



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS

RELATÓRIO FINAL DE PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC/CNPq-INPE)

**BIOCOMPATIBILIDADE DE FILME DE DIAMATE-CVD:
ENSAIO DE CITOTOXICIDADE**

Fabricio Luiz Silveira (UNIVAP, Bolsista PIBIC/CNPq)

E-mail: fabricio@univap.br

Dr. Evaldo José Corat (LAS/CTE/INPE, Orientador)

E-mail: corat@lac.inpe.br

Dr. Steven Frederick Durrant (IP&D/UNIVAP, Coorientador)

E-mail: steven@univap.br

Maio de 2004

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. – Introdução	2
CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
2.1 – História do Diamante.....	3
2.2 – Técnicas de Deposição do Diamante-CVD	4
2.2.1 – Ativação por Filamento Quente	4
2.2.2 – Ativação por Chama de Combustão	4
2.2.3 – Ativação por Plasma	4
2.3 – Princípio Básico da Deposição pelo Método de HFCVD	5
2.4 - Biocompatibilidade	6
2.5 – Cultura de Células	7
2.6 – Fibroblasto	8
2.7 – Adesão celular.....	8
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1 – Deposição de Diamante-CVD.....	9
3.2 – Ensaio de Citotoxicidade	10
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E ANÁLISES.....	12
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

CAPÍTULO 1

1. – Introdução

O diamante é material mais duro já encontrado na natureza. Por isso o homem durante muito tempo a ainda até hoje pesquisa a forma sintética deste material, tanto em como obtê-la, e em como e onde utiliza-la.

A tecnologia levou alguns centros de pesquisa a desenvolver este diamante sintético em forma de filme fino, para recobrir materiais e assim aumentar as suas propriedades físicas.

O INPE, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, obtém a tecnologia e a técnica para a produção de filmes de diamante. No início, as pesquisas eram voltadas para o desenvolvimento de materiais para suprir as necessidades espaciais, mas depois essas pesquisas tomaram vários rumos, como a obtenção de filmes de diamante dopados para serem utilizados como sensores semicondutores, e até mesmo na confecção de brocas odontológicas diamantadas.

Por essa variedade de aplicações do filme de diamante, este trabalho tem como objetivo, o estudo da biocompatibilidade destes filmes com o material biológico. Para isso será realizado o ensaio de citotoxicidade nos filmes, que avaliará a interação da amostra de filme de diamante, com o material biológico "*in vitro*".

CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 – História do Diamante

O diamante foi caracterizado por Issac Newton, como sendo de origem orgânica, mas Antonie Vavoisier foi o primeiro a determinar que o produto da sua combustão era o dióxido de carbono, desta maneira, o diamante era uma forma cristalina apenas com átomos de carbono [1].

As primeiras tentativas da síntese de diamante foram em 1832 na França, mas só em 1955, a General Electric Company, anunciou a obtenção de diamante artificial, pelo método HPHT do inglês High Pressure High Temperature (alta pressão – alta temperatura) [1].

Durante as décadas de 40 e 50, também surgiram pesquisas para obtenção de diamante em baixas pressões, mas as taxas de crescimento eram muito baixas [1].

Na década de 70, surgiu o primeiro grupo de obtenção de diamante pelo método CRT (do inglês Chemical Transport Reaction), pelo Prof. Deryagin, do Instituto de Física e Química de Moscou, este método foi o primeiro dos métodos com o princípio da deposição química na fase vapor, a CVD (do inglês Chemical Vapor Deposition) [1].

Nesta época até o final da década de 80, a maioria dos trabalhos com o método CVD vieram dos japoneses e americanos. A contribuição européia começou a aparecer a partir do final desta época e a latino americana no início da década de 90 [1].

Atualmente, o filme de Diamante-CVD, está sendo muito estudado devido suas várias aplicações, como por exemplo na área espacial, área de micro-eletrônica [2], área de óptica [3], na área odontológica [4] e médica, entre outras. Essa diversidade de áreas de aplicação, se deve ao fato de suas propriedades únicas na natureza, que podem ser assim resumidas: é o material mais duro; possui coeficiente de atrito muito baixo (equivalente ao do teflon); possui condutividade térmica muito alta (cerca de cinco vezes superior à do cobre); tem alto índice de refração; é material hospedeiro para vários tipos de dopagens; é quimicamente inerte para temperaturas inferiores a 800°C na presença de oxigênio e a 1550°C sem oxigênio, etc..

As inúmeras aplicações se devem ao fato de ser possível a obtenção do Diamante-CVD, com as propriedades do diamante natural, na forma de filmes finos e

filmes espessos em superfícies de diversos materiais e nas mais variadas formas, em áreas que podem variar de fração de mm^2 até centenas cm^2 .

As pesquisas em deposição de Diamante-CVD no Brasil, tiveram início no INPE com grupo DIMARE (Diamantes e Materiais Relacionados) [5].

2.2 – Técnicas de Deposição do Diamante-CVD

Deposição química a partir da fase vapor: neste processo, denominado CVD (do inglês *Chemical Vapor Deposition*), os filmes são formados pela reação química de espécies convenientes na superfície do substrato.

2.2.1 – Ativação por Filamento Quente

A ativação por filamento quente, chamada de HFCVD (do inglês *Hot Filament Assisted Chemical Vapor Deposition*), é a mais estudada. Sua vantagens são o baixo custo do equipamento e facilidade de projetar reator para deposição em grande áreas. As desvantagens são a baixa taxa de crescimento e a não uniformidade da área depositada, que depende diretamente da forma e proximidade do filamento. O filamento costuma ser de tungstênio, molibdênio ou tântalo, usualmente aquecido entre 2000°C à 2400°C , tornando-se muito quebradiço [1].

2.2.2 – Ativação por Chama de Combustão

Do modo de ponto de vista da temperatura e pressão do gás, uma chama pode ser caracterizada como um plasma térmico, embora o nível de ionização seja bem menor. Esta técnica tem a vantagem de ser simples, convencional e barata, além disso não necessita de fontes externas de energia, o que torna um sistema de boa eficiência. Os filmes obtidos são de excelentes qualidades mas a deposição é feita em pequenas áreas. Outro problema desta técnica é o alto custo do gás oxi-acetileno [1]

2.2.3 – Ativação por Plasma

Existam vários métodos de se obter plasma em um meio para a deposição de filme de Diamante-CVD. Alguns dos mais importantes são [1]:

Ativação por jato de plasma em arco: neste o plasma é obtido através de uma descarga elétrica em forma de arco, e o plasma pode atingir uma temperatura de 5000°C;

Ativação por plasma de microondas dentro de uma cavidade ressonante: neste o plasma é obtido por microondas dentro de uma cavidade. Microondas em frequência de 2,45 GHz gera um plasma em forma de bola e isso evita a contaminação da amostra, do substrato que será depositado o filme de diamante, obtendo-se um filme de melhor qualidade;

Ativação por plasma de microondas fora da cavidade: nesta, para obtenção do plasma as microondas são obtidas fora da cavidade ressonante; o sistema mais eficiente desta técnica é o *Surfatron*.

2.3 – Princípio Básico da Deposição pelo Método de HFCVD

No início da produção de diamante pelo método CVD, o hidrogênio é misturado ao metano e, eventualmente, a um tipo de gás halógeno, dentro de uma câmara de mistura. Depois, a composição gasosa é introduzida em um reator, onde é submetida a um filamento ou a um conjunto de filamentos de tungstênio aquecidos a 2.300°C. Nessa temperatura, o hidrogênio e o metano se decompõem em radicais (CH_3 e H) e vão reagir e se fixar à superfície de um substrato, como mostrado na figura 1. Á partir daí, inicia-se um processo onde cadeias carbônicas policristalinas começam a se formadas, pela condensação (solidificação) de átomos ou moléculas provenientes deste vapor sobre o substrato [7].

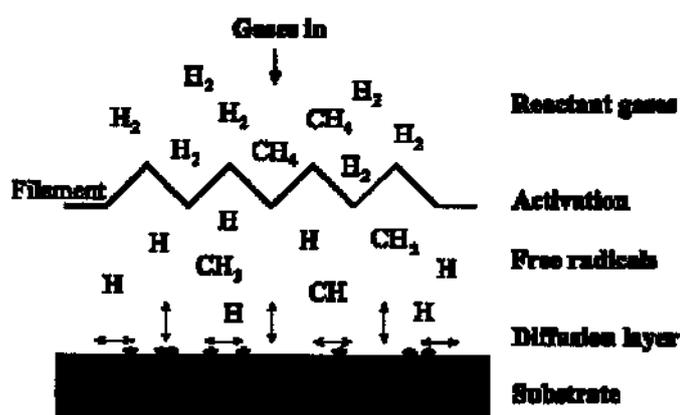


Fig. 1 – Princípio da Deposição de Diamante.

2.4 - Biocompatibilidade

A descoberto de uma superfície sintética que tivesse as seguintes características:

- que não mudasse suas propriedades na presença de tecidos ou fluidos biológicos;
- e que contivesse as propriedades físicas: dureza e coeficiente de atrito baixo;

Seria uma revolução para os portadores de próteses de membros, já que estes necessitam após alguns anos a troca desta prótese, pois estas reagem com os sistema biológico causando dano ao paciente.

Atualmente, o uso de biomaterial natural ou sintético está em constante crescimento, tanto na prática odontológica, com implantes dentários por exemplo, como na área médica, que vão desde um simples transplante de pele a até próteses de ossos ou membros. Com isso torna-se cada mais importante a descoberta e os teste destes biomateriais.

Entende-se como biocompatibilidade a capacidade de um material para em desempenhar em uma aplicação específica com uma resposta apropriada do organismo receptor [8]. Quando um material sintético ou biológico é inserido em um sistema biológico, dois aspectos principais devem ser considerados: a influência do meio fisiológico, que pode alterar a natureza e propriedades do material e o efeito do material do implante e de cada produto de degradação, nos fluidos e tecidos que envolvem o implante. A biocompatibilidade está na mutua interação entre o material e o ambiente fisiológico, de tal forma que ambos não produzam efeitos indesejáveis na outra parte [9].

Para que uma material seja biocompatível, é necessário que ele, além de não ser rejeitado, que ele interaja com o sistema biológico, assim surge os conceitos de bioinércia e bioatividade respectivamente [10]. Além disso, os biomateriais devem realizar suas funções para quais foram desenvolvidas, possuindo pelo menos duas propriedades importantes: a *Biocompatibilidade*, a compatibilidade do material com meio biológico; e a *Funcionalidade*, que está relacionado ao conjunto de propriedades que dá a um determinado dispositivo a capacidade de desempenhar uma função desejada semelhante a qual está substituindo [11].

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993 [12], o ensaio de citotoxicidade “*in vitro*” é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos

biomédicos e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares [13].

Este método de demonstrativo de citotoxicidade, utilizando cultura de células, pode ser utilizado com muito sucesso, pois reprodutíveis, rápidos e financeiramente acessíveis para o estudo de biocompatibilidade “*in vitro*” [12].

2.5 – Cultura de Células

O estudo de células vivas, por tempo prolongado podem ser realizados por meio de cultivo em soluções que contém os nutrientes necessário e os quais as células se mantém vivas e proliferem por longo período de tempo. A solução que mantém as células vivas, que são chamadas meio de cultura, deve ser renovado com freqüência, pois os nutrientes esgotam-se, ao mesmo tempo que os produtos tóxicos do metabolismo se acumulam no meio.

As células mostradas na figura 2 são de ratos, crescendo na presença de soro bovino, que contém fatores de crescimento que estimulam a multiplicação celular. As células esféricas no canto inferior da imagem assumiram esta forma arredondada como preparação para a divisão celular [14].

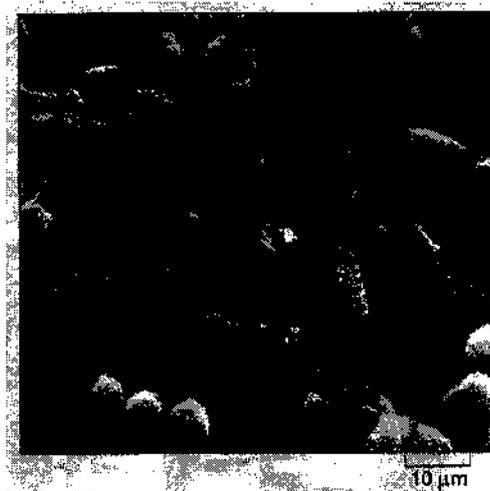


Fig 3- MEV de células de mamíferos proliferando-se em cultura.

Depois de isoladas, as células podem ser cultivadas em suspensão, ou presas a um suporte, ao qual aderem espontaneamente. Neste último caso forma-se uma película de uma só camada de células sobre o suporte [15].

2.6 – Fibroblasto

A regeneração, ou reparação tecidual tem como uma das células principais o fibroblasto, onde estas em cerca de 24 horas começam a proliferar para formar (em 3 à 5 dias) um tipo especializado de tecido, que é a característico da cicatrização [16]. Os fibroblastos secretam os componentes fibrosos e a substância fundamental do tecido conjuntivo [17]. Estas são células com alto grau de mitose (divisão celular), e elas só param de se duplicarem assim que encontram as células vizinhas (outros fibroblastos). Elas também contém um alto poder de adesão celular, com outras células e com superfícies que propiciem a sua adesão.

2.7 – Adesão celular

A maioria dos tecidos sólidos cresce “*in vitro*”, em monocamadas e, seguinte à desagregação celular, aderem-se e estende-se antes de iniciar a proliferação celular. Originalmente, descobriu-se que as células se estendiam em vidros que possuíam cargas. subseqüentemente, foi demonstrado que as células ligavam-se a alguns plásticos como o poliestireno, apropriadamente tratados com uma descarga elétrica iônica ou radiação ionizante de alta energia. Agora se sabe que a adesão é mediada por receptores específicos da superfície celular [18].

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Deposição de Diamante-CVD

Para a escolha da técnica de crescimento assistida por filamento quente, foi levada em consideração o menor custo de montagem e operação do reator, além de ser umas das técnicas mais estudadas no país.

O reator utilizado para este trabalho localiza-se no Departamento de Diamantes e Materiais Relacionado (DIMARE) no Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE).

Os filmes foram crescidos usando o método da deposição química a partir da fase vapor assistida por filamento quente (HFCVD). O reator de filamento quente é constituído de um tubo de vidro de 6 cm de diâmetro e 22 cm de comprimento, com passantes apropriados para o vácuo, para a alimentação do filamento, porta-substrato, instalação do termopar para a medida da temperatura do substrato e injeção dos gases reagentes. Para os gases reagentes foram utilizados o hidrogênio (H_2) e o metano (CH_4), nas proporções de 99,5% e 0,5% respectivamente.

A figura 3 mostra a foto do reator durante a deposição do filme de diamante.

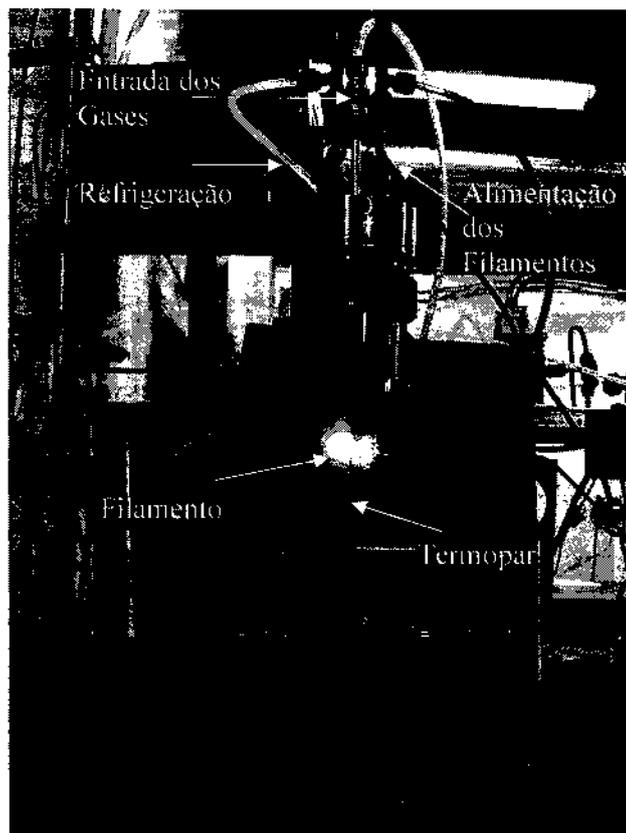


Fig. 3 – Foto do Reator de Filamento Quente.

O filamento utilizado para o aquecimento e dissociação dos gases foi de tungstênio de 0,250mm de diâmetro, enrolado de forma helicoidal para obter uma maior área de aquecimento para com o substrato. A pressão interna do reator foi monitorada por um nanovacúmetro, esta pressão foi mantida em 50 torr. A temperatura foi monitorada com um termopar em contato com o substrato, e esta temperatura ficou em torno de 570°C. A fonte utilizada foi de corrente contínua, e seus parâmetros foram, tensão igual à 22 Volts (V) e a corrente igual à 12,5 Ampère (A).

O substrato utilizado para a deposição do diamante foi o silício.

Para o ensaio de citotoxicidade, foi obtido 4 (quatro) amostras de filme de Diamante-CVD

A. Na primeira amostra o substrato de silício foi polida com pasta de diamante de 250 µm;

B. A segunda o substrato foi imerso em uma mistura de hexano com pó de diamante de 250 µm, em banho de ultra-som por 1 hora, também para preparo da superfície.

A duração da deposição destas amostras foi de 4 horas. Com isso obtivemos 2 (duas) amostras de filme de diamante, com polimento da superfície diferente.

C. Na terceira amostra, obtivemos um filme de diamante alto-sustento onde o preparo do substrato foi o de polimento com pasta de diamante de 250 µm.

D. E para uma comparação, utilizados também um substrato de silício sem preparo.

Depois de realizado as respectivas deposições, foram realizadas as microscopias dos diamantes, utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), localizado no Laboratório Associado de Sensores no INPE.

3.2 – Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Cultura de Células do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento na UNIVAP.

As células utilizadas para este ensaio, foram de uma linhagem de células Vero (fibroblasto de rim de macaco Verde Africano), cultivadas me meio mínimo essencial

(MEM-GIBCO). Para o suplemento (nutrientes) deste meio de cultura, foram utilizados 10 % de soro fetal bovino (SFB-GIBCO), mantidas em garrafas de cultura de 25 cm² (NUNC), à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

Para o ensaio de citotoxicidade, as amostras de filme de diamante foram autoclavadas à uma temperatura de 121°C por um período de 20 minutos, para que as amostras ficassem isentas de microorganismos que pudessem infectar a cultura de células.

As amostras já autoclavadas foram colocadas em placas de 24 poços (NUNC), e sobre elas adicionou-se 5 x 10⁵ células/ml. As amostras de filme de diamante com a cultura celular foram incubadas com 500µl de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB-GIBCO) à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, por uma semana, com trocas periódicas do meio de cultura.

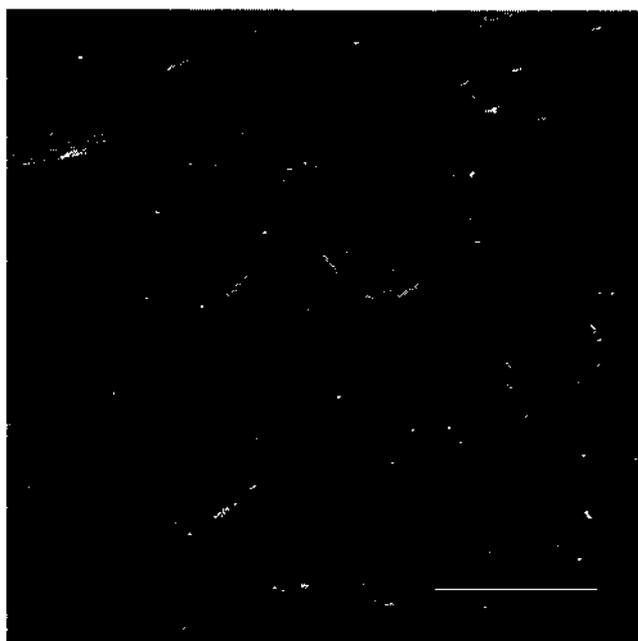
Após o termino do período de uma semana, as mostras foram retiradas do meio de cultura, e desidratadas em acetona em concentrações (primeiramente) de 70, 90 e 100%, sendo a concentração de 100% realizadas 2 vezes, cada uma delas por 10 minutos. Em seguidas as mostras foram fixadas com HMDS (Hexamethuldisilazane) por 2 vezes e deixadas secar a temperatura ambiente.

A fixação evita a destruição das células por suas próprias enzimas (autólise), ou por bactérias, os tecidos removidos do corpo de um animal, por isso devem ser adequadamente tratados imediatamente após a sua retirada. A principal função dos fixadores é insolubilizar as proteínas dos tecidos. Essa insolubilização é essencial na fixação, pois as proteínas são as principais responsáveis pela estrutura das células e dos tecidos [15].

Após isto, as amostras foram levadas ao Laboratório de Microscopia Eletronica de Varredura no Laboratório Associado de Sensores e Materiais, INPE, para se realizar a metalização com filme de ouro e consecucivemetete a microscopia destas amostras.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E ANÁLISES

Para análise do crescimento celular, utilizamos como controle uma amostra do substrato de silício (amostra **D**) sem nenhum tratamento de superfície e sem deposição de diamante. A figura 4 mostra a imagem de MEV após o teste de citotoxicidade do mesmo.



*Fig. 4 – MEV da superfície do silício, sem tratamento e sem deposição.
Aumento de 1000x (escala: 40 μ m).*

Com esta imagem, não observamos a presença de princípio de crescimento celular, e nem o aparecimento de indícios de células isoladas. Esta imagem é característico do silício sem tratamento de superfície, ou seja, sem polimento.

A segunda amostra utilizada no ensaio de citotoxicidade, foi amostra A, (substrato polido com pasta de diamante). A seguir, figuras 5 e 6 vemos a imagem do MEV após o ensaio de citotoxicidade.

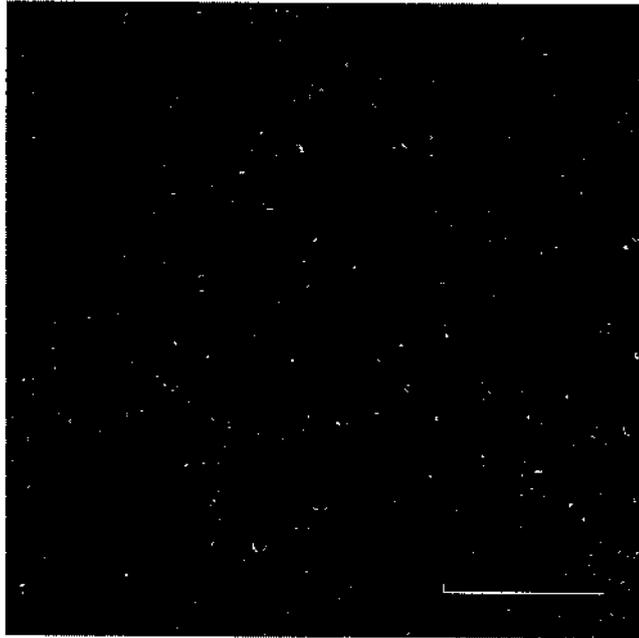


Fig. 5 – MEV da superfície do filme de diamante da amostra A, após o ensaio de citotoxicidade. Aumento de 500x (escala: 70 μm)

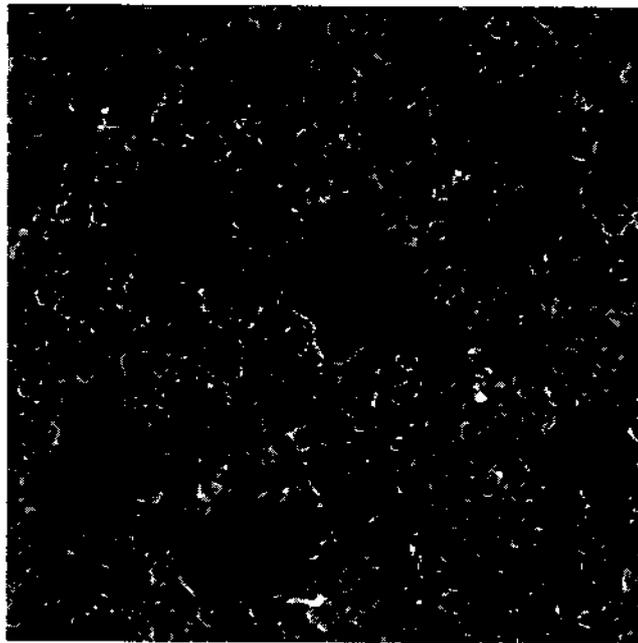


Fig. 6 – MEV da superfície do filme de diamante da amostra A, após o ensaio de citotoxicidade. Aumento de 2000x (escala: 17 μm)

Nesta imagem, encontramos algumas estruturas que não são possíveis a sua identificação. Estas estruturas podem ou não serem células propriamente ditas, e se for não é possível dizer quais células são estas. Para isso é necessário realizar o método de coloração específica para se determinar quais células são.

Este método de coloração consiste em se corar a amostra com corantes específicos, estes corantes são retidos pelas células, e com a ajuda de um microscópio é possível se determinar o tipo celular.

Nesta amostra, as células podem não ter crescido devido, à superfície ser facetada, com baixa taxa de rugosidade, devido a isso, dizemos que este filme contém um plano (100), baixa granulometria.

Como já citado anteriormente, as células possuem receptores específicos para se aderirem a algumas superfícies, mas devido à superfícies do filme ser “lisa”, as células não conseguem fixar à superfície do filme, assim elas não se desenvolvem.

Na figura 7, mostramos a microscopia do ensaio de citotoxicidade da amostra **D** (substrato imerso em uma mistura de hexano com pó de diamante em banho de ultra-som por 1 hora, também para preparo da superfície).

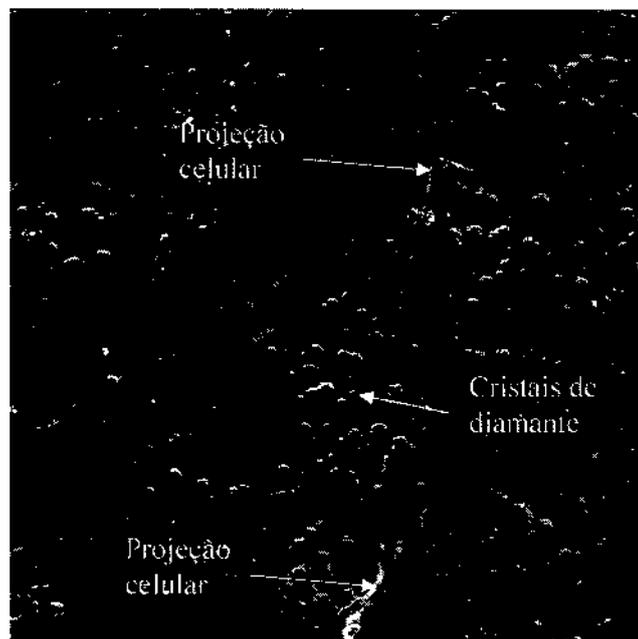


Fig. 7 – MEV da superfície do filme de diamante da amostra **B**, após o ensaio de citotoxicidade. Aumento de 1000x (escala: 40 μm).

Nesta imagem, identificamos algumas projeções celulares, estas projeções são características das células de fibroblasto, onde estão são células alongadas, e este alongamento damos a nomenclatura de projeções celulares.

Em algumas áreas, conseguimos visualizar os cristais de diamante, já em outras áreas onde teria de se haver os cristais não é possível a sua visualização, isso devido à possível presença de células. Isso aconteceu devido os receptores de superfícies das células, que reconheceram estes cristais, como lugares onde elas pudessem de fixar.

A imagem da figura 8, é da microscopia da amostra C (filme de diamante alto-sustento) após o ensaio de citotoxicidade. Este filme de diamante está com uma alta taxa de rugosidade, plano (111), alta granulometria.



Fig. 8 – MEV da superfície do filme de diamante da amostra C, após o ensaio de citotoxicidade. Aumento de 500x (escala: 70 μm).

Na imagem da figura 8 identificamos a presença de uma projeção celular. As regiões sinalizadas de amarelo são indícios de presença celular. Nestas regiões, podemos dizer que as mesmas tiveram uma boa aderência ao filme de diamante.

Abaixo, figura 10, mostramos uma outra imagem de microscopia da mesma amostra, mas de região diferente.

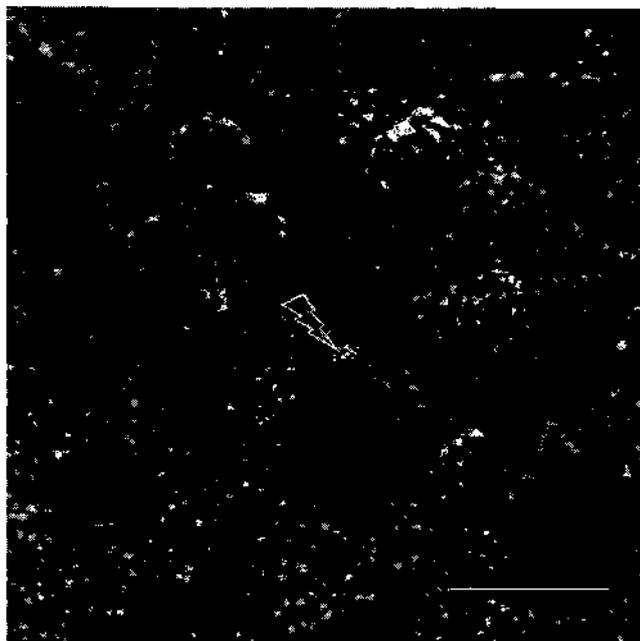


Fig. 10 – MEV da superfície do filme de diamante da amostra C, após o ensaio de citotoxicidade. Aumento de 1000x (escala: 40 μm).

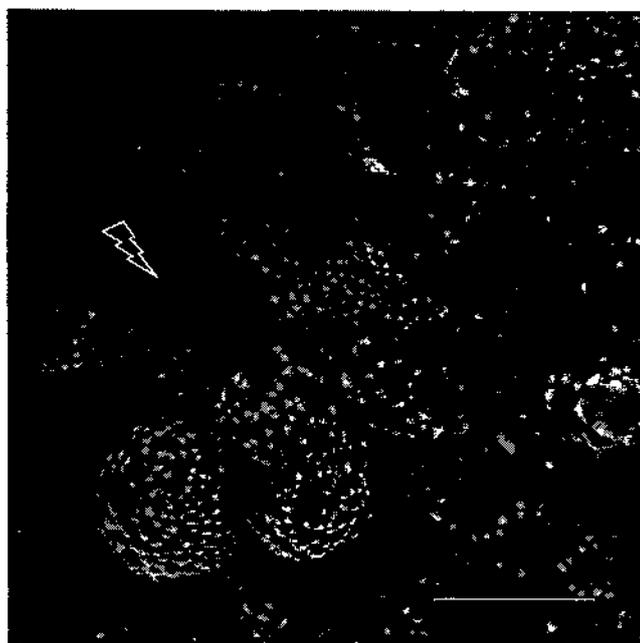


Fig. 11 – MEV da superfície do filme de diamante da amostra C, após o ensaio de citotoxicidade. Aumento de 1000x (escala: 40 μm).

As áreas sinalizadas são indício de presença celular, na figura 10 temos uma projeção celular, e na figura 11 temos uma estrutura alongada, o que é característico das células de fibroblasto.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Os resultados apresentados nos mostraram que as possíveis células só foram encontradas de modo significativo em algumas amostras, onde estas continham de algum modo (tanto pelos cristais de diamante quanto pela taxa de nucleação) uma certa taxa de rugosidade, como as amostras **B** e **C**. Nestas, as células conseguiram de aderir, e assim se fixaram à superfície de filme de diamante, nos levando a constatar que estas duas amostras, tiveram uma boa interação com o material biológico.

Já na amostra **A**, observamos algumas estruturas que podem ou não ser células, se forem, o seu possível motivo de termos encontrado em pequeno número, se deve ao fato da baixa taxa de rugosidade do filme de diamante, isso faz com que as células não consigam se fixar à superfície do filme de diamante.

Já na amostra **D**, não observamos nenhum crescimento celular, com isso podemos dizer que este não possui interação com o material biológico.

Este estudo nos leva a constatar que para as células se fixarem ao filme de diamante, foram necessários dois aspectos, os receptores de superfícies das células, para reconhecerem o filme de diamante, e a rugosidade da superfície do filme de diamante.

Como trabalhos futuros, podemos realizar o mesmo experimento, variando a taxa de nucleação (rugosidade da superfície do filme), e depois do ensaio de citotoxicidade, para a visualização das células, podemos utilizar o método da coloração específica, para marcar as células, e utilizar um microscópio óptico para visualizar as mesmas, ou podemos utilizar o microscópio metalográfico, onde este nos fornece uma imagem colorida da amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] F. AZEVEDO, "*Estudo do Crescimento de Filmes Finos de Diamante-CVD de Baixa Rugosidade para Aplicações Tribológicas Usando a Técnica Surfatron*"- Tese apresentada ao Departamento de Engenharia de Materiais da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, para obtenção do título de "Mestre em Engenharia de Materiais", 1999.
- [2] A. N. G. Ferreira, L.L.G. Silva, E.J. Corat, V.J. Trava-Airoldi and K. Iha, "Electrochemical characterization on semiconductors p-type CVD diamond electrodes", *Braz. J. of Phys.*, 29 (4) 760-763 (1999).
- [3] V.J. Trava-Airoldi, C.R. Rodrigues, M. Fukui e V. Baranauskas: SPIE, vol 1759 in *Diamond Optics V*, 87 (1992).
- [4] L. A. L. A. L. Conrado, V. J. Trava-Airoldi, E. Corat, E. Munin, T. S. Rolim, "*The Use of a CVD-Coated Diamond Bur Coupled to an Ultrasound Handpiece in Dental Preparation*". Disponível em <http://www.cvd-diamante.com.br/Arquivos/conrado.pdf>. Data de acesso: 05/08/2004.
- [5] V.J. Trava-Airoldi, E.J. Corat, A.F.V. Pena, N.F. Leite, V. Baranauskas, e M.C. Salvadori, *Diamond and Related Materials* vol. 4, 1255 (1995). V.J. Trava-Airoldi,
- [6] P. J. TATSCH, "*Deposição de Filmes Finos*", V Oficina de Microeletrônica, Unicamp, 1996.
- [7] Ivan Buijnsters, "*Hot-filament chemical vapour deposition of diamond onto steel*", Thesis Katholieke Universiteit Nijmegen, 1975.
- [8] D. F. Williams, "*Definitions in Biomaterials*", In: *Progress in Biomedical Engineering [Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials]*, Ed.: D.F. Williams. Amsterdam: Elsevier. v. 4, chap. 6, p. 49-59, 1987.

- [9] Biomecânica e Biocompatibilidade. Disponível em: <http://www.biomecanica.com.br/bioosteo/biocompatibilidade.htm>. Data de acesso: 05/05/2004.
- [10] L. L. HENCH, *Characterization of Bioceramics*, 1993.
- [11] O. BOSCHI, “O que é necessário para que um material possa ser considerado biomaterial?”, Seminário Regional de Biomaterial 1, UDESC, Anais, pág. 4-16. Santa Catarina, 1996.
- [12] S. O. Rogero, A. B. Lugão, T. I. Ikeda, Á. S. Cruz, “Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias”, *Materials Research*, Vol. 6, No. 3, 317-320, 2003.
- [13] S. O. Rogero, O. Z. Higa, M. Saiki, O.V. Correa, I. Costa, “*Toxicology in Vitro*”, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.
- [14] Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, “*Fundamento da Biologia Celular*”, pág. 597-598, Edição Universitária, Ed. Artmed, RS, 2002.
- [15] L. C. JUNQUEIRA, J. CARNEIRO, “*Histologia Básica*”, pág. 1-8, 9ª Edição, Ed. Guanaba Koogan, RJ, 1999.
- [16] V. KUMAR, R. S. COTRAN, S. L. ROBBINS, “*Patologia Básica*,” pág. 44, 5ª Edição, Ed. Guanabara Koogan, RJ, 1994.
- [17] R. C. Henrikson, G. I. Kaye, J. E. Mazurkiewicz, “*Histologia, National Medical Series para Estudos Independentes*”, Ed. Guanabara Koogan, RJ, 1999.
- [18] W. ARNS, H. G. DOMINGUES, L. T. COSWIG, R. C.F D'ARCE, R. S. ALMEIDA, R. F. CARVALHO, “Noções Básicas de Cultivo de células Animais”, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia / UNICAMP, Campinas, 2004.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	2
1. – Introdução	2
CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
2.1 – História do Diamante.....	3
2.2 – Processos para Obtenção do Filme de Diamante Erro! Indicador não definido.	
2.3 – Técnicas de Deposição do Diamante-CVD	4
2.3.1 – Ativação por Filamento Quente	4
2.3.2 – Ativação por Chama de Combustão	4
2.3.3 – Ativação por Plasma	4
2.4 – Princípio Básico da Deposição pelo Método de HFCVD	5
2.5 - Biocompatibilidade	6
2.6 – Cultura de Células	7
2.7 – Fibroblasto	8
2.8 – Adesão celular.....	8
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1 – Deposição de Diamante-CVD.....	9
3.2 – Ensaio de Citotoxicidade	10
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E ANÁLISES.....	12
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19