

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

SAULO RIBEIRO SILVEIRA

**Osseointegração, capacidade antimicrobiana e citotoxicidade de materiais para
implantes revestidos com compostos de grafeno (GO e rGO): uma revisão sistemática**

ORIENTADOR: PROFA. DRA ANDREA CANDIDO DOS REIS

RIBEIRÃO PRETO

2024

SAULO RIBEIRO SILVEIRA

Osseointegração, capacidade antimicrobiana e citotoxicidade de materiais para implantes revestidos com compostos de grafeno (GO e rGO): uma revisão sistemática

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Cirurgião(ã)-Dentista.

ORIENTADOR: PROFA DRA ANDREA CANDIDO DOS REIS

RIBEIRÃO PRETO

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de expressar minha mais profunda gratidão a Deus, cuja presença constante e orientação divina foram fundamentais em cada passo desta jornada acadêmica. Em meio aos desafios e às incertezas, sua luz iluminou meu caminho, fortalecendo minha fé e inspirando-me a persistir. Agradeço por conceder-me sabedoria e discernimento para enfrentar os obstáculos e superar as dificuldades.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha mãe, Joana Darc Canterucio Ribeiro Silveira, cujo amor incondicional e apoio inabalável foram fundamentais em cada etapa deste percurso acadêmico. Sua presença e encorajamento constante foram o alicerce sobre o qual construí meus sonhos e conquistas. Obrigado, mãe, por ser minha maior inspiração e por estar sempre ao meu lado, celebrando cada vitória e enfrentando cada desafio comigo e sempre colocando minha educação em primeiro lugar. Seu amor e apoio significam tudo para mim.

Aos meus irmãos Tiago e Silas, agradeço por estarem sempre ao meu lado, apoiando-me incondicionalmente.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à minha professora orientadora, Dra. Andrea Cândido dos Reis, cuja orientação e apoio foram fundamentais em cada passo deste processo acadêmico. Sua dedicação incansável, motivação contagiante e sabedoria foram verdadeiras fontes de inspiração e luz ao longo desta jornada. Obrigado, Dra. Andrea, por sua orientação perspicaz, paciência inabalável e compromisso em me ajudar a alcançar meu potencial máximo. Suas palavras de incentivo e conselhos sábios guiaram-me através dos desafios, e sou imensamente grato pela sua presença como mentora.

Agradeço imensamente a Simone Kreve e Beatriz Sahm por compartilharem seus vastos conhecimentos, que foram fundamentais para o enriquecimento deste trabalho.

Aos demais professores, agradeço por todo o ensinamento transmitido e por todo o carinho, vocês foram fundamentais para a concretização dessa vitória.

À faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e todos os seus funcionários, por terem me proporcionado anos incríveis, muito aprendizado e grandes amizades.

E a todos os meus amigos e colegas que estiveram presentes em minha trajetória, especialmente minha dupla, Vitor Yoiti Okada, por sua presença constante e apoio desde o primeiro dia de graduação e pela cumplicidade e lealdade.

“Salmos 91: 1-11: 1 Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará.

2 Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.

3 Porque ele te livrará do laço do passarinho, e da peste perniciosa.

4 Ele te cobrirá com as suas penas, e debaixo das suas asas te confiarás; a sua verdade será o teu escudo e broquel.

5 Não terás medo do terror de noite nem da seta que voa de dia,.

6 Nem da peste que anda na escuridão, nem da mortandade que assola ao meio-dia.

7 Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua direita, mas não chegará a ti.

8 Somente com os teus olhos contemplarás, e verás a recompensa dos ímpios.

9 Porque tu, ó Senhor, és o meu refúgio. No Altíssimo fizeste a tua habitação.

10 Nenhum mal te sucederá, nem praga alguma chegará à tua tenda.

11 Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem em todos os teus caminhos.”

RESUMO

SAULO RIBEIRO SILVEIRA, Osseointegração, capacidade antimicrobiana e citotoxicidade de materiais para implantes revestidos com compostos de grafeno (GO e rGO): uma revisão sistemática. 2024. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

O uso de compostos de grafeno apresentam excelentes propriedades mecânicas. Porém, é necessário avaliar os efeitos biológicos deste material. Esta revisão sistemática teve como objetivo observar e compreender por meio de estudos o estado atual da arte em relação à osseointegração, capacidade antimicrobiana e citotoxicidade do revestimento de grafeno aplicado na superfície de materiais de implantes dentários.

As pesquisas foram realizadas nas bases de dados PubMed, Embase, Science Direct, Web of Science e Google Scholar entre junho e julho de 2021 e atualizadas em maio de 2022. Os critérios incluíram estudos in vivo e in vitro que avaliaram a capacidade antimicrobiana e/ou osseointegração e/ou citotoxicidade de materiais de implantes dentários revestidos com compostos de grafeno. O risco de viés para estudos in vitro foi avaliado pela ferramenta JBI, e para estudos in vivo, foi utilizada a ferramenta de risco de viés para estudos em animais da Syrcle.

A busca nas bases de dados resultou em 176 artigos. Dos 18 artigos selecionados para leitura na íntegra, 16 permaneceram nesta revisão sistemática.

O uso de compostos de grafeno como revestimentos na superfície de materiais de implantes é promissor porque promove a osseointegração e possui capacidade antimicrobiana. Entretanto, mais estudos são necessários para garantir seu potencial citotóxico.

Palavras-chave: grafeno, óxido de grafeno, implantes dentários, zircônia, titânio, peek, alumínio, dissilicato, metilmetacrilato, citotoxicidade, osseointegração e regeneração óssea

ABSTRACT

SAULO RIBEIRO SILVEIRA, **Osseointegration, antimicrobial capacity and cytotoxicity of implant materials coated with graphene compounds: A systematic review**. 2024. 28 f
Course Completion Work – Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

The use of graphene's excellent mechanical properties. However, it is necessary to evaluate the biological effects of this material. This systematic review aimed to observe and understand through studies the current state of the art regarding osseointegration, antimicrobial capacity, and the cytotoxicity of graphene coating applied to the surface of dental implant materials.

Searches in PubMed, Embase, Science Direct, Web of Science, and Google Scholar databases were conducted between June and July 2021 and updated in May 2022 using the keywords: graphene, graphene oxide, dental implants, zirconium, titanium, peek, aluminum, disilicate, methyl-methacrylate, cytotoxicity, osseointegration, and bone regeneration. The criteria included in vivo and in vitro studies that evaluated antimicrobial capacity and/or osseointegration and/or cytotoxicity of dental implant materials coated with graphene compounds. The risk of bias for in vitro studies was assessed by the JBI tool, and for in vivo studies, Syrcle's risk of bias tool for animal studies was used.

The database search resulted in 176 articles. Of the 18 articles selected for full reading, 16 remained in this systematic review.

The use of graphene compounds as coatings on the surface of implant materials is promising because it promotes osseointegration and has antimicrobial capacity. However, further studies are needed to ensure its cytotoxic potential.

Keywords: Graphene oxide, Dental implant, Graphene coating, Cytotoxicity, Antimicrobial property, Osseointegration

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	11
2.2 PESQUISA ELETRÔNICA	11
2.3 SELEÇÃO DE ARTIGOS	12
2.4 RISCO DE VIÉS.....	12
3 RESULTADOS	12
3.1 RISCO DE VIÉS.....	12
3.2 TIPOS DE INTERVENÇÃO.....	12
3.2.1 Tipos de material para implante, produção do grafeno e aplicação do tratamento de superfície	12
3.2.2 Osseointegração	13
3.2.3 Capacidade antimicrobiana.....	15
3.2.4 Citotoxicidade	16
3.3 RISCO DE VIÉS.....	16
3.3.1 Risco de viés dos estudos in vitro	16
3.3.2 Risco de viés dos estudos in vivo	17
4 DISCUSSÃO	18
5 CONCLUSÃO.....	23

1 INTRODUÇÃO

Os nanomateriais baseados em grafeno representam um avanço tecnológico no desenvolvimento de materiais em nanoescala ¹. Em 1937, a existência do grafeno era questionável, pois consistia em uma camada atômica e, devido à sua estrutura nanométrica, era considerado um material instável por apresentar baixo ponto de ebulição ². No entanto, naquela época os pesquisadores não tinham um conhecimento completo da química do carbono, que pode agrupar-se em diferentes formas e originar estruturas constituídas por um grande número de átomos ^{3,4,5}. Esse conhecimento foi responsável por transformar em material que só existia na teoria na época ^{3,4,6}. Assim, em 2004, o óxido de grafeno foi produzido pelo processo de esfoliação mecânica. Este processo originou o grafeno puro relevante para os estudos da comunidade científica, ganhando o Prêmio Nobel de Física em 2010 ^{1,2,7}.

O grafeno é uma das formas cristalinas do carbono e possui várias formas de alotropia ^{2,8,9}. Apresenta uma única camada de átomos de carbono hibridizados sp² dispostos em um padrão semelhante a um favo de mel, com numerosos grupos funcionais contendo oxigênio (hidroxila, carboxila, etc.). Possui estrutura hexagonal, bidimensional, em forma de folha, com 140 pm de comprimento e 10 nm de espessura, que pode ser empilhada para gerar até 3 milhões de camadas em 1 mm ^{2,7,8,9}. O grafeno possui excelentes propriedades, como alta resistência à compressão, alta resistência à tração, alta elasticidade, alta impermeabilidade, grande área superficial, excelentes características biológicas e alta condutividade térmica e elétrica ^{8,9,10,11}. O tipo de hibridização dos átomos de carbono é a principal diferença entre os materiais à base de carbono, sendo o tipo sp² ou sp³ o ponto crítico na determinação das propriedades biológicas dos materiais à base de carbono ¹².

O grafeno pode ser modificado quimicamente para obter seu derivado oxidado, o óxido de grafeno (GO), que é marrom e preparado pela oxidação do grafite ^{7,13}. Esta forma é anfifílica, o que significa que possui uma região hidrofílica e outra hidrofóbica. Permite fácil funcionalização do material e pode ser usado para transportar medicamentos e melhorar as propriedades físicas, mecânicas e biológicas dos biomateriais ^{13,14}. O óxido de grafeno (GO) contém muitos grupos funcionais reativos de oxigênio que facilitam a ligação química entre GO e outras substâncias ¹⁵. Também pode ser utilizado na forma reduzida, sintetizado pela redução do óxido de grafeno (rGO) ^{7, 16}, que é preto e possui presença de radicais livres que

diminuem o número de ligações do oxigênio com o carbono, o que aumenta a estabilidade do material. e versatilidade ^{13,17,18}. É amplamente utilizado em diversos setores, como indústria automotiva, telecomunicações, tratamento de esgoto, medicina, biomedicina e, entre outros, na área odontológica ^{19,20,21}.

Na odontologia, seu uso está aumentando e diversos estudos estão sendo realizados ⁸. É utilizado como carreador de antimicrobianos na superfície de implantes, membranas e enxertos ósseos ²², como constituinte de adesivo dentário ^{23,24}, no clareamento dental e na cicatrização de feridas ²⁵. Em implantes dentários, é aplicado como revestimento superficial em ligas de titânio, zircônia, alumínio, dissilicato, PEEK (polímero de poliéter éter cetona) e PMMA (polimetilmetacrilato) para melhorar a osseointegração e reduzir a adesão microbiana. Os compósitos de grafeno são estudados por suas propriedades, como resistência mecânica, condutividade elétrica e térmica e grande área superficial que favorece a integração entre osso e implante e auxilia na eficácia antimicrobiana devido ao maior contato do grafeno com bactérias ^{8,26,27,28}. E ainda assim, os compostos de grafeno possuem propriedades biológicas que podem favorecer a osseointegração. O grafeno promove a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos na região peri-implantar e reduz a atividade dos fibroblastos, evitando a formação de tecido conjuntivo em áreas vizinhas ^{10,29}. Além disso, proporciona oxidação lenta de parte das camadas, aumentando a longevidade do implante, e também estimula a resposta bioquímica dos osteoblastos na deposição de cálcio, carregando em sua superfície fatores de crescimento e proteínas ativadoras celulares e antiinflamatórios esteroidais ou não esteroidais. ^{25,30,31}

A redução da formação de biofilme e do crescimento de microrganismos também é desejada no tratamento odontológico. Nesse sentido, os revestimentos de grafeno possuem mecanismo de ação direto através de sua estrutura de arestas vivas que atinge a membrana plasmática e também podem atuar através do estresse oxidativo que libera radicais livres altamente reativos e causam morte bacteriana ^{10,16}.

Apesar de apresentar ótimos resultados em osseointegração e atividade antimicrobiana, o grafeno ainda está em fase de pesquisa e tem pouca utilização ²¹. Suas propriedades estão sendo analisadas e um dos desafios é lidar com a citotoxicidade. Embora seja biocompatível, quando utilizado em altas concentrações pode ser prejudicial às células humanas e causar efeitos adversos, como danos diretos à membrana celular, estresse mecânico, extração de fosfolipídios e acúmulo de derivados de grafeno no interior das células

^{1,2}. Por conta disso, a toxicidade está associada à concentração do material e às suas formas hidrofílica e hidrofóbica ³².

Portanto, o objetivo deste estudo sistemático foi examinar e resumir a literatura científica atual sobre osseointegração, propriedades antimicrobianas e citotoxicidade de materiais utilizados para implantes dentários que possuem revestimentos de compostos de grafeno, especificamente óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO).). Esta revisão fornece uma visão abrangente e baseada em evidências do impacto desses revestimentos de grafeno na integração do implante com o osso, sua eficácia antimicrobiana e possíveis efeitos citotóxicos nos tecidos circundantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Critérios de elegibilidade

Esta revisão sistemática busca responder à seguinte questão: “Qual é o estado da arte atual sobre a capacidade antimicrobiana, osseointegração e citotoxicidade proporcionada pelo revestimento de grafeno na superfície de materiais de implantes dentários?”. Esta questão foi estruturada de acordo com o Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA), e o estudo foi registrado no Open Science Framework sob o número (<https://osf.io/enyua/>).

Foram incluídos artigos in vivo e in vitro que abordassem a capacidade antimicrobiana e/ou a osseointegração e/ou a citotoxicidade de implantes dentários com revestimentos de grafeno. Foram excluídos artigos que não utilizavam revestimento de grafeno na superfície de materiais de implantes dentários, estudos que associavam o grafeno a outros materiais, estudos clínicos, revisões sistemáticas, capítulos de livros, comunicações curtas, resumos de conferências, relatos de casos e opiniões pessoais. Os PICOS (Participantes; Intervenções; Comparações; Resultados; Desenhos de estudo) estão definidos na Tabela 1.

2.2 Pesquisa eletrônica

Palavras-chave apropriadas foram selecionadas e combinadas com o uso de operadores booleanos (AND, OR) utilizando as seguintes bases de dados: SCOPUS, PubMed/Medline, EMBASE, Web of Science e Google Scholar de acordo com as informações do Apêndice 1. Todas as buscas foram realizadas em 30 de julho de 2021 e atualizado em maio de 2022.

2.3 Seleção de artigos

Após a busca inicial nas bases de dados, os artigos resultantes foram anexados ao software Rayyan e avaliados por três autores independentes (R.S., S.D.B., K.S.) responsáveis por descartar estudos não relacionados ao assunto de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos. As divergências foram resolvidas por meio de discussão com o quarto revisor (R.C.A.).

2.4 Risco de viés

A qualidade e o risco de viés foram avaliados pela ferramenta de avaliação de estudos quase experimentais do Instituto Joanna Briggs ³³, que foi adaptada para outra revisão sistemática. Cada estudo foi classificado como de baixo risco (o viés, se presente, é improvável que altere seriamente os resultados), risco pouco claro (risco de viés que levanta alguma dúvida sobre os resultados, ou alto risco (o viés pode alterar seriamente os resultados). O SYRCLE A ferramenta foi aplicada para avaliar o risco de viés em estudos in vivo, que estima o risco de viés para estudos com animais ¹⁶. Esta ferramenta contém as seguintes categorias de avaliação: viés de seleção, viés de desempenho, viés de detecção, viés de atrito, viés de relatório e viés de relatório. outras fontes de viés foram aplicadas dez questões aos artigos incluídos na revisão sistemática, sendo as respostas “SIM” indicando baixo risco de viés, “NÃO” indicando alto risco de viés e “NÃO ESTÁ CLARO” indicando risco incerto de preconceito.

3 RESULTADOS

3.1 Risco de viés

Um total de 176 estudos foram identificados na busca inicial. Seguindo a declaração PRISMA, todos os resumos foram revisados. Após a exclusão de 78 artigos duplicados e aplicação dos critérios de inclusão, 18 artigos foram incluídos para avaliação do texto completo. Destes, 16 foram incluídos nesta revisão sistemática (fig. 1).

3.2 Tipos de intervenção

3.2.1 Tipos de material para implante, produção do grafeno e aplicação do tratamento de superfície

Os estudos incluídos nesta revisão sistemática aplicaram tratamento com grafeno a diversos materiais, como zircônia tetragonal estabilizada com ítria,^{10,11} zircônia,³⁴ PEEK^{26,35}, PMMA³⁶, titânio puro^{29,37,38,39,40,41,42,43} e ligas de titânio^{44,45}.

Os revestimentos de grafeno foram sintetizados principalmente pelos métodos Hummer modificado^{10,44} e Marcano modificado¹⁰. No entanto, a maioria dos artigos não relatou o método de fabricação utilizado^{11,26,29,34,35,36,37,38,39,40,41,43}.

As técnicas utilizadas para realizar o tratamento de superfície foram a técnica de dip-coating¹⁰, imersão em solução GO^{26,29,35,37}, deposição química de vapor, tratamento por plasma^{34,39,43}, pulverização por atomização ultrassônica^{40,41}, dispersão⁴⁵, pulverização com aerógrafo⁴², sinterização sob vácuo¹¹ e deposição eletroquímica⁴³. Um estudo não relatou o tratamento de superfície utilizado³⁶.

3.2.2 Osseointegração

Gu et al.³⁸, Jang et al.³⁴, Kang et al.²⁹, Kim et al.³⁹, Li et al.⁴⁰, Qin et al.²⁷, Rahnamaee et al.⁴⁴, Zhang et al.¹¹, Desante et al.¹⁰, Di Carlo et al.³⁷, Scarano et al.³⁶, Li et al.⁴⁵, Li et al.⁴¹ and Li et al.³⁵ evaluated the osseointegration of implant materials with a graphene oxide coating^{10,11,26,29,34,35,36,37,38,39,40,41,44,45}.

Desante et al.¹⁰ descobriram que os filmes de grafeno mostraram suporte para a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais, promovendo a formação de cálcio e a indução da diferenciação osteogênica. Tais resultados foram observados através do aumento da coloração de Alizarina e da expressão de RunX2 em comparação com o meio de crescimento. O mesmo foi visto por Li et al.⁴¹, como a modificação do óxido de grafeno (GO) na superfície do titânio mostrou efeitos benéficos na diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais e na polarização de macrófagos M2, indicando um potencial para melhorar a integração osso-implante e resolver problemas relacionados à má osseointegração e macrófagos. inflamação associada.

Kang et al.²⁹ observaram que substratos de titânio contendo rGO promoveram deposição extracelular de cálcio em células-tronco mesenquimais humanas, indicando formação de matriz osteóide mesmo sem agentes indutores osteogênicos.

Di Carlo et al.³⁷ cultivaram DPSCs (células-tronco da polpa dentária) por 28 dias e observaram cobertura celular completa da superfície de titânio revestida com GO com

características típicas de osteoblastos. Tais resultados foram observados por microscopia eletrônica de varredura.

O grafeno também melhorou a atividade da fosfatase alcalina e a mineralização em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e da medula óssea humana, sugerindo uma melhora na osteogênese.^{11,26,29,34,38,39, 40,41,44}

Jang et al.³⁴ não observaram diferença na adesão dos osteoblastos às superfícies de zircônia, no entanto, a proliferação e diferenciação celular foram maiores no grupo contendo GO. Li et al.⁴⁰ também descobriram que a modificação com GO na superfície do titânio promoveu a proliferação e adesão celular, resultando em aumento da mineralização da matriz extracelular. Li et al.⁴⁵ usaram revestimento rGO e também encontraram melhor adesão celular.

Qin et al.²⁶ descobriram que amostras de titânio modificadas por GO apresentaram maior quantidade de nódulos calcificados. A mineralização de cálcio foi observada em BMSCs por coloração com sal de cálcio.

Gu et al.³⁸ observaram que após 14-21 dias as superfícies de titânio modificadas com grafeno apresentaram coloração de mineralização mais forte do que os grupos sem grafeno para hASCs (células-tronco derivadas do tecido adiposo humano) e hBMMSCs (células-tronco mesenquimais da medula óssea humana).

Kim et al.³⁹ observaram um aumento substancial na diferenciação celular no grupo contendo óxido de grafeno (GO) em comparação com o grupo livre de óxido de grafeno. A diferenciação de células MC3T3-E1 foi analisada utilizando um ensaio ALP após cultura das células durante sete dias.

Rhanamae et al.⁴⁴ observaram um efeito positivo da funcionalização da superfície na diferenciação celular. Células cultivadas em amostras modificadas com óxido de grafeno produziram visualmente mais área de calcificação em comparação com amostras não revestidas.

Zhang et al.¹¹ observaram que a adição de 0,15% em peso de óxido de grafeno (GO) em compósitos cerâmicos promoveu maior expressão de fosfatase alcalina (ALP) e Runx2, indicando melhor diferenciação osteogênica em comparação aos compósitos sem GO.

Scarano et al.³⁶ descobriram que implantes de PMMA dopados com grafeno osseointegravam com o contato do osso cortical nas roscas superiores e osso recém-formado ou espaços medulares nas roscas inferiores. Nenhum tecido fibroso foi observado entre as superfícies óssea e do implante.

Li et al.³⁵ observaram formação óssea na macroporosidade de implantes de PEEK reforçados com fibra de carbono sulfonado recobertos com revestimento de óxido de grafeno (GO).

3.2.3 Capacidade antimicrobiana

Jang et al.³⁴, Kim et al.³⁹, Rho et al.⁴³, Gu et al.³⁸, Rahnamaee et al.⁴⁴ e Pranno et al.⁴² investigaram a capacidade antimicrobiana do revestimento de óxido de grafeno em materiais de implantes.

As superfícies de óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido apresentaram menor adesão e contagens de colônias bacterianas de *S. mutans*^{34,39,44}, *E. coli*³⁸, *P. gingivalis*^{34,39}, e *S. aureus*^{38,42,44}, em comparação com as superfícies sem grafeno.

No estudo de Jang et al.³⁴, além das contagens microbianas, a espessura do biofilme foi significativamente reduzida no grupo contendo GO.

Kim et al.³⁹ observaram que a atividade antimicrobiana foi fortemente afetada pela forma e rugosidade da superfície, porém, a atividade antibacteriana foi ainda maior no grupo com deposição de óxido de grafeno.

Rho et al.⁴³ observaram que a amostra de titânio tratada com plasma apresentou uma redução de 3,45% na quantidade de bactérias proliferadas. Embora a amostra depositada com óxido de grafeno apresentasse atividade antibacteriana, essa diferença não foi estatisticamente significativa, não sendo possível determinar se esse efeito se originou do plasma ou do grafeno.

Gu et al.³⁸ encontraram menor número de colônias bacterianas em superfícies de titânio com óxido de grafeno. E ainda, descobriram que a capacidade antibacteriana do grafeno pode ser mantida mesmo após infecção bacteriana e desinfecção com álcool 75%.

Rahnamaee et al.⁴⁴ estudaram titânio revestido com nanocamadas de grafeno e nanotubos de TiO₂ contendo uma camada nanoporosa. Os autores observaram que o revestimento de 75% de grafeno se mostrou eficaz na inibição da adesão bacteriana. E Pranno et al.⁴² descobriram que superfícies de titânio revestidas com diferentes tipos de nanoplacas de grafeno têm efeitos antibacterianos.

3.2.4 Citotoxicidade

Desante et al.¹⁰, Kim et al.³⁹, Li et al.⁴⁰, Li et al.⁴⁵, Li et al.³⁵, Di Carlo et al.³⁷, Rho et al.⁴³, Li et al.⁴¹, Qin et al.²⁷ e Zhang et al.¹¹ avaliaram a citotoxicidade de revestimentos de óxido de grafeno em materiais de implante^{10,11,26,35,38,39,40,41,43,45}.

Desante et al.¹⁰ descobriram que os filmes GO eram citocompatíveis tanto para fibroblastos de camundongo L929 quanto para células-tronco mesenquimais (MSC), observados por coloração LIVE/DEAD. Enquanto Di Carlo et al.³⁷ encontraram alta citotoxicidade após três dias de cultura de DPSCs (células-tronco da polpa dentária humana pós-natal), esta tendência diminuiu ao longo do tempo de cultura.

Li et al.⁴⁰ verificaram pela coloração de células BMSCs que o titânio modificado por GO é biocompatível. A modificação com GO não apresentou toxicidade. Li et al.⁴¹ também verificaram que o revestimento GO na superfície do titânio não apresentou efeito tóxico nas células MC3T3-E1, conforme observado na coloração fluorescente de células vivas e mortas. Li et al.⁴⁵ observaram maior viabilidade de células MC3T3-E em amostras de titânio revestidas com óxido de grafeno reduzido em comparação com amostras não revestidas, indicando boa biocompatibilidade dos revestimentos. Li et al.³⁵ verificaram por microscopia de fluorescência reversa que o revestimento GO em titânio promoveu a proliferação celular de células mesenquimais e não era citotóxico.

Kim et al.³⁹ observaram que a diferenciação de células MC3T3-E1 foi significativamente aumentada no grupo contendo óxido de grafeno. O mesmo foi visto por Rho et al.⁴³ que observaram aumento do crescimento, fixação e diferenciação de células osteoblásticas MC3T3-E1 em Ti depositado com óxido de grafeno. Qin et al.,²⁶ verificaram alta viabilidade celular de células mesenquimais e morfologia saudável indicando baixa citotoxicidade e toxicidade sistêmica. E finalmente, Zhang et al.¹¹ descobriram que o óxido de grafeno multicamadas (GO) em compósitos cerâmicos não apresentou cito

toxicidade, promoveu a proliferação celular e melhorou a adesão e a morfologia das células MC3T3-E1.

3.3 Risco de viés

3.3.1 Risco de viés dos estudos in vitro

Os resultados da avaliação da qualidade dos estudos estão resumidos nas Figuras 2 e 3. O risco de viés foi avaliado por uma ferramenta adaptada de avaliação de estudos quase-experimentais do Joanna Briggs Institute. Alguns autores avaliaram dados *in vitro* e *in vivo* no mesmo estudo. Dos estudos *in vitro* incluídos nesta revisão sistemática, a maioria apresentou baixo risco de viés. A exceção foi para o critério “Os resultados foram medidos de forma confiável?” o que mostrou alto risco de viés em todos os estudos porque os autores não relataram se o mesmo operador/técnico realizou o tratamento superficial dos implantes com óxido de grafeno e coletou os resultados. O critério “Houve grupo controle?” mostrou um risco de viés pouco claro para dois artigos ^{11,45} porque os autores não deixaram claras as informações sobre o grupo controle citando-o apenas na figura/tabela presente no artigo. E o critério “Houve múltiplas medições do desfecho antes e depois da intervenção/exposição?” mostraram um risco incerto de viés para o estudo por ²⁹, pois não estava claro se as medições dos resultados foram realizadas com o mesmo dispositivo/escala (Fig. 4, Fig. 5).

3.3.2 Risco de viés dos estudos *in vivo*

A avaliação do risco de viés de estudos *in vivo* foi realizada pela ferramenta de risco de viés do SYRCLE para estudos em animais. Do total de estudos incluídos nesta revisão sistemática, cinco ^{26,30,35,36,40} avaliaram modelos *in vivo* e *in vitro* no mesmo estudo.

A ferramenta SYRCLE avalia a qualidade metodológica de ensaios clínicos randomizados realizados em animais. Os estudos incluídos nesta revisão realizaram intervenções em animais de forma secundária, ou seja, complementares aos ensaios *in vitro* e sem objetivo de gerar evidências clínicas. Portanto, algumas questões não foram incluídas na análise de risco de viés.

Quanto ao critério “A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente?” três estudos ^{26,36,38} mostraram alto risco de viés porque não declararam se as amostras foram randomizadas. E dois estudos ^{35,40} mostraram um risco incerto de viés porque disseram que usaram amostras aleatórias, mas não descreveram como a randomização foi feita.

No critério “Os grupos eram semelhantes no início do estudo ou foram ajustados para fatores de confusão na análise?” todos os estudos mostraram baixo risco de viés.

No critério “Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento?” dois estudos ^{35,38} apresentaram alto risco de viés porque não descreveram se os animais foram selecionados aleatoriamente durante a avaliação dos resultados e não relataram as condições de alojamento do animal. O critério “Os dados incompletos dos resultados foram abordados de forma adequada?” mostraram um alto risco de viés para três estudos ^{35,38,40}, pois os autores não relataram dados de resultados incompletos e/ou consideraram dados faltantes.

No critério “Os relatórios do estudo estão isentos de relato seletivo de resultados?” todos os estudos apresentaram alto risco de viés porque os autores não disponibilizaram o protocolo dos estudos. Assim, foi impossível verificar se os desfechos primários e secundários pré-especificados foram relatados. E por fim, no critério “O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que pudessem resultar em alto risco de viés?” todos os estudos apresentaram baixo risco de viés.

A Tabela 2 contém informações sobre os estudos incluídos.

4 DISCUSSÃO

Esta revisão sistemática buscou avaliar os efeitos de osseointegração, atividade antimicrobiana e citotoxicidade de implantes dentários revestidos com compostos de grafeno.

Os estudos avaliaram duas formas do composto de grafeno, óxido de grafeno (GO) ^{10,11,26,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44} e óxido de grafeno reduzido (rGO) ^{29,45}. A maioria dos autores utilizou GO porque acredita-se que esta forma tenha potencial de osseointegração e atividade antimicrobiana, dada a sua maior quantidade de grupos funcionais oxigenados ^{10,37,44}.

Com base nos estudos incluídos, os compósitos de grafeno melhoraram a osseointegração ^{10,11,26,29,34,35,36,37,38,39,40,41,44,45}, reduziu a formação de biofilme ^{34,38,39,42,43,44} e mostrou baixa toxicidade ^{10,26,37,39,40,43,45}.

Todos os estudos que avaliaram a osseointegração ou diferenciação osteogênica mostraram resultados promissores ^{10,11,26,29,34,35,36,37,38,39,40,41,44,45} e foi sugerido que o aumento da osseointegração ou diferenciação osteogênica é resultado dos mecanismos de ação dos compostos de grafeno. A superfície do óxido de grafeno possui rugosidade que permite o

transporte de proteínas como a BMP-2, que promove a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais em osteoblastos e células osteorregenerativas no local do implante^{37,40,41,45}. Ambos os compostos GO e rGO estimulam a atividade da enzima fosfatase alcalina, um marcador bioquímico da formação óssea que reflete a atividade dos osteoblastos^{11,36,40,41,44}. Além disso, a osseointegração está altamente relacionada ao caráter hidrofílico do revestimento^{29,41}. A hidrofiliidade favorece altos níveis de adsorção de proteínas que podem aumentar a proliferação celular e a integração implante-tecido^{29,45}. Nesse sentido¹⁰, criaram um revestimento GO fino e macio em implantes de zircônia e observaram que, devido à quantidade de grupos hidroxila e carboxila presentes na superfície do GO, ele se tornou muito mais hidrofílico do que a zircônia não revestida. O estudo de³⁴ mostrou menor hidrofiliidade na zircônia revestida com GO em comparação com a zircônia não revestida. Esta menor hidrofiliidade afetou a adesão precoce das células osteoblásticas. No entanto, a presença de GO melhorou a proliferação e diferenciação celular^{40,41}, modificou superfícies de óxido de grafeno com SLA (jateamento de partículas grandes e ataque ácido) e observou melhora na hidrofiliidade e na capacidade de adsorção de proteínas. Portanto, a alta hidrofiliidade favorece a adesão celular se comparada à hidrofobicidade¹⁰. E a grande área superficial do GO, originada da molhabilidade da superfície hidrofílica, pode promover melhor adesão e proliferação celular²⁶.

GO também foi capaz de facilitar a fixação, proliferação e diferenciação osteogênica^{11,39} devido aos comportamentos celulares e adsorção de proteínas que podem ser regulados pelos abundantes grupos funcionais hidrofílicos presentes em GO^{26,29}. Em outras palavras, os numerosos grupos funcionais contendo oxigênio carregados negativamente interagem com fosfolipídios e proteínas da membrana celular e permitem que os osteoblastos se liguem às folhas de óxido de grafeno depositadas e depois proliferem³⁹. Dessa forma, as deposições de óxido de grafeno permitem a adsorção de alguns íons e proteínas bioativos sobre eles²⁹, o que promove a difusão dos filamentos de actina do citoesqueleto na matriz e estimula ainda mais a diferenciação osteogênica³⁹. De acordo com²⁹, o rGO também possui atividade osteogênica, que é conhecida por promover a adesão, disseminação e proliferação celular. Esta atividade osteogênica também é favorecida pela adsorção de proteínas e pela entrega intracelular de proteínas.

Derivados de grafeno como GO e rGO apresentam mecanismos semelhantes quando aplicados como revestimento em biomateriais para implantes. No entanto, apresentam características distintas quanto à sua hidrofiliicidade e citotoxicidade ^{29,45}.

Além da osseointegração, foi avaliado o efeito antimicrobiano dos compostos de grafeno. Os estudos incluídos nesta revisão sistemática mostram que o revestimento de grafeno pode causar inibição da formação de biofilme no implante ^{34,38,39,42,43,44}. Os estudos mostraram que os grupos sem o revestimento de nanomateriais apresentaram maiores populações bacterianas nos meios de cultura ^{34,38,39,42,43,44}.

Os principais mecanismos de ação estão associados à ruptura mecânica e ao estresse oxidativo ^{39,44}. O grafeno pode destruir a membrana plasmática bacteriana devido a pequenos cortes que causam um efeito de nano-lâmina, tornando as bactérias inviáveis ^{26,44}. Também pode causar a remoção das camadas lipídicas da membrana tornando as bactérias permeáveis ao meio e impossibilitando sua existência, bem como mecanismos que causam danos ao DNA e às proteínas ^{22,27,28}. No que diz respeito ao estresse oxidativo, a oxidação dos componentes celulares ocorre tanto pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) quanto pela transferência direta de elétrons ⁴⁴. O óxido de grafeno reduzido (rGO) apresenta menor atividade antimicrobiana e consequentemente menor potencial de citotoxicidade porque a ausência de grupos funcionais contendo oxigênio impede o mecanismo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que também produzem estresse oxidativo nas células vivas ⁴².

Como mencionado na osseointegração, métodos para controlar a molhabilidade da superfície, como propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, são normalmente empregados para suprimir a atividade bacteriana e a formação de biofilme ³⁹, observaram que o tratamento com grafeno tornou a superfície hidrofóbica, e tal superfície aumentou a inibição da ação bacteriana. adesão. Assim, é relatado na literatura que a atividade antibacteriana do nanomaterial à base de grafeno depende de fatores como o número de camadas do composto de grafeno, pureza, concentração, química da superfície e hidrofiliicidade ⁴².

Em relação à citotoxicidade, há associação com efeitos antimicrobianos e de osseointegração ²⁶.

A citotoxicidade ou citocompatibilidade das partículas de grafeno é controversa. Os estudos incluídos nesta revisão sistemática ^{10,26,35,37,39,40,43,45} mostraram que os derivados de

grafeno são biocompatíveis e apresentam baixos níveis de toxicidade permitindo seu uso como suporte para regeneração de tecidos, crescimento celular e diferenciação celular ⁴¹. Ao contrário dos resultados dos artigos incluídos nesta revisão sistemática ⁴⁶, testaram diferentes soluções de GO obtidas por múltiplos métodos de síntese e descobriram que elas têm diferentes potenciais para induzir citotoxicidade. Segundo os autores, a toxicidade pode estar relacionada a diferenças na composição química e morfologia do GO ^{10,42,46}. Essas diferenças resultam da variabilidade durante a síntese do GO (por exemplo, grau de pureza dos materiais, tamanho e estado das partículas (grau de compactação das folhas de grafeno), estrutura, morfologia, oxidação excessiva, temperatura de reação e reagentes) ^{10,46}. Assim, como resultado do processo de produção, podem ocorrer agregação de partículas, diferenças na qualidade dos grupos funcionais e possíveis defeitos na rede GO, que podem determinar as propriedades e influenciar direta ou indiretamente a toxicidade ⁴⁶. Verificou-se também que a citocompatibilidade dos nanomateriais de grafeno depende da concentração e das propriedades físicas e químicas (hidrofobicidade, número de folhas de grafeno e tamanho) ⁷. O mecanismo de interação entre GO e células é difícil de padronizar, uma vez que os efeitos biológicos e o nível de toxicidade sistêmica dependem de cada organismo (ou seja, espécie, mecanismos de defesa e adaptação) ¹⁰. Nesse sentido, cada substrato desenvolvido deve ser avaliado quanto à citotoxicidade ¹⁰. A toxicidade a nível celular também pode estar associada à internalização de partículas GO nas células ^{47,48}. O retículo endoplasmático (RE) é a principal organela responsável pelo enovelamento adequado das proteínas e, em condições normais, existe um equilíbrio entre a carga da proteína ER e a capacidade de enovelamento ⁴⁹. Quando as nanopartículas GO se acumulam no RE, elas podem induzir alterações morfológicas, dificultar a capacidade de dobramento de proteínas, aumentando o nível de proteínas mal dobradas e levar a uma condição chamada estresse do RE ¹⁰. O estresse é um mecanismo de proteção que visa prevenir a formação de proteínas mal dobradas. No entanto, as partículas GO nas células podem induzir respostas inflamatórias ativando e modulando o estresse do RE e a piroptose (poros formados na membrana que causam um desequilíbrio osmótico na célula levando à sua lise) ¹⁰, alterando os níveis de toxicidade.

Outros fatores como a estabilidade em meios biológicos e as formas hidrofílicas do grafeno também estão relacionados aos níveis de citotoxicidade ⁵⁰. Para atingir baixa citotoxicidade para fins de bioaplicação, os nanomateriais de grafeno não devem formar agregados, uma vez que as macropartículas agregadas não entram nas células e ficam presas na membrana celular. Como consequência, levam à ruptura do citoesqueleto, à deformação da

membrana e ao aumento da tensão intercelular, causando a morte celular ⁷. Em relação à hidrofilicidade e hidrofobicidade, as formas hidrofílicas do óxido de grafeno (dadas pelo número de grupos funcionais de oxigênio) são mais biocompatíveis que as hidrofóbicas ^{7,50}. Em outras palavras, o que torna o grafeno hidrofílico ou hidrofóbico é a relação carbono-oxigênio ⁵⁰. Nesse sentido, as formas hidrofóbicas são mais citotóxicas porque tendem a formar agregados ⁵⁰. E finalmente, quanto maior o teor de oxigênio, maior a citotoxicidade do grafeno, uma vez que aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ⁷. Assim, GO é mais citotóxico que rGO. Diferenças no teor de oxigênio podem resultar do método de síntese, que utiliza oxidantes que geram grupos funcionais (epóxi, hidroxila e carboxila) nas bordas e planos basais do grafeno ⁵⁰.

Os artigos incluídos nesta revisão sistemática encontraram resultados promissores em relação aos mecanismos antimicrobianos e de osseointegração. No entanto, houve limitações em relação à citotoxicidade. É difícil concluir os riscos potenciais para a saúde dos compostos de grafeno, pois a citotoxicidade depende de muitos fatores. Sugere-se que cada biomaterial formulado seja avaliado quanto à sua segurança, uma vez que as evidências mostram que a toxicidade do grafeno está associada à interação direta entre o grafeno e a membrana celular que danifica fisicamente a membrana lipídica ⁵⁰. Assim, estabelecer a relação estrutura-propriedades-citotoxicidade é fundamental para desenvolver um implante biocompatível e tirar conclusões claras sobre a toxicidade.

Dados os artigos incluídos nesta revisão, os autores sugerem que para melhorar a osseointegração e promover a capacidade antimicrobiana, o GO apresenta maiores benefícios devido ao seu caráter hidrofílico e à liberação de ERO. Para reduzir os efeitos citotóxicos, o rGO é recomendado por apresentar menor teor de oxigênio, o que causa menos danos à célula.

A investigação futura deverá centrar-se na compreensão dos mecanismos de adesão e proliferação celular, na diferenciação de materiais revestidos com grafeno em células ósseas, na eficácia do revestimento na prevenção de infecções, na sua resistência à colonização bacteriana e à lixiviação a longo prazo, e em metodologias para avaliar a citotoxicidade. Além disso, a estética é necessária no planejamento de tratamentos de reabilitação. Nesse sentido, a coloração de materiais contendo grafeno poderia comprometer a estética do sorriso ^{12,25}. Assim, são necessárias pesquisas para melhorar a estética, uma vez que as informações coletadas até o momento compreendem uma fase inicial de pesquisa, que busca compreender efetivamente os mecanismos de ação dos materiais de grafeno ^{29,45}.

Quanto às limitações desta revisão sistemática, não foram encontrados estudos comparando as propriedades de rGO e GO. Assim, ainda não está claro qual desses compósitos de grafeno apresenta melhor capacidade de osseointegração, redução da formação de biofilme e baixa citotoxicidade. Além disso, até o momento, nenhum artigo na literatura estabeleceu a concentração ideal de grafeno para revestir um material de implante para garantir sua biocompatibilidade com células humanas e a redução de microrganismos bacterianos. Esta falta de definição de parâmetros é uma limitação que precisa ser superada para avançar no uso seguro desses materiais contendo grafeno. Apesar de seu uso crescente na odontologia, estudos adicionais são necessários para avaliar essas questões para garantir a melhoria da osseointegração, capacidade antimicrobiana e biocompatibilidade de materiais de implantes dentários revestidos de grafeno.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os artigos incluídos nesta revisão sistemática, o GO utilizado como revestimento pode apresentar propriedades antimicrobianas eficientes e promover a osseointegração. Porém, sua citotoxicidade é maior em comparação ao rGO. Portanto, sugere-se que mais estudos sejam necessários, principalmente na busca de métodos que diminuam a citotoxicidade dos compostos de grafeno antes que este revestimento possa ser utilizado com segurança em humanos, considerando seus efeitos a longo prazo.

REFERÊNCIAS

1. Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Katsnelson MI, Grigorieva I, Dubonos S, Firsov A. Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene. *Nature* 2005;438:197-200.
2. Geim AK, Novoselov KS. The rise of graphene. In *Nanoscience and technology: a collection of reviews from nature journals*. 2010;11-19.
3. Landau HG. The Ignition of Gases by Local Sources. *Chem Rev* 1937;21:245-58.
4. Mermin ND. Crystalline order in two dimensions. *Phys Rev* 1968;176:250.

5. Sun X, Huang C, Wang L, Liang L, Cheng Y, Fei W, Li Y. Recent progress in graphene/polymer nanocomposites. *Adv Mater* 2021; 33:2001105.
6. Cottingham WN, Peierls RF. Impact-parameter expansion of high-energy elastic-scattering amplitudes. *Phys Rev* 1965; 137:B147.
7. Ghosal, K., & Sarkar, K. (2018). Biomedical applications of graphene nanomaterials and beyond. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(8), 2653-2703.
8. Nizami MZ, Takashiba S, Nishina Y. Graphene oxide: A new direction in dentistry. *Appl Mater Today* 2020;19:100576.
9. Qi L, Pan T, Ou L, Ye Z, Yu C, Bao B, Wu Z, Cao D, Dai L. Biocompatible nucleus-targeted graphene quantum dots for selective killing of cancer cells via DNA damage. *Commun Biol* 2021;4:1-2.
10. Desante, G., Labude, N., Rütten, S., Römer, S., Kaufmann, R., Zybała, R., ... & Schickle, K. (2021). Graphene oxide nanofilm to functionalize bioinert high strength ceramics. *Applied Surface Science*, 566, 150670.
11. Zhang L, Zhou Q, Song W, Wu K, Zhang Y, Zhao Y. Dual-functionalized graphene oxide based siRNA delivery system for implant surface biomodification with enhanced osteogenesis. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017;9:34722-35.
12. Wang L, Qiu J, Guo J, Wang D, Qian S, Cao H, Liu X. Regulating the behavior of human gingival fibroblasts by sp2 domains in reduced graphene oxide. *ACS Biomater Sci Eng* 2019;5:6414-24.
13. Rosa, V., Xie, H., Dubey, N., Madanagopal, T. T., Rajan, S. S., Morin, J. L. P., ... & Neto, A. H. C. (2016). Graphene oxide-based substrate: physical and surface characterization, cytocompatibility and differentiation potential of dental pulp stem cells. *Dental Materials*, 32(8), 1019-1025.
14. Qu Y, He F, Yu C, Liang X, Liang D, Ma L, Zhang Q, Lv J, Wu J. Advances on graphene-based nanomaterials for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2018; 90:764-80.

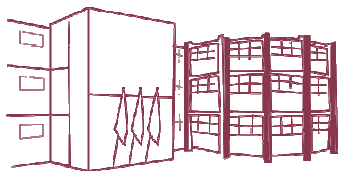
15. Li Q, Wang Z. Involvement of FAK/P38 signaling pathways in mediating the enhanced osteogenesis induced by nano-graphene oxide modification on titanium implant surface. *Int J Nanomedicine* 2020;15:4659.
16. Radhi A, Mohamad D, Rahman FS, Abdullah AM, Hasan H. Mechanism and factors influence of graphene-based nanomaterials antimicrobial activities and application in dentistry. *Journal of Materials Research and Technology*. 2021;11:1290-307.
17. Dubey N, Bentini R, Islam I, Cao T, Castro Neto AH, Rosa V. Graphene: a versatile carbon-based material for bone tissue engineering. *Stem Cells Int* 2015; 804213.
18. Priante F, Salim M, Ottaviano L, Perrozzi F. XPS study of graphene oxide reduction induced by (100) and (111)-oriented Si substrates. *Nanotechnol* 2018;29:075704.
19. Yu DY, Prihodchenko PV, Mason CW, Batabyal SK, Gun J, Sladkevich S, Medvedev AG, Lev O. High-capacity antimony sulphide nanoparticle-decorated graphene composite as anode for sodium-ion batteries. *Nat Commun* 2013; 4:1-7.
20. Ramón-Raygoza ED, Rivera-Solorio CI, Giménez-Torres E, Maldonado-Cortés D, Cardenas-Alemán E, Cué-Sampedro R. Development of nanolubricant based on impregnated multilayer graphene for automotive applications: Analysis of tribological properties. *Powder Technol* 2016;
21. Tahriri M, Del Monico M, Moghanian A, Yarak MT, Torres R, Yadegari A, Tayebi L. Graphene and its derivatives: Opportunities and challenges in dentistry. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019;102:171-85.
22. Qin W, Wang C, Jiang C, Sun J, Yu C, Jiao T. Graphene Oxide Enables the reosteogenesis of previously contaminated titanium in vitro. *J Dent Res* 2020;99:922-9.
23. Qian W, Qiu J, Su J, Liu X. Minocycline hydrochloride loaded on titanium by graphene oxide: An excellent antibacterial platform with the synergistic effect of contact-killing and release-killing. *Biomater Sci* 2018;6:304-13.
24. Bregnocchi A, Zanni E, Uccelletti D, Marra F, Cavallini D, De Angelis F, De Bellis G, Bossù M, Ierardo G, Polimeni A, Sarto MS. Graphene-based dental adhesive with anti-biofilm activity. *J Nanobiotechnology* 2017;15:1-3.

25. Kriplani, S., & Sedani, S. (2023). Comparative evaluation of the effect of 2% graphene oxide and 5% hydroxyapatite nanoparticles in isolation and in combination on ciclo tensile bond strength of 5 th generation adhesive. *F1000Research*, 12, 514.
26. Guazzo R, Gardin C, Bellin G, Sbricoli L, Ferroni L, Ludovichetti FS, Piattelli A, Antoniac I, Bressan E, Zavan B. Graphene-based nanomaterials for tissue engineering in the dental field. *Nanomater* 2018;8:349.
27. Qin, W., Ma, J., Liang, Q., Li, J., & Tang, B. (2021). Tribological, cytotoxicity and antibacterial properties of graphene oxide/carbon fibers/polyetheretherketone composite coatings on Ti–6Al–4V alloy as orthopedic/dental implants. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 122, 104659.
28. Kumar, P., Huo, P., Zhang, R., & Liu, B. (2019). Antibacterial properties of graphene-based nanomaterials. *Nanomaterials*, 9(5), 737.
29. Kang MS, Jeong SJ, Lee SH, Kim B, Hong SW, Lee JH, Han DW. Reduced graphene oxide coating enhances osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on Ti surfaces. *Biomater Res* 2021;25:1-9.
30. Kalisz M, Grobelny M, Mazur M, Zdrojek M, Wojcieszak D, Świniarski M, Judek J, Kaczmarek D. Comparison of mechanical and corrosion properties of graphene monolayer on Ti–Al–V and nanometric Nb₂O₅ layer on Ti–Al–V alloy for dental implants applications. *Thin Solid Films* 2015;589:356-63.
31. Ren N, Li J, Qiu J, Yan M, Liu H, Ji D, Huang J, Yu J, Liu H. Growth and accelerated differentiation of mesenchymal stem cells on graphene-oxide-coated titanate with dexamethasone on surface of titanium implants. *Dent Mater* 2017;33:525-35.
32. Pham VT, Truong VK, Quinn MD, Notley SM, Guo Y, Baulin VA, Al Kobaisi M, Crawford RJ, Ivanova EP. Graphene induces formation of pores that kill spherical and rod-shaped bacteria. *ACS nano*. 2015; 9:8458-67.
33. Tufanaru C, Munn Z, Aromataris E, Campbell J, Hopp L. Systematic reviews of effectiveness. *Joanna Briggs Institute Reviewer's Manual*. Adelaide: Joanna Briggs Institute. 2017.

34. Gama LT, Duque TM, Özcan M, Philippi AG, Mezzomo LA, Gonçalves TM. Adhesion to high-performance polymers applied in dentistry: A systematic review. *Dent Mater* 2020; 36:e93-108.
35. Jang, W., Kim, H. S., Alam, K., Ji, M. K., Cho, H. S., & Lim, H. P. (2021). Direct-deposited graphene oxide on dental implants for antimicrobial activities and osteogenesis. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 5745.
36. Li, Y., Jia, H., Cui, X., Qin, W., Qin, S., Wu, Y., ... & Li, Y. (2022). Bending properties, compression properties, biocompatibility and bioactivity of sulfonated carbon fibers/PEEK composites with graphene oxide coating. *Applied Surface Science*, 575, 151774.
37. Scarano, A., Orsini, T., Di Carlo, F., Valbonetti, L., & Lorusso, F. (2021). Graphene-doped poly (methyl-methacrylate)(PMMA) implants: A micro-CT and histomorphometrical study in rabbits. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1441.
38. Di Carlo, R., Di Crescenzo, A., Pilato, S., Ventrella, A., Piattelli, A., Recinella, L., ... & Zara, S. (2020). Osteoblastic differentiation on graphene oxide-functionalized titanium surfaces: an in vitro study. *Nanomaterials*, 10(4), 654.
39. Gu, M., Lv, L., Du, F., Niu, T., Chen, T., Xia, D., ... & Zhou, Y. (2018). Effects of thermal treatment on the adhesion strength and osteoinductive activity of single-layer graphene sheets on titanium substrates. *Scientific Reports*, 8(1), 8141.
40. Kim, H. S., Ji, M. K., Jang, W. H., Alam, K., Kim, H. S., Cho, H. S., & Lim, H. P. (2021). Biological Effects of the Novel Mulberry Surface Characterized by Micro/Nanopores and Plasma-Based Graphene Oxide Deposition on Titanium. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 7307.
41. Li, Q., & Wang, Z. (2020). Involvement of FAK/P38 signaling pathways in mediating the enhanced osteogenesis induced by nano-graphene oxide modification on titanium implant surface. *International Journal of Nanomedicine*, 4659-4676.
42. Li, Q., Shen, A., & Wang, Z. (2020). Enhanced osteogenic differentiation of BMSCs and M2-phenotype polarization of macrophages on a titanium surface modified with graphene oxide for potential implant applications. *RSC advances*, 10(28), 16537-16550.

43. Pranno, N., La Monaca, G., Polimeni, A., Sarto, M. S., Uccelletti, D., Bruni, E., ... & Voza, I. (2020). Antibacterial activity against staphylococcus aureus of titanium surfaces coated with graphene nanoplatelets to prevent peri-implant diseases. An in-vitro pilot study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5), 1568.
44. Rho, K., Park, C., Alam, K., Kim, D., Ji, M. K., Lim, H. P., & Cho, H. (2019). Biological effects of plasma-based graphene oxide deposition on titanium. *Journal of Nanomaterials*, 2019, 1-7.
45. Rahnamaee, S. Y., Bagheri, R., Vossoughi, M., Asadian, E., Seyedkhani, S. A., & Samadikuchaksaraei, A. (2022). A new approach for simultaneously improved osseointegration and antibacterial activity by electrochemical deposition of graphene nanolayers over titania nanotubes. *Applied Surface Science*, 580, 152263.
46. Li, X., Lin, K., & Wang, Z. (2017). Enhanced growth and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells on Ti6Al4V alloys modified with reduced graphene oxide. *RSC advances*, 7(24), 14430-14437.
47. Dziewięcka M, Pawlyta M, Majchrzycki Ł, Balin K, Barteczko S, Czerkawska M, Augustyniak M. The structure–properties–cytotoxicity interplay: A crucial pathway to determining graphene oxide biocompatibility. *International journal of molecular sciences*. 2021 May 20;22(10):5401.
48. Lu, C. J., Jiang, X. F., Junaid, M., Ma, Y. B., Jia, P. P., Wang, H. B., & Pei, D. S. (2017). Graphene oxide nanosheets induce DNA damage and activate the base excision repair (BER) signaling pathway both in vitro and in vivo. *Chemosphere*, 184, 795-805.
49. Jia, P. P., Sun, T., Junaid, M., Yang, L., Ma, Y. B., Cui, Z. S., ... & Pei, D. S. (2019). Nanotoxicity of different sizes of graphene (G) and graphene oxide (GO) in vitro and in vivo. *Environmental Pollution*, 247, 595-606.
50. Araki, K., & Nagata, K. (2011). Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(11), a007526.

51. Syama S, Mohanan PV. Safety and biocompatibility of graphene: A new generation nanomaterial for biomedical application. International journal of biological macromolecules. 2016 May 1;86:546-55.



Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEX-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 536ª Reunião Ordinária, realizada em 04 de outubro de 2024, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA).**

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador), conforme menção constante no trabalho e documentação existente no Serviço de Graduação da FORP.

Ribeirão Preto, 04 de novembro de 2024.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP