020.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicology in vitro**, v. 12, n. 3, p. 251-258, 1998.

CORREA, D. R. N. et al. Adjustment of the microstructure and selected mechanical properties of biomedical Ti-15Zr-Mo alloys through oxygen doping. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 775, p. 158-167, 2019.

CORREA, D. R. N. et al. Microstructure and selected me-chemical properties of aged Ti-15Zr-based alloys for biomedical applications. **Materials Science and Engineering**, v. 91, p. 762-771, 2018.

CORREA, D. R. N. et al. On the mechanical biocompatibility of Ti-15Zr-based alloys for potential use as load-bearing implants. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 9, n. 2, p. 1241-1250, 2020.

COSTA, B. C. et al. Vanadium ionic species from degradation of Ti-6Al-4V metallic implants: In vitro cytotoxicity and speciation evaluation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 96, p. 730-739, 2019.

CRIST, T. E. et al. Biomaterials in Craniomaxillofacial Reconstruction: Past, Present, and Future. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 32, n. 2, p. 535-540, 2021.

DA SILVA, R. A. et al. The Impact of Bioactive Surfaces in the Early Stages of Osseointegration: An In Vitro Comparative Study Evaluating the HAnano® and SLActive® Super Hydrophilic Surfaces. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

DA COSTA FERNANDES, C. J. et al. Zirconia stimulates ECM-remodeling as a prerequisite to pre-osteoblast adhesion/proliferation by possible interference with cellular anchorage. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 4, p. 1-11, 2018.

GHASEMI-MOBARAKEH, L. et al. Key terminology in biomaterials and biocompatibility. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, v. 10, p. 45-50, 2019.

HARRIS, J. J.; LU, S.; GABRIELE, P. Commercial challenges in developing biomaterials for medical device development. **Polymer International**, v. 67, n. 8, p. 969-974, 2018.

HUA, N. et al. Mechanical, corrosion, and wear properties of biomedical Ti–Zr–Nb–Ta–Mo high entropy alloys. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 861, p. 157997, 2021.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. ISO:10993-5: Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **Geneve, Switzerland**, 2009.

ISTIFLI, E. S.; ILA, H. B. Cytotoxicity: Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds. 1. ed. London: **IntenChOpen**, 2019.

KIM, T. K. Understanding one-way ANOVA using conceptual figures. **Korean journal of anesthesiology**, v. 70, n. 1, p. 22, 2017.

KLOK, S. M. Avaliação dos diferentes biomateriais aplicados à composição de próteses ortopédicas. **Revista UNIANDRADE**, v. 20, n. 1, p. 37-43, 2019.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold spring harbor protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb. prot095505, 2018.

KURODA, P. A. B. et al. Development and Characterization of New Ti-25Ta-Zr Alloys for Biomedical Applications. **Materials Science Forum**. Trans Tech Publications Ltd, v. 1016, p. 137-144, 2021.

KURODA, P. A. B. et al. Effect of Titanium Addition on the Structure, Microstructure, and Selected Mechanical Properties of As-Cast Zr-25Ta-xTi Alloys. **Metals**, v. 11, n. 10, p. 1507, 2021.

KURODA, P. A. B. et al. Thermomechanical treatments influence on the phase composition, microstructure, and selected mechanical properties of Ti–20Zr–Mo alloys

system for biomedical applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 812, p. 152108, 2020.

KURODA, P. A. B.; NASCIMENTO, M. V. do; GRANDINI, C. R. Preparação e caracterização de uma liga de titânio com a adição de tântalo e zircônio para aplicações biomédicas. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 25, n. 2, 2020.

LOURENÇO, M. L. et al. Development of novel Ti-Mo-Mn alloys for biomedical applications. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.

LUZ, A. R. et al. Tribo-mechanical properties and cellular viability of electrochemically treated Ti-10Nb and Ti-20Nb alloys. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 779, p. 129-139, 2019.

MARCU, T. et al. In vitro evaluation of the cyto-and genotoxicity of titanium and titanium-based alloy Ti-6Al-4V used in the manufacture of screw type dental implants-preliminary study. **Romanian Journal of Medical Practice**, v. 16, n. 2, 2021.

MARIN, E.; BOSCHETTO, F.; PEZZOTTI, G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 108, n. 8, p. 1617-1633, 2020.

MORAES, F. R. N. et al. Métodos de estudo de biofilmes em endodontia-uma revisão de literatura. **Archives of health investigation**, v. 7, 2018.

NEACSU, P. et al. In vitro performance assessment of new beta Ti-Mo-Nb alloy compositions. **Materials Science and Engineering: C**, v. 47, p. 105-113, 2015.

QUADROS, F. de F. et al. Preparation, structural and microstructural characterization of Ti-25Ta-10Zr alloy for biomedical applications. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 8, n. 5, p. 4108-4114, 2019.

RODRIGUES, L. B. Aplicações de biomateriais em ortopedia. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 2, p. 63-76, 2013.

RODRIGUES, I. R.; LOPES, R. E. de L.; GRANDINI, C. R. Development of Novel As-Cast Ti-Mo-Zr Alloys for Biomedical Applications. **Materials Research**, v. 24, 2021.

SANTOS, G. R. dos. Mapeamento estratégico dos biomateriais utilizados em implantes. **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2019.

SIDHU, S. S.; SINGH, H.; GEPREEL, M. A-H. A review on alloy design, biological response, and strengthening of β -titanium alloys as biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, v. 121, p. 111661, 2021.

SIEMERS, C. et al. Aluminum-and vanadium-free titanium alloys for application in medical engineering. Titanium in Medical and Dental Applications. **Woodhead Publishing**, p. 477-492, 2018.

SILVA, S. B. T. et al. Reconstrução cirúrgica por biomateriais: uma revisão integrativa de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e03101220139-e03101220139, 2021.

SPEZZIA, S. Biomateriais. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 22, n. 2, p. 83-84, 2020.

STENLUND, P. et al. Bone response to a novel Ti-Ta-Nb-Zr alloy. **Acta biomaterialia**, v. 20, p. 165-175, 2015.

SUVANEETH, P.; NAIR, N. D. Biomaterials and biocompatibility. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 10, p. 161-171, 2018.

TODROS, S.; TODESCO, M.; BAGNO, A. Biomaterials and Their Biomedical Applications: From Replacement to Regeneration. **Processes**, v. 9, n. 11, p. 1949, 2021.

TOLEDANO, M. et al. State of the Art on Biomaterials for Soft Tissue Augmentation in the Oral Cavity. Part I: Natural Polymers-Based Biomaterials. **Polymers**, v. 12, n. 8, p. 1850, 2020.

TORRENTO, J. E.; GRANDINI, C. R.; CORREA, D. R. N. Processing and properties of Ti-15Zr-15Mo-(1-3) Ag alloys for applications as biofunctional materials. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 40, n. 1, 2021.

WILLIAMS, D. F. Assessing the triad of biocompatibility, medical device functionality and biological safety. **Medical Devices & Sensors**, v. 4, n. 1, p. e10150, 2021.

YANG, N. et al. Temperature Tolerance Electric Cell-Substrate Impedance Sensing for Joint Assessment of Cell Viability and Vitality. **ACS sensors**, v. 6, n. 10, p. 3640-3649, 2021.

ZHANG, J.; REN, L.; YANG, K. Cytotoxicity of Ti-6Al-4V-5Cu Alloy to MC3T3-E1 Cells. **Acta Metallurgica Sinica (English Letters)**, v. 34, n. 5, p. 694-700, 2021.