



## **Caracterização de Amostras Rugosas**

### **por Microscopia de Força Atômica**

**Jing Guo Zhao**

Tese apresentada na Faculdade de Engenharia  
Elétrica e de Computação da Universidade  
Estadual de Campinas para a obtenção do  
Título de Doutor em Engenharia Elétrica

Orientador: Prof. Dr. Vítor Baranauskas

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

.....  
Prof. Dr. Steven Frederick Durant

.....  
Prof. Dr. Alfredo Carlos Peterlevitz

.....  
Prof. Dr. Helder José Ceragioli

.....  
Prof. Dr. Vítor Baranauskas

.....

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

J564a           Jing Guo, Zhao  
                  Caracterização de amostras rugosas por microscopia  
de força atômica / Jing Guo Zhao. --Campinas, SP:  
[s.n.], 2003.

                  Orientador: Vitor Baranauskas.  
                  Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de  
Computação.

                  1. Filme fino. 2. Ciência dos materiais. 3.  
Topografia. 4. Microscopia de força atômica. 5.  
Superfícies. I. Baranauskas, Vitor. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica  
e de Computação. III. Título.

*Dedico esta tese à minha querida mãe Liu Li, ao meu querido pai Zhao Yunwen,  
à minha querida finha Zhao Minghua, à minha amada esposa Li Bin Bin,  
à minha irmã Zhao Ling Ling  
e aos meus irmãos Zhao Jingzhong, Zhao Jिंगgang e Zhao Jingqiang*

## **Agradecimentos**

A todos os que colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. Vitor Baranauskas, pela incansável orientação, colaboração e amizade sem as quais não seria possível realizar este trabalho.

Ao Dr. Alfredo Carlos Peterlevitz, por suas ótimas sugestões técnicas e suas valorosas contribuições.

Ao Dr. Helder J. Ceragioli por suas valorosas contribuições e auxílio, como amigo, nas horas difíceis.

Ao meu colega, Márcio Fontana, por suas valiosas contribuições.

Ao meu colega, Marcelo Carvalho Tosin, por algumas discussões técnicas

Ao assessor anônimo do processo CNPq nº 149717/1999-7, por suas valiosas críticas e sugestões no decorrer do trabalho de tese.

Aos membros da Banca Examinadora, pelas arguições e sugestões para a redação final da tese.

Ao Departamento de Semicondutores, Fotônica e Instrumentos da FEEC da Unicamp pela recepção no programa de pós-graduação.

Ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil, pelo apoio financeiro.



## Resumo

Estudamos a aplicação da técnica de microscopia de força atômica em materiais com características morfológicas muito distintas. Um dos materiais que tomamos como exemplo foi o diamante nitrogenado, produzido pela deposição química do etanol em reator de filamento quente, com adição de nitrogênio. Observamos a morfologia de formação de plaquetas e comparamos a rugosidade superficial das mesmas em função da concentração de nitrogênio. Outro material tomado como exemplo foram tíbias de rato, lesionadas cirurgicamente, e cuja regeneração natural foi acompanhada através da microscopia de força atômica em diversos estágios. Estes trabalhos serviram como modelos para futuros trabalhos do uso da MFA no diagnóstico de ósteo-integração de próteses de diamante

**Palavras-chave:** microscopia de força atômica, diamante nitrogenado, osso, próteses

## Abstract

We studied the application of atomic force microscopy (AFM) for materials with very different morphologies. Nitrogenated diamond was one of the two materials used in this work. The samples were produced by the chemical vapor deposition of ethanol in a hot-filament system, with nitrogen added to the gas feed. We observed in the AFM images the formation of smooth “platlets” and compared their surface roughness as a function of nitrogen concentration in the reactor feed. The second material we used was bone, extracted from previously injured rat tibiae. The natural bone recovery was diagnosed by the MFA analysis at several recovery stages. The knowledge earned from these works will be applied in the near future in the analysis of experiments of osteo-integration of diamond bone prosthesis.

**Keywords:** : atomic force microscopy, nitrogenated diamond, bone, prosthesis

# Conteúdo

<i>Agradecimentos</i>	<i>i</i>
<i>Resumo</i>	<i>iii</i>
<b>Capítulo I – Introdução.....</b>	<b>1</b>
Organização da tese.....	1
<b>Capítulo II – Princípios da microscopia de força atômica.....</b>	<b>2</b>
1. Introdução.....	2
2. Princípio de funcionamento.....	3
3. Componentes básicos da MFA.....	5
4. Modos de operação.....	9
5. Referências.....	10
<b>Capítulo III – Caracterização de amostras de diamante nitrogenado.....</b>	<b>12</b>
1. Introdução.....	12
2. Detalhes experimentais.....	13
3. Resultados e discussão.....	14
4. A interface diamante/SiO <sub>2</sub> .....	17
5. Conclusões.....	21
6. Referências.....	22
<b>Capítulo IV – Caracterização de amostras de osso.....</b>	<b>23</b>
1. Introdução.....	23
2. Procedimento experimental.....	23
3. Resultados e discussão.....	24
4. Conclusões.....	29
5. Referências.....	29
<b>Capítulo V – Considerações finais.....</b>	<b>31</b>
<b>Apêndice I – Trabalhos publicados.....</b>	<b>32</b>

# **Capítulo I**

## **Introdução**

### **1. Organização da tese**

A invenção da Microscopia de Tunelamento deu origem a exploração da morfologia tridimensional de superfícies de diferentes tipos de materiais eletricamente condutores. Além disto, proporcionou a motivação para o desenvolvimento de outras técnicas de análise de varredura com diversos tipos de pontas de prova e o surgimento da nanotecnologia. Neste cenário destaca-se a Microscopia de Força Atômica (MFA) desenvolvida por Binnig, Quate e Gerber, em 1986, a qual possibilitou a análise de materiais condutores, e também de materiais não condutores, como por exemplo, os materiais biológicos. Nesta tese exploramos a aplicação da microscopia de força atômica em dois materiais com características de superfície bastante distintas, que são o diamante nitrogenado e a tíbia óssea. O diamante nitrogenado foi analisado com o objetivo de quantificar sua rugosidade para aplicações eletrônicas e a tíbia foi analisada para explorar a possibilidade do uso da MFA como uma ferramenta de diagnóstico de regeneração de lesões.

Esta dissertação está organizada em cinco capítulos e um apêndice. O Capítulo I é um indicador da organização da tese, sendo o Capítulo II efetivamente o capítulo de introdução à técnica de microscopia de força atômica.

O Capítulo III focaliza as análises de MFA de filmes de diamante crescidos em ambiente nitrogenado e o Capítulo IV apresenta as análises de MFA realizadas em tíbias de ratos lesionadas cirurgicamente e acompanhadas durante sua regeneração natural pelas análises de MFA. No Capítulo V apresentamos nossas considerações finais.

No Apêndice I apresentamos a lista dos trabalhos que publicamos em revistas internacionais durante o período de trabalho de tese.



## **Capítulo II**

### **Princípios da Microscopia de Força Atômica**

#### **1. Introdução**

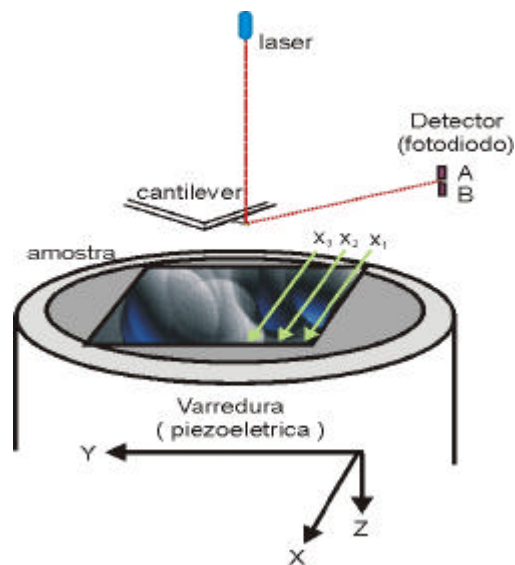
A Microscopia de Força Atômica (MFA) foi desenvolvida por Binnig, Quate e Gerber, em 1986, partindo-se das técnicas desenvolvidas e utilizadas na Microscopia de Tunelamento de Elétrons (MTS) [1]. A MFA possibilita uma resolução tridimensional similar a MTS, mas pode ser utilizada diretamente em amostras de materiais eletricamente isolantes ou condutores [2]. A potencialidade da MTS para medir a topografia de superfícies é excelente. Entretanto, uma condição indispensável da MTS é que as superfícies das amostras e da ponta de prova devem ser boas condutoras elétricas. Esta restrição limita as áreas de aplicação desta técnica. Esta limitação foi superada com o surgimento da MFA. O primeiro equipamento de MFA foi produzido comercialmente em 1989. A MFA é derivada tecnologicamente da técnica de MTS, porém com a grande vantagem de poder caracterizar materiais eletricamente isolantes [3]. Este método também permite caracterizar superfícies em escala atômica, com resolução na ordem de grandeza de Angstrom.

As vantagens práticas da utilização da MFA consistem em não haver necessidade de preparo prévio das amostras, desde que suas dimensões estejam dentro das especificações do equipamento. É uma técnica muito atraente para estudar a superfície de materiais biológicos pelo fato de poder analisar a amostra diretamente sem a necessidade de secagem, desidratação ou a deposição de outros materiais a fim de tornar a superfície da amostra condutora, como também exige a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) [4, 5]. O ambiente de utilização do microscópio de força atômica deve ser protegido contra interferências de ruídos elétricos, e vibrações mecânicas, mas não há necessidade de vácuo.

Nas próximas seções são apresentados de forma resumida; o princípio de funcionamento da MFA, seus componentes básicos, resolução espacial e modos de operação.

## 2. Princípio de Funcionamento

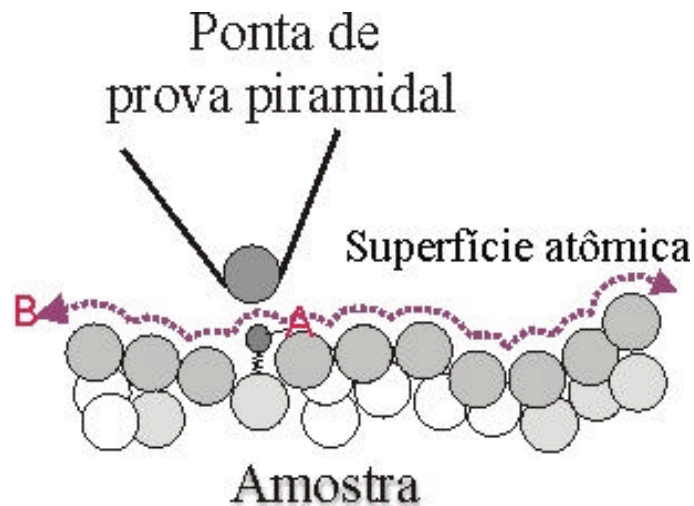
A Figura 2-1 apresenta uma ilustração geométrica do processo de varredura da amostra e da coleta de dados.



**Figura 2-1.** Esquema básico do posicionamento da ponta de prova e de sua varredura sobre a superfície da amostra para a coleta de dados ponto a ponto da superfície.

O princípio do funcionamento da MFA consiste na varredura de uma ponta cristalina sobre a amostra. Este cristal, de forma pontiaguda, é ligado no vértice de uma micro-viga com balanço em forma de "V". A micro-viga tem uma constante elástica conhecida, e é flexionada pelas forças de atração e repulsão entre a amostra e a ponta, devido a variação vertical da superfície da amostra. Um circuito de realimentação permite que a cerâmica piezoelétrica mantenha a ponta com uma força constante (para obter a informação da altura) ou altura constante (para obter a informação da força) acompanhando a superfície

da amostra. Sobre o cristal é colocado um sensor de deflexão para registrar a variação vertical da superfície da amostra, que ocorre durante a varredura. A força utilizada é da ordem de grandeza das forças interatômicas (cerca de  $10^{-9}$  Newton), o que leva esta técnica de análise ser comumente denominada de “Microscopia de Força Atômica”. A força estabelecida entre a ponta de prova e a amostra deve ser suficientemente pequena para não ocorrer danos à superfície da amostra durante o processo de varredura [6].



**Figura 2-2.** Esquema básico da interação atômica da superfície com a ponta de prova

A Figura 2-2 ilustra a ponta de prova percorrendo a superfície atômica de uma amostra, isto é, seguindo o contorno da superfície (percurso B), através da interação com os seus átomos (A).

Um feixe de laser incide no vértice da micro-viga, muito próximo da ponta sensora, e é refletido sobre um fotodetector de duplo elemento. A diferença das intensidades de luz detectada em cada um dos elementos é convertida em um sinal elétrico (tensão) de realimentação. Este sinal alimenta o sistema de controle e o sistema de controle do *software* no microcomputador de forma que a ponta de prova mantenha uma força constante ou uma altura constante dependendo da forma de operação desejada. A medida registrada pelo equipamento depende da constante elástica da micro-viga que é,

tipicamente, da ordem de 1 Newton/m. Neste caso, a força aplicada a micro-viga é dada por:

$$F_{lever}(x) = F_{tip} \frac{x^2(x - 3x_0)}{2L^3} \quad (1)$$

onde  $F_{tip}$  é a força aplicada na ponta de prova,  $L$  é o comprimento da microviga e  $x_0$  é a posição inicial da ponta de prova.

O deslocamento da microviga é dado por:

$$z(x) = \frac{F_{lever}(x)}{k_c} = \frac{F_{tip}}{k_c} \frac{x^2(x - 3x_0)}{2L^3} \quad (2)$$

onde  $k_c$  é a constante elástica da micro-viga [7].

Dessa forma, a deflexão da micro-viga torna-se uma função não linear com o aumento da força, podendo ser modelada por uma função polinomial do tipo:

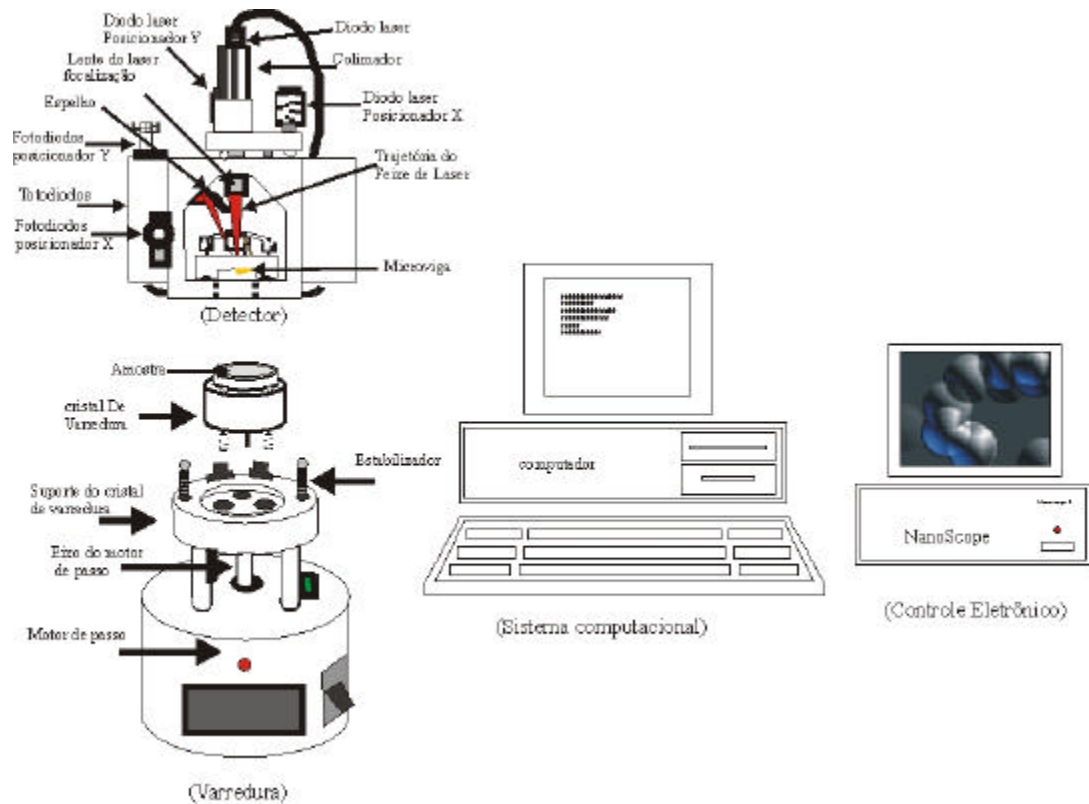
$$F(z) = k_c z + C_{ii} z^2 + C_n z^n \quad (3)$$

### 3. Componentes básicos da MFA

A Figura 2-3 ilustra as principais partes de um Microscópio de Força Atômica, destacam-se: sistema de varredura, controle eletrônico, sistema detector e o sistema computacional.

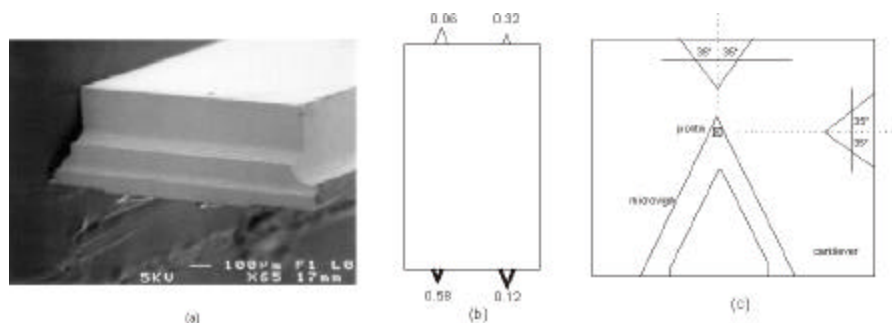
O sistema de detecção do microscópio de força atômica consiste tipicamente por uma fonte de laser, fotodetector e micro-viga com ponta de prova. Este sistema possibilita medir a força aplicada entre a ponta de prova e a amostra durante a varredura da superfície da amostra, realizada pelo piezelétrico, de modo que o espaçamento seja mantido constante entre a ponta e a amostra ou que a força seja mantida constante entre ponta e amostra (distância entre ponta e amostra variável). O princípio de detecção consiste na aplicação de um feixe de laser colimado sobre a superfície superior da micro-viga, que é normalmente espelhada, em uma trajetória de incidência próxima da normal. O feixe refletido é detectado pelo fotodetector que indica a posição vertical da ponta. Com a variação da força entre a ponta de prova e a amostra, ocorre a deflexão da micro-viga e portando variação na

intensidade relativa do feixe refletido no fotodetector, permitindo medir a deflexão vertical.



**Figura 2-3.** Componentes básicos do microscópio de força atômica típico

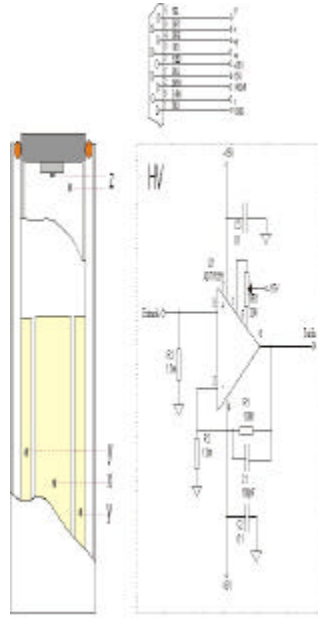
A Figura 2-4 (a, b, c) apresenta a imagem de microscopia eletrônica de varredura da pastilha de suporte da micro-viga (a), o esquema do conjunto de quatro micro-vigas com diferentes constantes de mola na mesma pastilha (b) e detalhe da geometria em forma de “V” da micro-viga com a ponta piramidal no vértice do “V”, respectivamente.



**Figura 2-4.** *Ilustração da micro-viga. (a) imagem obtida por MEV mostrando uma pastilha de silício com duas micro-vigas de nitreto de silício engastadas em sua superfície inferior; (b) esquema ilustrando quatro micro-vigas com diferentes constantes de mola (0,06, 0,12, 0,32 e 0,58 N/m); (c) esquema da geometria piramidal da ponta de prova piramidal fixada no vértice do “V” da micro-viga.*

A micro-viga é fabricada por processos originalmente desenvolvidos para a fabricação de circuitos integrados, ver Figura 2-4 (a). A base principal onde a micro-viga é engastada é normalmente um cristal de silício. Em geral as micro-vigas são produzidas com a geometria de “V”, isto é, com duas pontas engastadas no silício e o vértice em balanceamento (ver Figura 2-4 (a) parte inferior). Normalmente, as micro-vigas são feitas de nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) com espessuras abaixo de 1 micrometro e dimensão laterais entre 100 e 200  $\mu\text{m}$  [9]. Como pode ser observado, ver Figura 2-4 (b), um bloco de silício contém pelo menos quatro micro-vigas de diferentes dimensões laterais, portanto com diferentes constantes de mola. Na prática, escolhe-se a micro-viga em função da constante de mola mais adequada para a caracterização particular de uma amostra. No vértice das micro-vigas existe uma única ponta piramidal, ver detalhe Figura 2-4 (c). A ponta deve ser pontiaguda o suficiente para proporcionar uma resolução lateral da ordem de 1 nm. Em geral as pontas de nitreto de silício são piramidais, pois utilizam como molde formas escavadas quimicamente segundo os eixos cristalográficos do silício (111) na direção da superfície.

A Figura 2-5 apresenta o esquema básico do tubo piezoelétrico que é utilizado para proporcionar o acionamento da micro-viga.



**Figura 2-5.** Esquema ilustrativo do tubo piezoelétrico responsável pela movimentação da amostra nos eixos X-Y-Z

O deslocamento do sistema de varredura do microscópio de força atômica é realizado através de um tubo cerâmico piezoelétrico que possibilita a movimentação da amostra nos eixos X-Y-Z. Tipicamente, a micro-viga e o sistema de detecção são fixos em relação à base e o movimento é feito pela amostra em relação ao detector, no plano horizontal. As tensões aplicadas em diferentes partes do tubo piezoelétrico permitem deslocar a amostra tanto no plano X-Y quanto no eixo Z.

O sistema de controle eletrônico interconecta o sistema de varredura, detecção e operação do computador. O sistema eletrônico controla a cerâmica piezoelétrica, o deslocamento da ponta na micro-viga, o espaçamento entre a amostra e a ponta de prova e a amplificação do sinal do fotodetector [10,11].

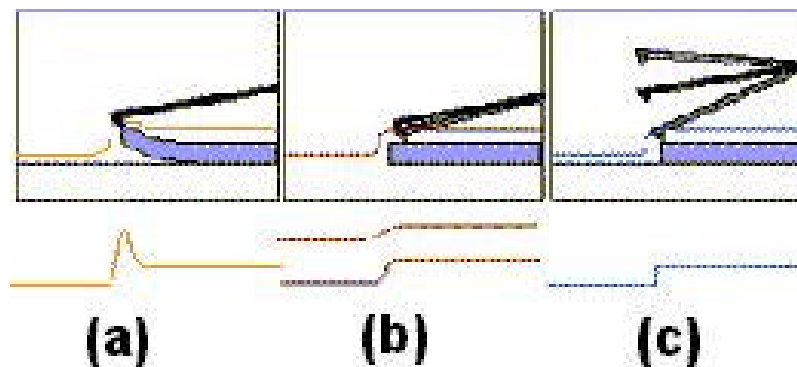
Em geral o circuito mede a intensidade da razão entre a diferença e a soma dos sinais dos fotodiodos.

$$\frac{V_A - V_B}{V_A + V_B} \quad (4)$$

onde  $V_A$  e  $V_B$  são os sinais dos fotodiodos [12].

#### 4. Modos de operação

A Figura 2-6 (a, b, c) apresenta os esquemas dos modos de operação de contato, sem contato e vibracional, que podem ser utilizados no microscópio de força atômica, respectivamente. O modo de operação de contato, ver Figura 2-6(a), é o mais utilizado na microscopia de força atômica. A ponta de prova faz a varredura em contato com a superfície da amostra. A força na ponta de prova é repulsiva e têm valores médios em torno de  $10^{-9}$  N. Esta força é ajustada empurrando a micro-viga de encontro à superfície da amostra através da cerâmica piezoelétrica. No modo de operação de contato, a deflexão da micro-viga é detectada e comparada pelo amplificador de realimentação DC a um determinado valor de deflexão. Quando a deflexão medida é diferente do valor especificado, o amplificador de realimentação aplica uma tensão à cerâmica piezoelétrica (subindo ou abaixando a amostra em relação a micro-viga), para restaurar o valor desejado da deflexão.



**Figura 2-6.** *Modos de operação: (a) contato, (b) sem contato e (c) vibracional*

Os maiores problemas no modo de operação de contato são causados pelas forças excessivas aplicadas pela ponta de prova na amostra. Dependendo da intensidade da força



pode ocorrer a deformação da amostra, quebra da ponta de prova ou distorção dos resultados.

Uma tentativa de minimizar estes problemas é utilizar o modo de operação sem contato, ver Figura 2-6 (b). O modo de operação sem contato é usado em situações onde o contato da ponta de prova pode alterar a amostra. Neste modo de operação, a ponta de prova é localizada em torno de 50 a 150Å acima da superfície da amostra. Devido às forças de Van der Waals a ponta de prova e a amostra sofrem interações e a imagem da superfície da amostra é construída sem o contato da ponta de prova com a superfície.

Finalmente, o modo de operação vibracional, ver Figura 2-6 (c), é um modo de realimentação dinâmico que permite melhorar a resolução das imagens de alguns tipos de amostras sem induzir forças de atrito destrutivas. No modo vibracional, a amplitude de oscilação da micro-viga é mantida constante pelo circuito de realimentação, de modo a não haver contacto direto entre a ponta de prova e a amostra. A imagem é obtida através das variações de amortecimento da vibração, induzidas pela interação da ponta e da amostra.

## 5. Referências

- [1] G. Binnig, C. F. Quate and C. H. Gerber, Phys. Rev. Lett. 50 (1983), 120-123.
- [2] G. Binnig and C. F. Quate, Phys. Rev. Lett. 930, (1986), 56.
- [3] G. Binnig and H. Rohrer, Sci. Am. 253, (1985), 50.
- [4] D. I. Cherny, A. Fourcade, F. Svinarchuk, P. E. Nielsen, C. Malvy and E. Delain; Biophys. J. 74 (1998), 1015.
- [5] A. Fischer, F.C. Jentoft, G. Weinberg, R. Schlogl, T. P. Niesen, J. Greachner, O. Wolter e R. Kassing, J. Mat. Res. (1999), 3725.
- [6] D. R. Baselt, J. D. Baldeschwieler, Rev. Sci. Instr. 64 (1993) 908 – 911.
- [7] Digital Instruments, Inc.; NanoScope II Instruction Manual, V5, (1990), 95
- [8] M. Nonnenmacher, J. Greschner, O. Wolter e R. Kassing, J. Vac. Sci. Technol. B9(2), (1991)
- [9] NanoProbe SPM Buyers Guide, <http://di.com/products/TG.TappingMode.html>.

- [10] W. G. Cady, "Piezoelectricity", McGraw-Hill, Revised Edition by Dover Publications, New York (1964).
- [11] M. E. Caspari and W.J.Merz, Phys. Rev. 80,(1950) 1082 - 1089
- [12] Digital Instruments, Inc., NanoScope II Instruction Manual, V5, (1990), 72.

## **Capítulo III**

### **Caracterização de Amostras de Diamante Nitrogenado**

#### **1. Introdução**

O sucesso da síntese do diamante por deposição química a partir da fase vapor (CVD) tem aberto a possibilidade para o diamante tornar-se um material importante na produção de dispositivos eletrônicos [1,2]. Uma consequência disto é o aumento do interesse quanto à produção de filmes de diamante com propriedades adequadas às necessidades da indústria eletrônica. Por exemplo, para a aplicação em dispositivos integrados, como diodos, transistores, capacitores, e outros, são necessários filmes de diamante cristalino dopado e que tenham rugosidade superficial muito pequena [3].

A síntese do diamante CVD se faz usualmente pela dissociação de uma fonte de carbono gasosa fortemente diluída em hidrogênio. O hidrogênio atua como um catalisador eficiente para a hibridização das ligações livres existentes dos átomos de carbono que já foram depositados sobre o substrato, de maneira que os átomos de carbono que vão chegando podem formar ligações C-C com facilidade [4]. Este processo produz, entretanto, com frequência, um filme de estrutura colunar com as facetas dos grãos terminando com planos (111), resultando um filme de rugosidade muito alta.

A adição de outros gases na alimentação do processo CVD pode modificar a cinética do processo de cristalização a nível atômico e contribuir para a modificação da rugosidade final da superfície do filme de diamante. O nitrogênio, em particular, é um gás adequado para estes estudos, pois sabe-se que sua presença na alimentação do processo CVD pode induzir o facetamento (100) dos grãos de diamante [5,6]. O nitrogênio forma, também, diversas estruturas estáveis dentro da estrutura do diamante, tais como defeitos pontuais, agregados e defeitos planares [7,8]. Poucos estudos, entretanto, têm sido feitos de síntese de diamante com altas concentrações de nitrogênio [9] e nenhum tem feito um exame detalhado da morfologia dos filmes.

O presente Capítulo apresenta um estudo da morfologia de filmes de diamante, realizado por MFA. Os filmes foram depositados sobre substratos de Si oxidado em um reator de CVD assistido por filamento quente e alimentado com a mistura de  $C_2H_5OH+H_2+N_2$  com 15-20% vol. de  $N_2$ . Este trabalho mostra que podem ser obtidas placas quadradas de rugosidade nanométrica, formando o topo da superfície de filmes de diamante. Discute-se a análise dos filmes feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (MFA) e espectroscopia micro-Raman.

## 2. Detalhes Experimentais

Os filmes de diamante foram depositados a partir de misturas de álcool etílico ( $C_2H_5OH$ ) diluído em hidrogênio (99,5 % vol.) em um sistema de deposição química a partir da fase vapor (CVD), assistido por filamento quente [10]. O sistema consiste de um filamento de tungstênio de 238  $\mu m$  de diâmetro, em forma de espiral e comprimento de 5 cm, montado dentro de uma câmara cilíndrica de quartzo, em vácuo, bombeado por uma bomba de palhetas rotativas. A potência típica fornecida ao filamento foi de 160 W. A temperatura de deposição, medida por um termopar no lado inferior do substrato, esteve na faixa de 1120-1170 K. Os gases (pureza de 99,9 %) para alimentar o reator foram dosados por controladores de fluxo de massa de precisão. O nitrogênio foi adicionado à mistura em proporções de 15-20 % do volume. A taxa de fluxo total foi de cerca de 120 sccm (centímetros cúbicos, nas condições normais de temperatura e pressão, por minuto). A pressão total foi mantida em aproximadamente 20 Torr. Foram empregados tempos de deposição de 6 h.

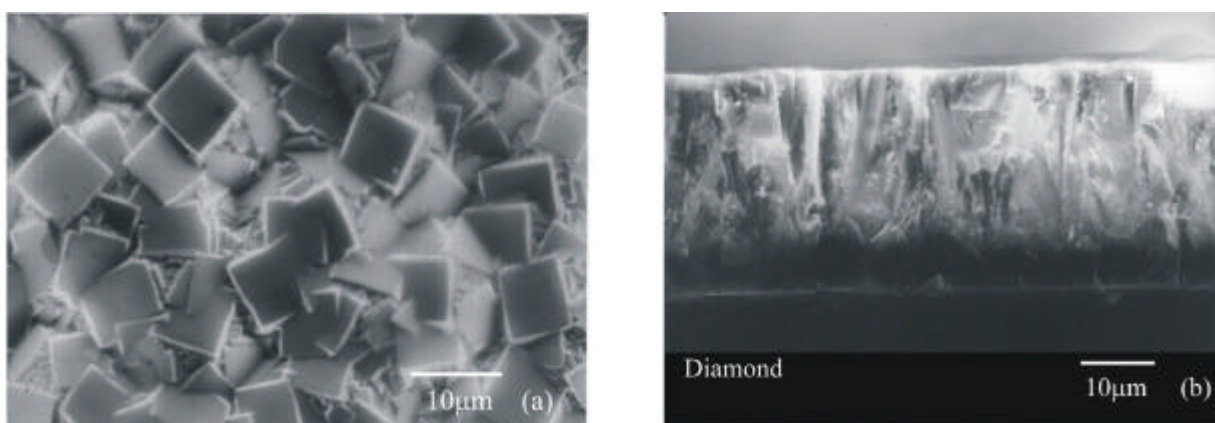
Foram empregadas pastilhas de silício como substrato. As pastilhas de silício foram oxidadas termicamente em ambiente seco, tendo filme de óxido de no mínimo 200 nm de espessura. Antes da deposição de diamante, as pastilhas oxidadas foram imersas numa mistura coloidal de pó de diamante (diâmetro de 0,25  $\mu m$ ) disperso em *n*-hexano por vibração em ultrassom. Este tipo de “semeadura” tem sido o procedimento usual empregado para se aumentar a densidade de nucleação inicial dos filmes de diamante [11].

A morfologia da superfície foi analisada por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica utilizando-se, respectivamente, os equipamentos JSM-5900 LV

SEM e Nanoscope II AFM. A espectroscopia Raman foi realizada à temperatura ambiente, utilizando-se um sistema de microsonda Renishaw, equipado com um microscópio, cujo diâmetro da área focal é de aproximadamente  $2\text{ }\mu\text{m}$  de um laser de  $\text{Ar}^+$  (potência de  $6\text{ mW}$ ) para  $\lambda = 514,5\text{ nm}$ .

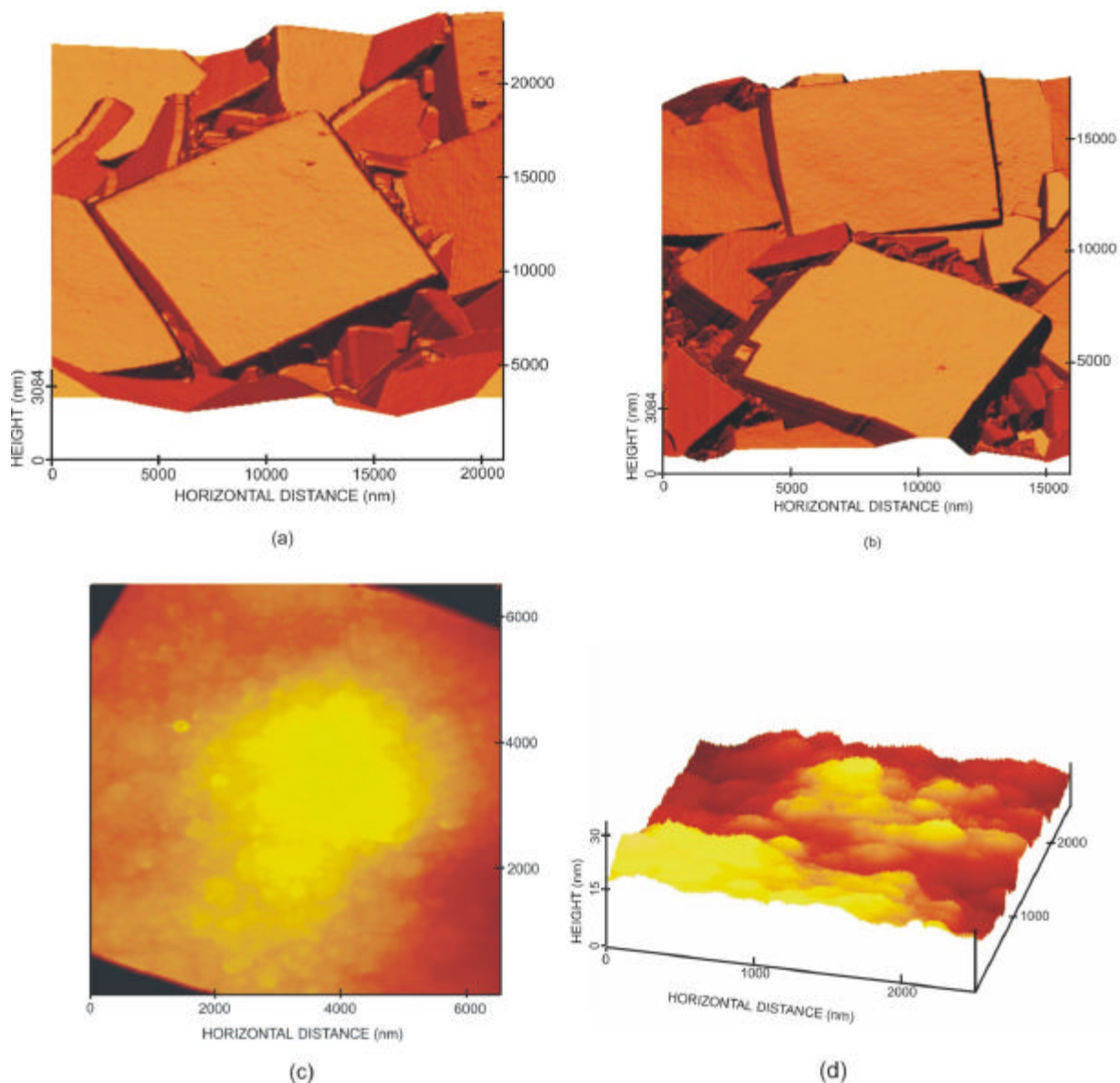
### 3. Resultados e Discussão

A Figura 3.1 (a) mostra uma vista típica de topo, obtida por microscopia eletrônica de varredura, da imagem de um filme de diamante tal como sintetizado, com concentração de nitrogênio de  $20\%$  do volume. Nota-se que a superfície é coberta de estruturas com facetamento bem definido, de forma retangular, e tamanhos relativamente uniformes (quadrados de cerca de  $6\text{ }\mu\text{m}$  de lado). Observou-se fortes efeitos de carregamento na análise de MEV (devido à camada isolante de  $\text{SiO}_2$  sob o filme e devido à alta resistividade do próprio filme). A Figura 3.1 (b) mostra uma imagem típica de MEV obtida de uma secção transversal de fratura desta amostra. A área escura, na parte inferior desta figura, corresponde à interface  $\text{SiO}_2 /$  (substrato de  $\text{Si}$ ). Nota-se que a interface diamante/ $\text{SiO}_2$  e a superfície superior do filme são muito uniformes. Com a espessura desta secção pode-se estimar que a taxa de crescimento média é em torno de  $6\text{ }\mu\text{m h}^{-1}$ .

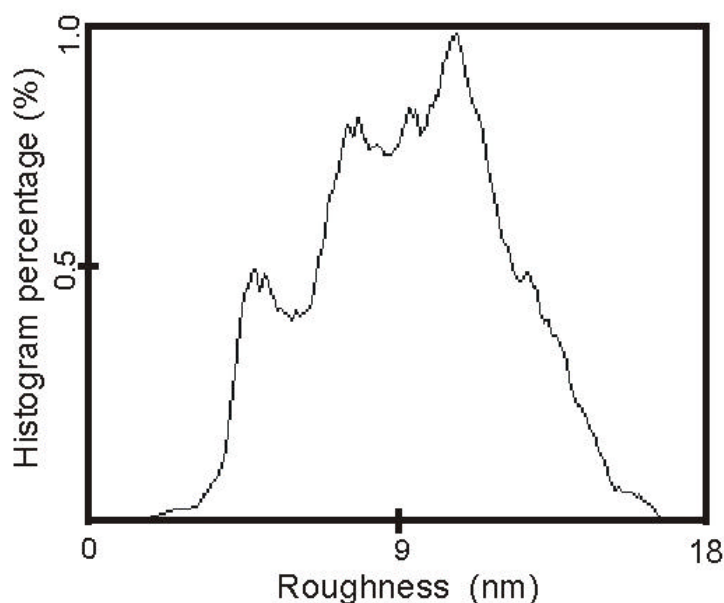


**Figura 3-1.** Imagem típica de SEM: (a) vista de topo e (b) vista da secção transversal

A caracterização da superfície destas amostras por MFA possibilitou uma caracterização tridimensional mais detalhada. A Figura 3-2 (a) e (b) mostra imagens de MFA típicas, tomadas em diferentes lugares da amostra. Pode-se observar que as estruturas planas são praticamente mesoscópicas, parecendo como folhas cristalinas espalhadas sobre uma superfície plana. A espessura aparente destas “placas” é de cerca de  $1.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ , tendo sido este valor determinado estatisticamente a partir das imagens de MFA. A Figura 3-2 (c) mostra uma imagem da superfície com maior amplificação, correspondendo a área inferior da “placa” mostrada na Figura 3-2 (b). Podem ser observadas algumas agregações superficiais, porém sem qualquer forma cristalina identificável. A região com amplificação ainda maior [ver Figura 3-2 (b)] mostra que esta superfície apresenta uma rugosidade muito pequena, caracterizada pelo histograma (não Gaussiano) de distribuição de alturas, centrado em 11 nm e com altura máxima de 17 nm (ver Figura 3-3).



**Figura 3-2.** *Imagens típicas de MFA com magnificações diferentes de um filme de diamante depositado sobre SiO<sub>2</sub>, com concentração de nitrogênio de 20% vol., mostrando a morfologia tri-dimensional de sua superfície (a), (b); detalhes da superfície das “placas” (c), e a imagem de tri-dimensional de sua rugosidade nanométrica.*



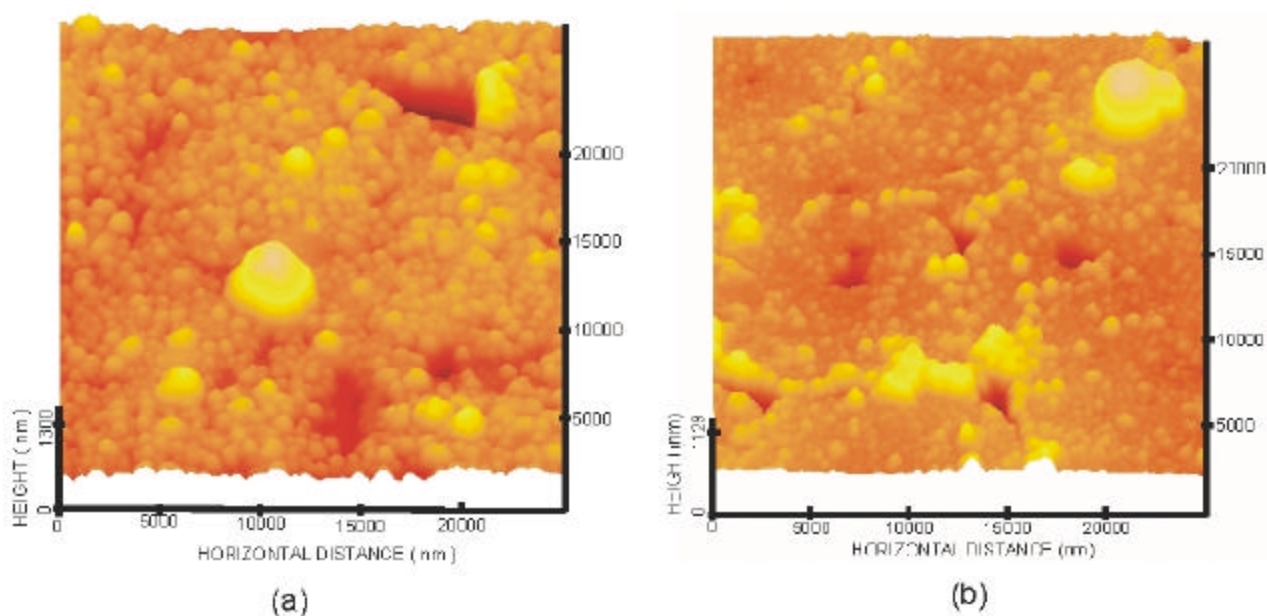
**Figura 3-3.** *Histograma típico de distribuição de rugosidade das “placas” de diamante mostradas na Figura 3-2.*

#### **4. A Interface Diamante/SiO<sub>2</sub>**

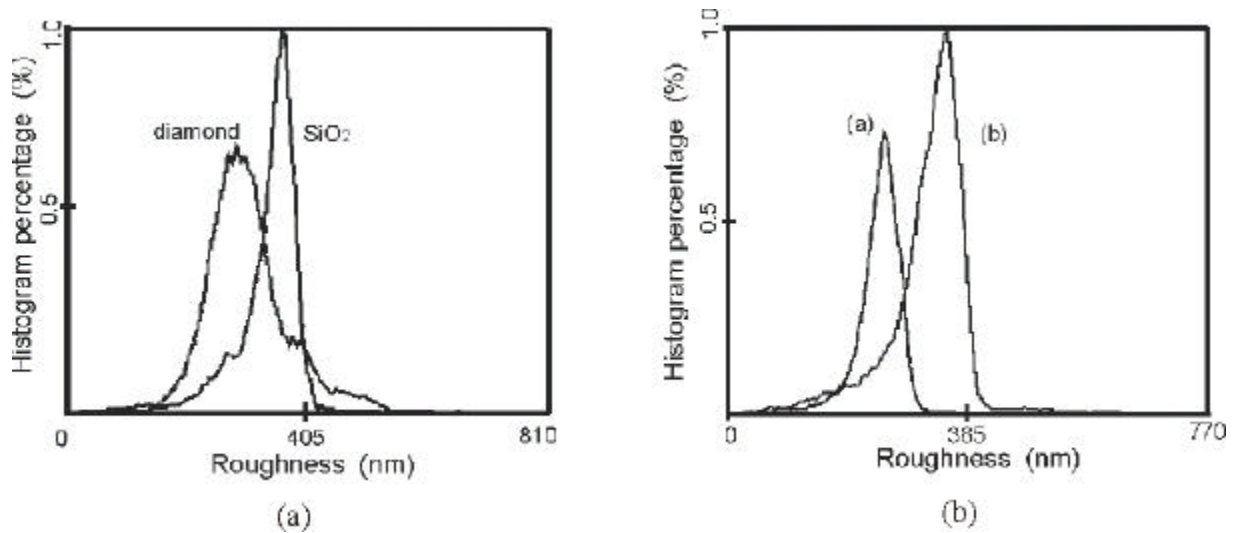
Para analisar a rugosidade da interface diamante/SiO<sub>2</sub> é necessário remover o filme de diamante do substrato. Este procedimento foi realizado usando um estilete, pressionando-o sobre a área de fratura da amostra. As Figuras 3-4 (a) e (b) mostram a topografia da camada de SiO<sub>2</sub> [Figura 3-4 (a)] e da superfície do filme de diamante [Figura 3-4(b)] que estava em contato com a superfície de SiO<sub>2</sub>. A resolução vertical em escala nanométrica das imagens de MFA permite a medição da rugosidade sub-micrométrica, de ambas superfícies. Alguns picos mais altos (áreas com cor mais clara) também são observados nas imagens mas, provavelmente, eles são decorrentes dos resíduos devido a separação forçada do filme de diamante da superfície de SiO<sub>2</sub>. Excluindo-se estes picos, o histograma de altura destas superfícies [ver Figura 3-5 (a)] indica que elas têm rugosidades semelhantes, entre 250 e 380 nm. Isto sugere que crescimento do diamante no primeiro período de nucleação, praticamente



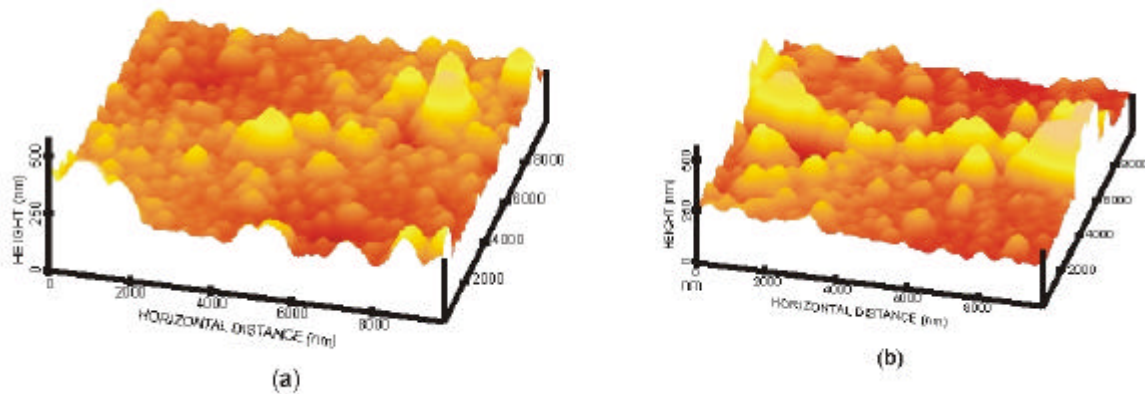
tomou a forma da topografia da superfície de  $\text{SiO}_2$ . Podemos também constatar [ver Figura 3-4 (b)], que a superfície do diamante apresenta áreas de maior planicidade, separadas por áreas mais rugosas. Aparentemente, as áreas mais rugosas correspondem às bordas dos contornos de grãos dos filmes de diamante. Figura 3-6 (a) e (b) mostram imagens de resolução mais alta da superfície do diamante, correspondentes às áreas superior e inferior esquerda, mostradas na Figura 3-6 (b). A Figura 3-6 (a) corresponde à parte superior de um grão de diamante ou a uma área de nucleação nanométrica, enquanto a imagem mostrada na Figura 3-6 (b) corresponde a uma área de contornos de grão ou de pequena densidade de nucleação. Comparando os histogramas de rugosidade, correspondentes as alturas destas áreas (ver Figura 3-5(b)) concluímos que a área dos contornos de grão, cujo histograma é centrado em torno de 380 nm, é o contribuinte principal para o aumento na estatística da rugosidade quando se considera uma área maior do fundo do filme de diamante. (ver Figura 3-5(a)).



**Figura 3-4.** *Imagens de MFA das interfaces diamante/ $\text{SiO}_2$  mostrando as observações topográficas da (a) superfície superior da camada de  $\text{SiO}_2$  e (b) da superfície inferior do filme de diamante.*

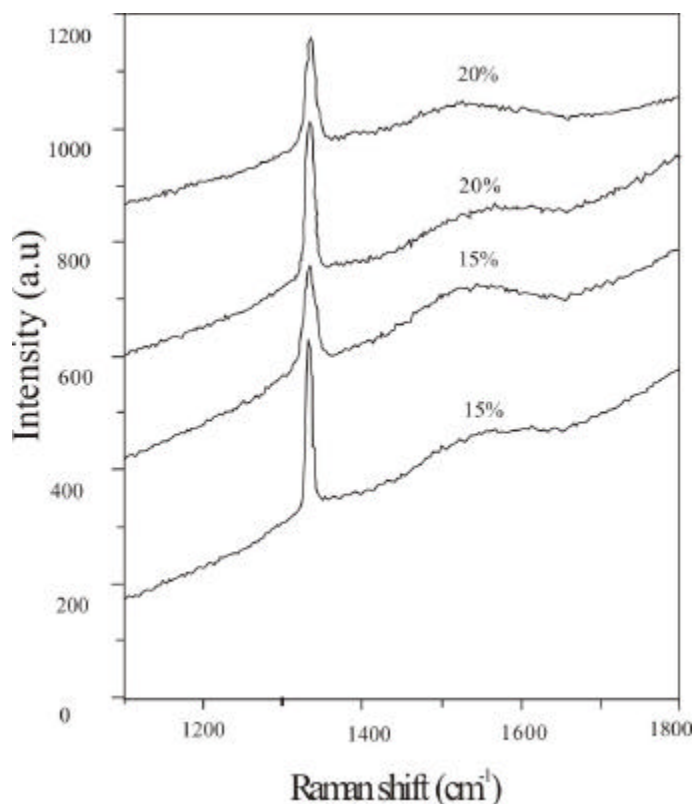


**Figura 3-5.** (a) Comparação dos histogramas da distribuição de rugosidade da superfície superior da camada de  $\text{SiO}_2$  e da superfície inferior do filme de diamante. (b) Comparação dos histogramas de distribuição rugosa tomadas nas áreas diferentes da superfície inferior do filme de diamante. O histogramas (a) e (b) correspondam a medidas de altura nas áreas mostradas na Figura III-6 (a) e (b), respectivamente.



**Figura 3-6.** Imagens de MFA da superfície superior do filme de diamante, feito com maior ampliação na área do canto esquerdo da Figura 3-4(b). Detalhes uma área de boa nucleação nanométrica (ou o fundo de um grão de diamante) e de uma área de nucleação baixa (ou fronteira de grão), podem ser observados, respectivamente em (a) e (b).

A Figura 3-7 apresenta espectros Raman típicos das quatro amostras. Verificamos que o pico em  $1332\text{ cm}^{-1}$ , característico das ligações C-C  $\text{sp}^3$  [3], apresenta-se muito proeminente nos espectros de todas as amostras preparadas com 15-20% (vol.) de nitrogênio na linha de alimentação do reator. Não se observam grandes diferenças quando se muda a concentração de nitrogênio. As amostras também apresentam picos pequenos e largos em torno de  $1450\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo ao grafite, carbono amorfo, ou nitretos de carbono.



**Figura 3-7.** Espectros Raman típicos para quatro amostras de filmes de diamante depositados com concentrações de nitrogênio de 15 e 20% por volume.

Sabemos que os átomos de nitrogênio estão diretamente relacionados à formação de diversos tipos de defeitos pontuais e agregados nas estruturas do diamante, incluindo-se a formação de defeitos planares (100), conhecidos como plaquetas (“platelets”) [12-14]. Estas plaquetas, observadas em cristais naturais, tem sua origem, supostamente, no alinhamento de um número muito grande de defeitos do tipo B, que são os defeitos formados por agregados de quatro a oito átomos de nitrogênio ao redor de uma lacuna [6]. As plaquetas podem ser observadas por microscopia eletrônica de transmissão, porém pouco se sabe a respeito de sua

estrutura atômica. Os modelos existentes supõe que a estrutura das plaquetas tenham um ou dois planos (100) dentro do cristal de diamante, onde os átomos de carbono tenham sido substituídos por átomos de nitrogênio [12-14].

Este modelo de estrutura atômica pode ajudar a esclarecer as morfologias observadas neste trabalho. O hidrogênio tem uma função fundamental no crescimento de diamante pois ele induz a hibridização do carbono [3] do filme que está em crescimento. A substituição do hidrogênio por nitrogênio na cobertura da superfície de um filme de carbono já depositado pode induzir uma ação passivadora nesta superfície, uma vez que as ligações C-N são muito fortes e estáveis. Assim, a adição de nitrogênio pode inibir o crescimento do diamante na direção vertical, em relação a uma superfície onde já ocorrera a deposição. Se esta superfície for um plano (100), o crescimento do diamante poderá continuar, mas a uma taxa menor, formando estruturas tipo plaquetas. Na superfície lateral de tal estrutura os mecanismos de crescimento podem ser diferentes uma vez que há, provavelmente, um aumento na concentração de lacunas devido às distorções da estrutura diamantífera, causadas pela incorporação de nitrogênio substitucional na superfície (100). Pelo fato das lacunas apresentarem uma forte ação catalisadora para a deposição de carbono na forma diamantífera, a taxa do crescimento lateral do diamante deveria aumentar. Assim, a ocorrência simultânea da inibição da taxa do crescimento vertical e o estímulo da taxa do crescimento horizontal podem explicar as interessantes morfologias planares observadas nestas amostras.

## 5. Conclusões

Demonstramos que é possível depositar filmes de diamante com baixa rugosidade sobre substratos de Si cobertos com  $\text{SiO}_2$ , pelo processo de deposição química a partir da fase vapor assistido por filamento quente, com adição de gás nitrogênio (15-20% do volume) na mistura gasosa de  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{H}_2 + \text{N}_2$ . A superfície externa dos filmes apresenta estrutura de grãos bem facetados, de forma retangular (tamanho lateral  $\sim 6 \mu\text{m}$ ) e pequena rugosidade média ( $\sim 1 \text{ nm}$ ). Também a interface diamante/ $\text{SiO}_2$  é relativamente plana, apresentando histogramas de rugosidade com os picos de altura centrados entre 250 e 380 nm. A espectroscopia Raman indicou que os filmes são de diamante de boa qualidade, porém com grande número de defeitos associados, provavelmente, com as distorções da estrutura diamantífera, causadas

pelo nitrogênio substitucional. A grande quantidade de nitrogênio introduzido no processo CVD causou, aparentemente, mudanças na estrutura atômica do diamante, com a criação de defeitos planares semelhantes às plaquetas que ocorrem no diamante natural que é rico em nitrogênio. A cobertura da superfície do diamante em crescimento, com nitrogênio, faz diminuir, provavelmente, a taxa de crescimento vertical. Em contraste, a presença de nitrogênio substitucional na superfície do diamante pode provocar o aparecimento de lacunas laterais na estrutura diamantífera, que tem o efeito catalisador sobre a taxa de crescimento lateral do diamante. Concluímos que a combinação destas taxas de crescimento, em direções diferentes, podem explicar a morfologia tão interessante observada nos filmes de diamante nitrogenado [15].

## 6. Referências

- [1] J.C. Angus and C. C. Hayman, Science 241 (1988) 913.
- [2] W. A. Yarborough and R. Messier, Science 241 (1990) 688.
- [3] X. Z. Liao, R. J. Zhang, C. S. Lee, S. Tong Lee, and Y. W. Lam, Diamond Relat. Mater, 6 (1997) 521.
- [4] K. Tankala and T. DebRoy, J. Appl. Phys. 72 (1992) 712.
- [5] S. Jin and T. D. Moustakas, Appl. Phys. Lett. 65 (1994) 403.
- [6] R. Locher, C. Wild, N. Herres, D. Behr, and P. Koidl, Appl. Phys. Lett. 65 (1996) 759.
- [7] J. E. Walker, Rep. Prog. Phys. 42 (1979) 42.
- [8] T. Evans and P. Rainey, Proc. R. Soc. London, Ser. A 344 (1975) 111.
- [9] V. Baranauskas, B. B. Li, A. Peterlevitz, M. C. Tosin, and S. F. Durrant, J. Appl. Phys. 85 (1999) 7455.
- [10] V. Baranauskas, A. Peled, V. J. Trava-Airoldi, C. A. J. S. Lima, I. Doi, and E. J. Corat, Appl. Surf. Sci. 79/80 (1994) 129.
- [11] R. C. M. Barros, E. J. Corat, N. G. Ferreira, T. M. Souza, V. J. Trava-Airoldi, N. F. Leite, and K. Iha, Diamond Relat. Mater. 5 (1996) 1323.
- [12] A. R. Lang, Proc. Phys. Soc. 84 (1964) 871.
- [13] N. Sumida, and A. R. Lang, Proc. R. Soc. London, Ser. A 419 (1988) 235.
- [14] P. R. Bridon and R. Jones, Physica B 185 (1993) 179.
- [15] Vitor Baranauskas, A. C. Peterlevitz, Jing Guo Zhao and S. F. Durrant, J. Vac. Sci. Tech. A 19(4) (2001) 1052-1056.

## **Capítulo IV**

### **Caracterização de Amostras de Osso**

#### **1. Introdução**

Os estudos morfológicos do processo de remodelamento do osso natural, especialmente após a lesão do osso, são de importância relevante para o entendimento dos processos da regeneração, que envolvem a ação dos osteoblastos (células formadoras dos ossos) e dos osteoclastos (células absorvedoras) na síntese do tecido ósseo. Estes processos são altamente complexos, estando relacionados com os mecanismos reguladores hormonais e de sinalização, ainda não bem compreendidos, mas que podem acelerar ou mesmo interromper completamente a regeneração óssea [1-4]. Vários estudos estão sendo desenvolvidos para se promover o recrescimento ósseo empregando-se implantes [5], tratamento hormonal [6], terapia genética [7], e irradiação com laser [8]. Assim sendo, é importante que haja um modelo microscópico da morfologia dos processos regenerativos do osso natural para que se possa ter uma avaliação dos processos terapêuticos, bem como para se ter uma melhor compreensão dos mecanismos naturais de recuperação do osso. Neste Capítulo apresentamos um estudo para avaliação da regeneração de lesão óssea localizada por Microscopia de Força Atômica, complementando o trabalho de Microscopia Eletrônica de Varredura, realizado por I. Garavello em sua tese de doutorado [9].

#### **2. Procedimento experimental**

Os detalhes experimentais de manipulação dos animais, cirurgia, sacrifício e preparação das amostras são descritos na literatura [9]. Para as análises por MFA, as tíbias lesadas tiveram a porção cortical não afetada do osso removida com uma lâmina de barbear, para descarte. A parte restante, contendo a região óssea em processo de neoformação foi, então, fixa sobre uma

lâmina metálica. A fim de possibilitar uma análise comparativa, as medidas foram efetuadas tanto sobre regiões de tecido intacto como sobre tecido em processo de regeneração. A morfologia da superfície foi analisada por microscopia de força atômica utilizando-se o Nanoscope II AFM no modo contato.

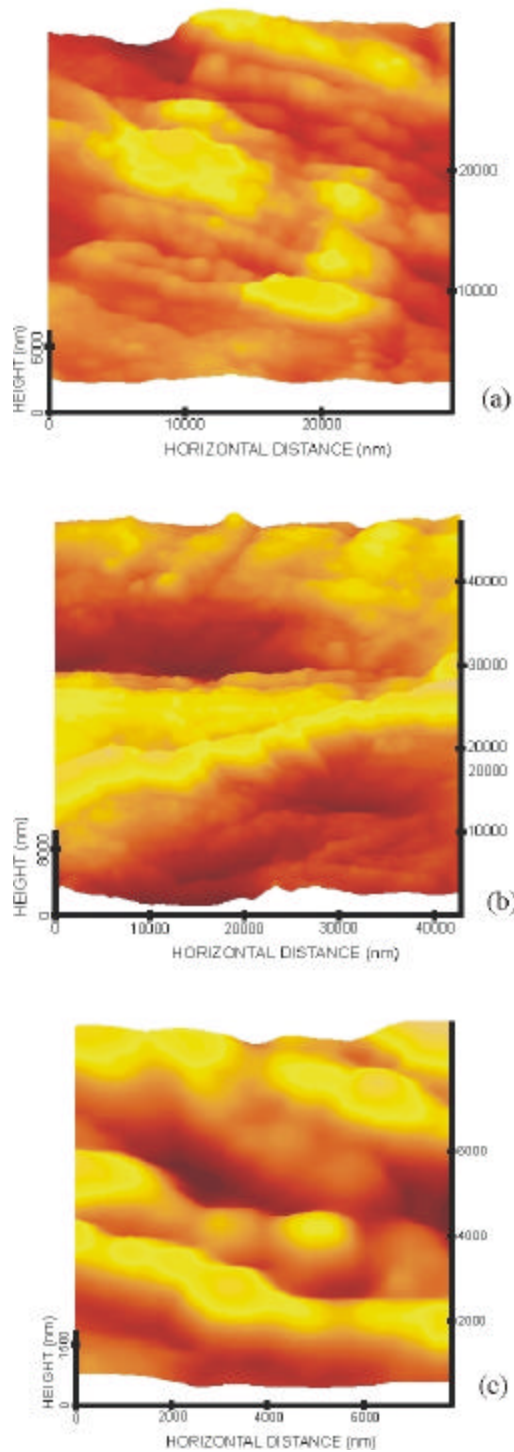
### 3. Resultados e discussão

A lesão foi realizada com uma broca de aproximadamente 1,6 mm de diâmetro, em apenas uma das faces da tíbia, para se preservar as células da medula óssea, responsáveis pelos osteoblastos que o osso produz [10]. A rugosidade das amostras é muito elevada, o que torna muito difícil o ajuste da ponta de prova, visto que na varredura lateral a ponta pode chocar-se com as partes mais salientes da amostra e com isto romper a viga em “V”, danificando completamente a ponta de prova.

A Figura 4-1 (a, b, c) mostra imagens de MFA típicas do tecido ósseo intacto, em diferentes ampliações. Pode se observar, em todas as figuras, a organização quase paralela do feixe do colágeno e os detalhes das bandas de colágeno periódicas existentes ao longo do eixo longitudinal das fibras. Estes efeitos são decorrentes da combinação cruzada de moléculas de tropo-colágeno, que são as constituintes das fibras de colágeno do tipo I da matriz óssea.

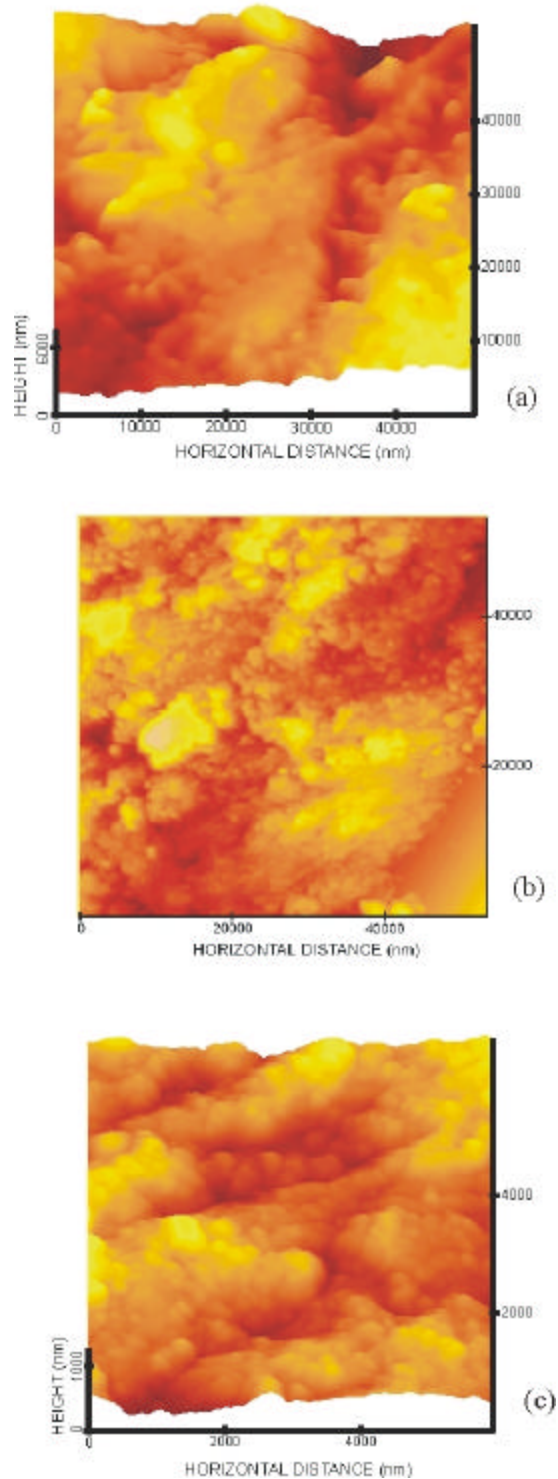
Figura 4-2 (a, b, c) mostra imagens de MFA típicas de tecido ósseo em regeneração, 8 dias após a lesão. Os processos de recuperação óssea apresentaram, aparentemente, uma evolução, mas a organização matricial do osso maduro não foi alcançada neste estágio. O processo regenerativo pode ser melhor observado na imagem ampliada do tecido apresentado na Figura 4-2 (c), onde podem ser observadas fibras de colágeno com orientação bem definida.

A Figura 4-3 (a, b, c) mostra imagens típicas de MFA obtidas do tecido ósseo em regeneração, 15 dias após a lesão. Observa-se grandes linhas de fibras de colágeno na superfície superior do tecido cortical, indicando que remodelação do osso natural do animal está alcançando uma estrutura próxima à do tecido ósseo intacto. A Figura 4-3 (b) mostra uma imagem tridimensional de MFA tomada na borda lateral das fibras, mostrando sua orientação.

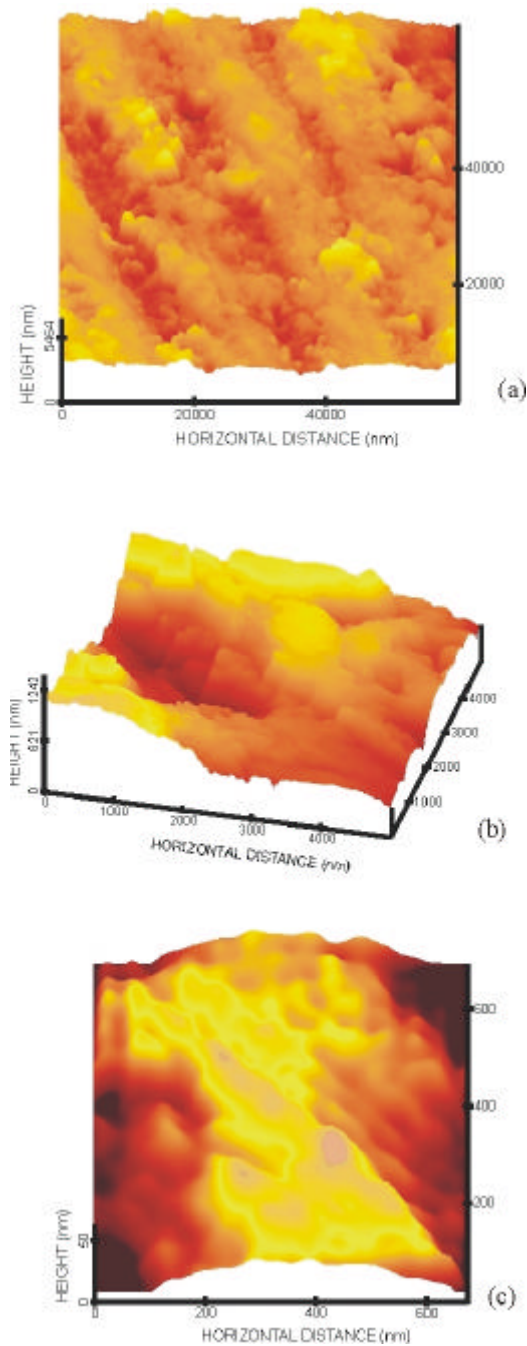


**Figura 4-1.** *Imagens típicas de MFA com diferentes ampliações do tecido ósseo intacto, mostrando a morfologia de tridimensional de sua superfície. Observa-se a organização paralela dos feixes de colágeno em (a, b) e os detalhes das bandas periódicas do colágeno em (c).*

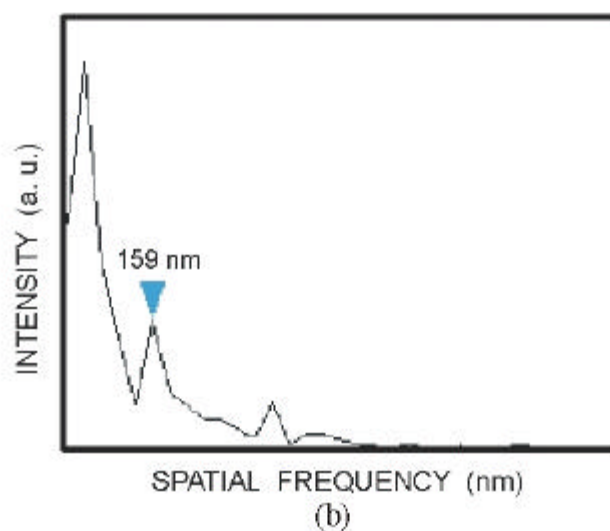
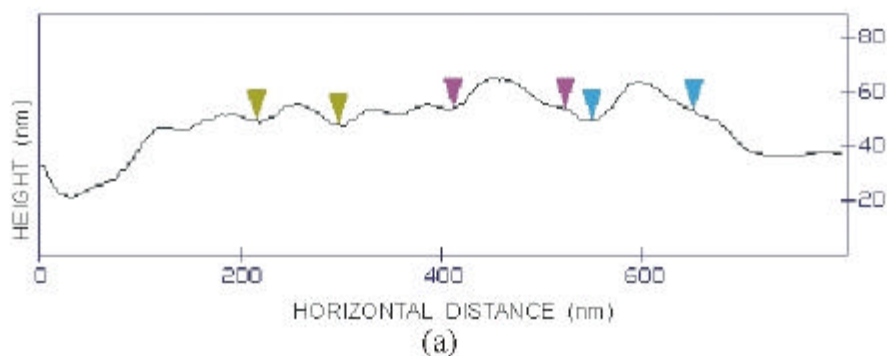




**Figura 4-2.** *Imagens de MFA da superfície do osso primário em processo de regeneração, oito dias após a lesão. Neste estágio ainda não se alcançou a organização da matriz óssea normal (a, b). Em (c), porém, a regeneração do tecido já está em grau avançado, tomando-se como diagnóstico a presença de colágeno orientado.*



**Figura 4-3.** *Imagens de MFA, quinze dias após a lesão. Observa-se em (a) que as fibras de colágeno da matriz óssea estão melhor orientadas. (a) Observam-se os feixes de colágeno nas imagens com maior ampliação. Em (b ,c) observam-se detalhes em tridimensionais da orientação das fibras. (b) mostra a borda dos feixes entre os feixes e (c) mostra uma imagem com alta ampliação dos feixes paralelos das fibras de colágeno maduro.*



**Figura 4-4.** (a) Secção de corte mostrando o arranjo paralelo das fibras de colágeno. (b) A transformada de Fourier bidimensional mostrando que o diâmetro estatístico das fibras é de 159 nm, em boa concordância com valores da literatura (124 a 170 nm).

Maior ampliação desta estrutura (ver Figura 4-3 (c)) mostra que as fibras do colágeno exibem boa orientação, próxima à dos feixes das fibras de colágeno maduro. O perfil de altura característico da secção de corte destas fibras é apresentado na Figura 4-4 (a), e sua análise do domínio Fourier bidimensional está mostrada na Figura 4-4 (b). Estes resultados mostram que o diâmetro estatístico das fibras é de 159 nm, o que representa boa concordância com valores encontrados na literatura para fibras de colágeno do tipo I [11]. O colágeno é o principal componente protéico na matriz extracelular do tecido ósseo e o monitoramento de sua

organização possibilita uma boa visão quanto à (neo) formação óssea, sob condições naturais ou terapêuticas.

Este estudo revelou que a MFA pode ser um instrumento adicional útil para se estudar mudanças estruturais na organização do colágeno, como as que ocorrem sob condições fisiológicas (crescimento ou envelhecimento), condições patológicas (trauma, doenças) ou sob agentes externos, perigosos ou benéficos, e que influenciam o processo de remodelamento ósseo.

#### **4. Conclusões**

Utilizando a microscopia de força atômica comparamos o modelo da reorganização do tecido ósseo lesado, 8 e 15 dias após a lesão cirúrgica, com a organização da matriz de tecido ósseo intacto. Observamos que 15 dias após a lesão as fibras do colágeno adquiriram estrutura do tipo maduro e ficaram dispostas em sua matriz óssea, em feixes paralelos característicos. Neste estágio de recuperação foram observadas estruturas laminares, mas não foi possível observar as bandas periódicas de colágeno geralmente presente em fibras mais velhas.

#### **5. Referências**

- [1] S.C. Manolagas, Aging-Clinical Exp. Res., 10 (3) (1998) 182.
- [2] G.A.Rodan, and T.J. Martin, Science, 289 (5484) 2000 1508.
- [3] I.A. Silver, R.J. Murrills, and D.J. Etherington, Exp. Cell Res., 175 (1998) 266.
- [4] G.A. Rodan, Bone, 20 (1997) 1.
- [5] B.M..Sandmaier, R.Sorb, J.Kniley, W.Hardy, M.Black, A. Moseley, and R. Deans, Blood 92 (10) (1998) 473.
- [6] K.Michaelsson, J.A. Baron, B.Y.Farahmand, O.Johenll, C. Magnusson, P.G. Persson, I. Persson and S.Ljunghall, British Med. J., 316 (7148) (1998) 1858.
- [7] J. Bonadio, E. Smiley, P. Patil, and S. Goldstein, Nature Med. 5 (1999) 753.

- [8] I.G.F. Freitas, V. Baranauskas, and M.A. Cruz-Hofling, Appl. Surf. Sci., 154 – 155 (2000) 548.
- [9] I.G.F. Freitas, Ação do laser de HeNe na osteogênese, Tese de Doutorado, FEEC/UNICAMP, 2001
- [10] P. Ducey, T. Schinke, and G. Karsenty, Science, 289 (5484) (2000) 1501.
- [11] V. Baranauskas, B.C. Vidal, and N.A. Parizotto, Appl. Biochem. Biotech. 69 (1998) 91.

## **Capítulo V**

### **Considerações Finais**

Demonstramos que é possível utilizar a MFA para quantificar a morfologia e a rugosidade superficial no diamante nitrogenado. Devemos agora estudar melhor as propriedades eletrônicas deste material, assim como aprimorar nossas análises de MFA para que possamos determinar possíveis campos de aplicação deste material na indústria de componentes eletrônicos, ou outras. Em relação as análises de MFA em osso, demonstramos que é possível utilizar a MFA como uma ferramenta adicional de diagnóstico, complementando outras técnicas de diagnóstico como por exemplo, a microscopia de varredura, a microscopia óptica, as técnicas de magneto-ressonância e de raios X. Consideramos importante que além do acompanhamento de lesões com regeneração natural, também seja realizado o acompanhamento de lesões seguidas de procedimentos terapêuticos para aceleração da regeneração. Em particular, já trabalhamos neste sentido, analisando amostras de tecido ósseo lesado e regenerado com ou sem a ação de lasers.

Nosso grupo de trabalho, em cooperação com a Faculdade de Ciências Médicas e com o Instituto de Biologia, começou a obter os primeiros resultados da aplicação de diamante como material para próteses ósseas. Observou-se nos primeiros grupos de animais que a osteo-integração do diamante depende fortemente de sua micro-rugosidade superficial. Em trabalhos futuros pretendemos utilizar a MFA como ferramenta complementar para analisar o crescimento ósseo no diamante, em função de sua composição química e morfologia nanométrica.

Enfim, os resultados mostram que existem enormes campos para serem explorados. Gostaria que nosso humilde trabalho possa servir de estímulo para que outros jovens pesquisadores dediquem-se a esta área. Agradeço também aqui os vários professores, pesquisadores e estudantes que me auxiliaram neste trabalho e neste País.

## **Apêndice I**

### **Trabalhos Publicados**

1- Photoluminescent properties of porous carbon films pyrolysed on silicon, V.Baranauskas, M. C. Tosin, Helder J. Ceragioli, Jing Guo Zhao, A. C. Peterlevitz, S. F. Durrant, *Physica Status Solidi (A)*, 182 (2000), 395.

2 - Fabrication of smooth diamond films on SiO<sub>2</sub> by the addition of nitrogen to the gas feed in hot-filament CVD, V.Baranauskas, A. C. Peterlevitz, Jing Guo Zhao and S. F. Durrant, *J. Vac. Sci. Tech. A*, 19(4) (2001) 1052-1056.

3. Observation of the Bone Matrix Structure of Intact and Regenerative Zones of Tibias by Atomic Force Microscopy, V. Baranauskas, I. Garavello-Freitas, Z. Jingguo and M. A. Cruz-Höfling, *J. Vac. Sci. Tech. A*, 19(4) (2001) 1042-1045.

4. Characterization of the crotalus durissus terrificus venom by atomic force microscopy, V. Baranauskas, D. M. Dourado, Zhao Jingguo and M. A. Cruz-Höfling, *J. Vac. Sci. Tech. B* 20 (4) (2002) 1317-1320.

5. Analysis of nano-crystalline coatings of tin oxides on glass by atomic force microscopy, V. Baranauskas, Z. Jingguo, A. P. Mammana, T. E. A. Santos, M. A. Schreiner and C. I. Z. Mammana, *Sensors and Actuators B*, 85 (1-2) (2002) 90-94.

6. SEM and AFM studies of rat injured tibiae after HeNe radiation, M. A. Cruz-Höfling, I. Garavello-Freitas, Z. Jingguo and V. Baranauskas, *Lasers Med Sci.*, 17(4) (2002) A36.