

ESTUDIO DE LA ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE SUPERFICIES DE ACIDO POLILÁCTICO MEDIANTE TÉCNICAS GRAVIMÉTRICAS Y ELECTROQUÍMICAS

ADSORPTION STUDY OF PROTEINS ON SURFACES OF POLY-LACTIC ACID BY USING ELECTROCHEMICAL AND MICROGRAVIMETRIC TECHNIQUES

HUGO ARMANDO ESTUPIÑAN DURAN

D.r., Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, haestupinand@unal.edu.co

DARIO YESID PEÑA BALLESTEROS

Ph.,D, Universidad Industrial de Santander, dypena@uis.edu.co

DIONISIO ANTONIO LAVERDE CATAÑO

Dr., Universidad Industrial de Santander, dlaverde@uis.edu.co

PATRICIA ESCOBAR RIVERO

Dra., Universidad Industrial de Santander, , pescobar@yahoo.co.uk

CUSTODIO VÁSQUEZ QUINTERO

MSc, Universidad Industrial de Santander, custodio@uis.edu.co

YURLEY KARINA ANAYA

Ing. Química, Universidad Industrial de Santander, karina.anaya.jaimes@gmail.com

LEIDY MARCELA GELVES JEREZ

Ingeniera Química, Universidad Industrial de Santander, marcegelvez@hotmail.com

Recibido para revisar Enero 18 de 2011, aceptado Agosto 19 de 2011, versión final Agosto 24 de 2011

RESUMEN: Métodos electroquímicos fueron utilizados para promover y evaluar la adsorción orientada de albúmina y colágeno sobre superficies poliméricas de ácido poliláctico (PLA) mediante la aplicación de un sobrepotencial anódico en un rango de 0 V a 0,45 V. La adsorción fue estudiada usando mediciones simultáneas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE) y microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), en un rango de temperaturas de 25°C a 45°C, con variaciones en proteína entre 5 y 20 µg/ml en solución buffer de fosfato de pH 7,4. Con el aumento de la concentración de proteínas en el electrolito, disminuye la resistencia a la transferencia de carga, exhibiendo así una mayor adsorción sobre la superficie, además de aumentar la magnitud de los cambios de masa. Se mejoró la hidrofiliidad del recubrimiento, mostrando una mayor afinidad con las soluciones de colágeno y por lo tanto un aumento en la biocompatibilidad debido a la activación superficial.

PALABRAS CLAVE: Adsorción, albúmina sérica bovina, colágeno, polímeros biodegradables, gravimétrica, electroquímica.

ABSTRACT: Electrochemical methods were used to promote and evaluate the oriented adsorption of albumin and collagen on polymer surfaces of polylactic acid by applying an anodic overpotential in the range of 0 V to 0.45 V. The adsorption was studied using simultaneous measurements of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and quartz crystal microbalance (QCM) in a temperature range of 25°C to 45°C, and protein variations between 5 and 20 mg/ml phosphate buffer solution of pH 7,4. Increasing protein concentration in the electrolyte reduces resistance to charge transfer associated with the interaction between protein and electrode, thus showing a greater adsorption on the surface, confirmed by the increased mass measured by QCM. With the electrochemical polarization, the hydrophilicity of PLA coating was improved, showing a higher affinity and adsorption capacity with collagen-rich solutions.

KEYWORDS: Adsorption, bovine serum albumin, collagen, polymers biodegradables, gravimetric, electrochemical.

1. INTRODUCCIÓN

La adsorción de proteínas juega un papel fundamental en la producción de implantes biocompatibles. La biocompatibilidad de los materiales depende en gran medida de las interacciones que ocurren entre la superficie y el ambiente biológico. Se sabe que el contacto de un cuerpo vivo con un material induce la adsorción de proteínas en su superficie, creando una interfase, en la que otras proteínas y células se adsorben [1]. Las propiedades de la monocapa adsorbida de proteína son de vital importancia en la integración del implante en el cuerpo. Dependiendo de la complejidad del tejido al que se va a implantar, se requieren ciertas características, un ejemplo claro son los huesos y los dientes, los cuales necesitan de una excelente adhesión orientada, de proteínas que permita el crecimiento, formación y estabilización del conjunto implante-hueso.

Cuando la proteína está en contacto con una superficie sólida, ésta esta última sufre ciertas modificaciones causadas por la adsorción que se lleva a cabo en dicha superficie [2]. Por otro lado, las propiedades de la superficie influyen en la adsorción de proteínas, siguiendo ciertas tendencias generales: i. La afinidad de la superficie es determinada por la hidrofiliidad [3,4]; ii. La disminución de la estabilidad de la proteína, aumenta la afinidad de la adsorción en la mayoría de las superficies [4,5]; iii. Las proteínas con cargas eléctricas opuestas a las de la superficie, se adsorben con mayor afinidad [6,7]; iv. Además la afinidad en la adsorción, depende de la ubicación de la carga superficial [8]; v. El tamaño y la forma de la proteína pueden desempeñar un papel importante en la adsorción, ya que el número de sitios de unión por proteína adsorbida se incrementan.

El colágeno es una proteína de la matriz extracelular, cuya estructura es la más grande del reino animal. La molécula de colágeno tipo I (largo ~ 30nm, diámetro ~ 1.5nm) es una hélice formada por tres polipéptidos. Las partes no helicoidales son llamadas telopéptidos, y se encuentran al final de cada molécula. El colágeno puede agregarse en forma de fibrillas, *in situ* e *in vitro*. Además contiene secuencias de aminoácidos, los cuales pueden ser reconocidos por células receptoras [9]. De esta manera debido a su forma, tamaño y su propiedad de autoadherencia, el colágeno ofrece perspectivas promisorias para crear una capa de adsorbato, con un direccionamiento deseado.

La albúmina es una proteína abundante que desempeña un papel importante en el transporte de compuestos de bajo peso molecular por la sangre [10]. Ésta proteína globular de forma de esferoide con dimensiones 4nm*4nm*14nm [11], posee una gran adaptabilidad debido a que es una “proteína suave” y representa un 52-62% en el plasma de la sangre [12]. Su principal función fisiológica es mantener la presión osmótica y el pH de la sangre y transportar una gran cantidad de componentes endógenos y exógenos, incluyendo ácidos grasos, metales, aminoácidos, esteroides y fármacos [13].

Como respuesta a los requerimientos direccionales de las proteínas para la formación de tejidos, se han implementado numerosas técnicas. Usando flujo, como la extrusión mecánica, canales microfluidilizados y por anisotropía química. Sin embargo, éstas han presentado inconvenientes en la densidad de formación, la elasticidad, y el tamaño final [14-19]. Por otro lado también se han orientado las fibras de proteína, utilizando campos magnéticos, los cuales requieren imanes superconductores, ya que el colágeno posee un valor bajo en la constante diamagnética [20]. La orientación por inmersión en soluciones concentradas y por *electrospinning* [21], son técnicas que pueden tardar de semanas a meses y además tienen una limitación muy importante, la utilización de solventes tóxicos y corrosivos [22]. Debido a estos problemas se ha presentado un enfoque alternativo, la manipulación electroquímica la cual puede disminuir el tiempo de proceso a minutos u horas, utilizando como variables claves, el voltaje y la corriente, con electrodos ubicados de manera paralela dentro de una solución de colágeno en una celda electroquímica, en donde al aplicarse un voltaje determinado se producirá el direccionamiento de la proteína [23].

En los últimos años se han desarrollado una serie de técnicas de activación superficial, para el desarrollo de dispositivos biomédicos que permiten la obtención de biomateriales sofisticados. Estas técnicas van desde la fotolitografía, ablación por láser, manchado, litografía por haz de electrones, nanolitografía de inmersión, hasta la activación por fuerzas magnéticas [24]. La fotolitografía implica la irradiación de una superficie con un haz de alta energía, por lo general de luz ultravioleta. La alteración superficial puede causar fotodisociación, rotura de enlaces químicos, el

inicio de polimerización [25-27], produciéndose de esta forma superficies activas superficialmente en dos o tres dimensiones [28].

Utilizando dos técnicas como la técnica electroquímica denominada EIE (Espectroscopía de Impedancia Electroquímica) y la microbalanza de cuarzo *QCM* (*Quartz Crystal Microbalance*) se puede evaluar la adsorción direccionada de proteínas en la superficie. La EIE es una herramienta eficaz para estudiar los procesos de electrodos, utilizando una perturbación de carácter eléctrico, que superpone una señal de potencial sinusoidal de amplitud pequeña. Este método permite la medición de la capacitancia de la doble capa, de la interfase electrodo/solución, para generar modelos en forma de circuitos equivalentes que permiten obtener información de la película modificada en la superficie del electrodo [29-30]. La microbalanza de cuarzo *QCM* es una potente técnica para seguir la cinética de adsorción de diferentes sistemas, como los átomos, moléculas, proteínas o incluso de células vivas [37-38]. El fenómeno físico del sensor se basa en el efecto piezoeléctrico. En el cristal de cuarzo se produce una onda acústica que interacciona con el medio en contacto con el cristal. El tipo de interacción es generalmente caracterizada a través de desplazamientos de fase y amplitud (dependiente de la frecuencia). Siendo dichos desplazamientos función de la composición y propiedades del medio en contacto. La onda acústica se propaga en una pequeña distancia en el medio en contacto, de esta forma la respuesta está determinada predominantemente por las propiedades interfaciales.

En este trabajo se estudió la adsorción orientada electroquímicamente de colágeno y BSA, en superficies de PLA, activadas por irradiación con luz UV, haciendo un monitoreo en tiempo real de la adsorción mediante técnicas electroquímicas y microgravimétricas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

El PLA fue sintetizado por policondensación del Ácido L-láctico con Zn como catalizador. Este polímero fue disuelto en acetona a 15% p/v para realizar las electrodeposiciones. La solución salina amortiguada por fosfatos (PBS, pH 7,4) utilizada para la dilución de la proteína se preparó a partir de NaCl, Na₂HPO₄·2H₂O),

KCl, K₂HPO₄ y tamponado a un pH de 7,4. La albúmina bovina (BSA) 98% para electroforesis (Sigma A7906). El colágeno fue utilizado como polvo liofilizado (RSAD08I25201).

2.2 Obtención de PLA sobre cristal de cuarzo Au/Cr

Para realizar el recubrimiento de los cristales de cuarzo con la solución de PLA en acetona al 15% p/v, se utilizó una fuente de poder para aplicar un voltaje de 3 Voltios, donde el cátodo fue conectado con el cristal de cuarzo de Au-Cr y el ánodo fue conectado a una lámina de acero, durante un tiempo de 5 minutos a condiciones estándar de presión y temperatura. Posteriormente se irradió, un área preferencial con espesor de 1mm y longitud 1in con luz UV ubicada en el centro del cristal durante 20 minutos.

2.3 QCM y mediciones electroquímicas de adsorción.

Se prepararon soluciones de proteínas en PBS a 5, 12.5 y 20 µg/ml. Para las mediciones electroquímicas y de la QCM simultáneas se utilizó una celda plana horizontal, en donde el electrodo de trabajo era el cristal recubierto, contra-electrodo de grafito, un electrodo de referencia Ag-AgCl. Las mediciones electroquímicas se realizaron usando un potenciostato GAMRY y las mediciones de la QCM se realizaron con una microbalanza QCM200. Las mediciones de espectroscopía de impedancia fueron desarrolladas en un rango de frecuencia de 0.01 a 100000 Hz a un voltaje natural de 0V y 0.15, 0.30 y 0.45 V de polarización y 10mV de potencial respecto al electrodo de referencia. La calibración de la QCM se realizó previa la adición de la solución de trabajo.

2.4 Análisis de resultados

De las pruebas electroquímicas se obtuvieron los parámetros eléctricos del modelo de circuito equivalente usando el software Zview, con la resistencia a la transferencia de carga se calculó la masa adsorbida en la superficie. Estos datos se contrastaron con los proporcionados por microbalanza de masa adsorbida. Se realizaron gráficas de concentración de proteína contra masa adsorbida para obtener los parámetros de adsorción en el equilibrio y gráficas de cambio de energía libre de Gibbs contra temperatura para obtener parámetros termodinámicos de adsorción. Se analizó la morfología de los recubrimientos antes y después

del proceso de adsorción de las proteínas, mostrando la adsorción sobre el recubrimiento de PLA más direccionada, con el colágeno, respecto a la adsorción de la proteína BSA en las áreas superficialmente activadas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Adsorción de BSA y colágeno sobre PLA por la técnica electroquímica de EIE

La figura 1, muestra el espectro para la adsorción, obtenida de solución para BSA de 20 µg/ml a 45°C, similares espectros fueron obtenidos con las soluciones restantes. La presentación de los datos en forma de diagrama de Bode, revela claramente la presencia de dos constantes de tiempo (cambios de pendiente), una a alta y otra a baja frecuencias, la última evidencia la formación de una doble capa electroquímica. Por lo tanto, se puede representar el fenómeno con un circuito eléctrico equivalente similar al de un material con recubrimiento poroso, como se muestra en la figura 1 b.

En este circuito los elementos eléctricos corresponden a: R_s es la resistencia del electrolito (PBS + proteína) entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, R_1 es la resistencia de los procesos Faradaicos y al igual que la capacitancia representada como un elemento de fase constante a altas frecuencias CPE_1 , $R_2 = R_{ct}$ es la resistencia a la transferencia de carga y CPE_2 es la capacitancia de la doble capa eléctrica en la interface polímero-solución de proteínas, que se evidencia a bajas frecuencias.

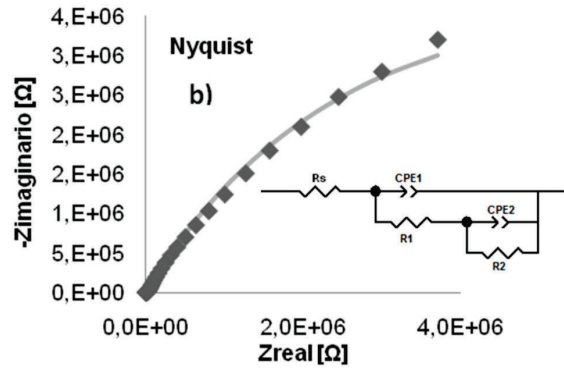
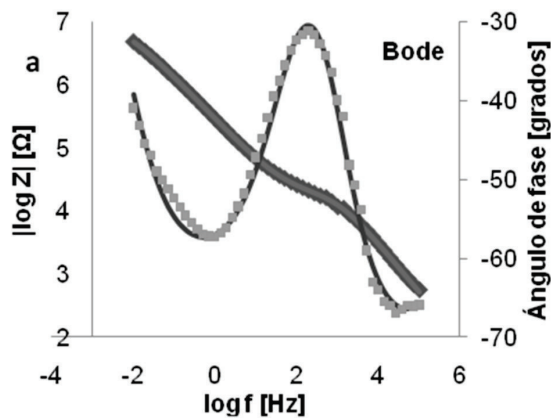


Figura 1. Espectro para la adsorción de solución para BSA de 20 µg/ml a 45°C, a) Diagrama de Bode y b) Diagrama de Nyquist.

Se empleó un elemento de fase constante CPE dependiente de la frecuencia por una capacitancia pura (C). El uso de CPE es necesario debido a una distribución de los tiempos de relajación como consecuencia de las heterogeneidades presentes en el nivel microscópico de la interfaz. R_{ct} se define como una intersección de una curva extrapolada EIE en un diagrama de Nyquist con el eje real. La resistencia a la transferencia de carga, puede ser utilizada como una medida de la velocidad de reacción y de la cantidad de proteína adsorbida en la superficie. El inverso de la resistencia a la transferencia de carga R_{ct}^{-1} , es directamente proporcional a la cantidad de proteína adsorbida, Γ (molcm⁻²) y a la densidad de carga superficial, Q_{ADS} (Ccm⁻²), como se muestra en la ecuación 1.

$$\Gamma = \frac{Q_{ADS}}{nF} \quad (1)$$

F es la constante de Faraday y n es el número de electrones transferidos. Se asume n=1 para los cálculos con las dos proteínas.

$$\frac{c}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_{m\acute{a}x}} + \frac{c}{\Gamma_{m\acute{a}x} B_{ADS}} \quad (2)$$

La ecuación de Langmuir (ecuación 2) expresa la relación entre la concentración de la proteína, y la cantidad de material adsorbido en la superficie, con esta ecuación se puede encontrar el parámetro de adsorción llamado B_{ADS} coeficiente de adsorción y $\Gamma_{m\acute{a}x}$ que representa la máxima cantidad de material que se puede adsorber en la superficie. El B_{ADS} se relaciona con la

afinidad de la proteína a ser adsorbida en la superficie del electrodo a una temperatura, por lo tanto, se puede obtener la energía libre de adsorción, utilizando la ecuación 3 [32-34].

$$\Delta G = -RT \ln(55.5 B_{ADS}) \quad (3)$$

Los resultados obtenidos mostraron que la adsorción de proteínas (BSA y Colágeno) es espontánea a las diferentes temperaturas, es decir, la energía libre de Gibbs disminuye como tal, los eventos naturales y espontáneos tienden a llevar los cuerpos a su menor estado energético, los datos calculados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Cálculos termodinámicos a partir de datos electroquímicos

T [K]	Proteína	0v	0.15V	0.3V	0.45V	QCM
		-ΔG* [J/mol]	-ΔG [J/mol]	-ΔG [J/mol]	-ΔG [J/mol]	-ΔG [J/mol]
298,15	BSA	26527.90	26819.86	26527.90	20534.59	57126.58
	COL	20750.92	19304.54	18639.81	19537.11	75917.77
310,15	BSA	26853.78	27899.31	27899.31	21687.66	67673.88
	COL	27157.50	26111.97	20574.19	26853.78	79548.71
318,15	BSA	28028.71	28618.94	28028.71	28618.94	104129.4
	COL	28028.71	27546.45	21294.55	22495.77	97448.61
298,15	BSASIN UV	26266.72	26266.72	26266.72	27271.80	54353.24
	COLSIN UV	25814.78	20161.42	21139.33	20870.34	71476.32

* ΔG: diferencia del cambio de energía libre de Gibbs: energía final menos energía inicial.

Resultado que concuerda con otros estudios termodinámicos de adsorción de proteínas [31-32]. En la tabla 1 también se observa la influencia de la irradiación con luz UV, como una activación superficial, donde la energía de Gibbs presentó un valor superior a una misma temperatura.

3.2 Resultados de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)

La figura 2 muestra la adsorción a partir de una solución de 20ug/ml BSA a 37°C en el cambio de frecuencia vs tiempo, obtenida por QCM. Similares curvas fueron obtenidas para todas las concentraciones y con el colágeno, mostrando una disminución de la frecuencia a concentraciones más bajas. A partir de estas curvas, se calculó la cantidad de proteína adsorbida en la superficie del PLA usando la ecuación de Sauerbrey (ecuación 4).

$$\Delta F = \frac{-2F_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}} \Delta m \quad (4)$$

En solución acuosa, la ecuación de Sauerbrey no es usada por los efectos de viscosidad, densidad y conductividad [34-36]. Sin embargo, describe muy bien el comportamiento cuando los cambios viscoelásticos del material son despreciables, lo cual es válido en

este caso de estudio, debido a los bajos tiempos de exposición con el medio acuoso, asumidos, porque el polímero presenta una degradación que incide en el cambio de sus propiedades.

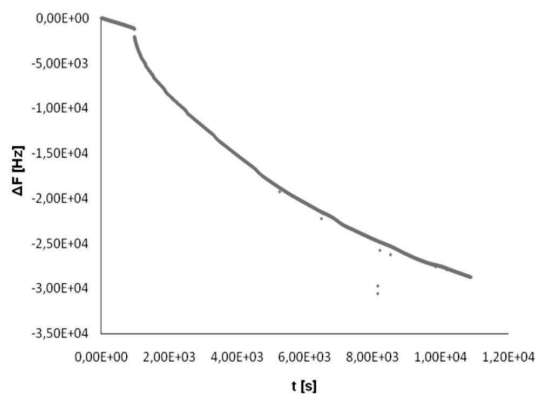


Figura 2. Espectro de cambio de frecuencia con respecto al tiempo para BSA a 37°C y 20μg/ml.

Se observó una relación lineal entre el cambio de masa y frecuencia de la QCM en aire y en solución acuosa. Con base en los cambios de frecuencia en el estado de equilibrio de adsorción, se calculó la cantidad de proteína adsorbida en el recubrimiento de PLA Δm [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]. Los datos de la QCM obtenidos simultáneamente con los electroquímicos, pueden ser relacionados usando la isoterma de adsorción de Langmuir (ecuación

5). En donde el cambio específico de masa Δm [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] se sustituye por Γ , que representa la cantidad de proteína adsorbida por unidad de área.

$$\frac{C}{|\Delta m|} = \frac{1}{|\Delta m_{\text{máx}}|} + \frac{C}{|\Delta m_{\text{máx}}| B_{\text{ADS}}} \quad (5)$$

A partir de la relación lineal graficada, se obtuvieron los valores de B_{ADS} y $|\Delta m_{\text{máx}}|$ de la pendiente y del corte con el eje de las ordenadas de la gráfica correspondiente. Por último se realizaron los cálculos del cambio de entropía y de entalpía como la pendiente y el punto de corte de gráfica $\Delta G \text{ vs } T$, respectivamente (tabla 2).

QCM	ΔS	878.9	302.5
	ΔH	20493	14296
0.45V	ΔS	404.2	147.9
	ΔH	99983	24569
0.3V	ΔS	78.13	134.9
	ΔH	-3354	21516
0.15V	ΔS	89.95	424.3
	ΔH	-2E-9	10672
0V	ΔS	71.3	377.3
	ΔH	-5.130	9.1207
	Proteína	BSA	COL

Tabla 2. Datos calculados a partir de la curva de cambio de energía libre de Gibbs contra la temperatura.

$\Gamma\Delta H$: diferencia del cambio de entalpía (J/mol): energía final menos energía inicial.

ΔS : diferencia del cambio de entropía (J/mol $^{\circ}\text{K}$): entropía final menos entropía inicial.

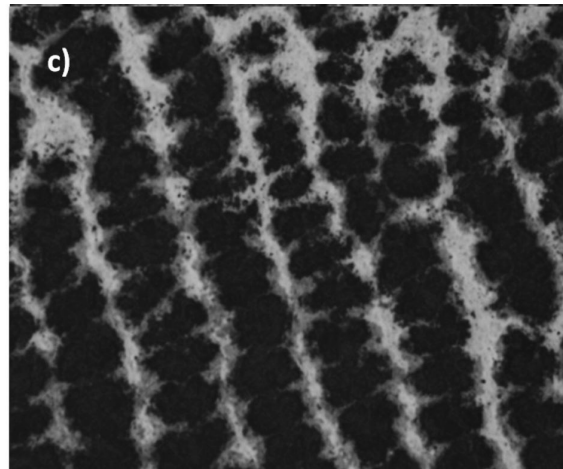
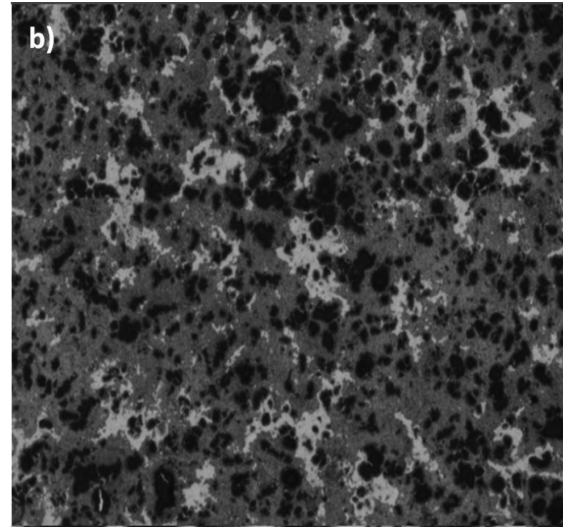
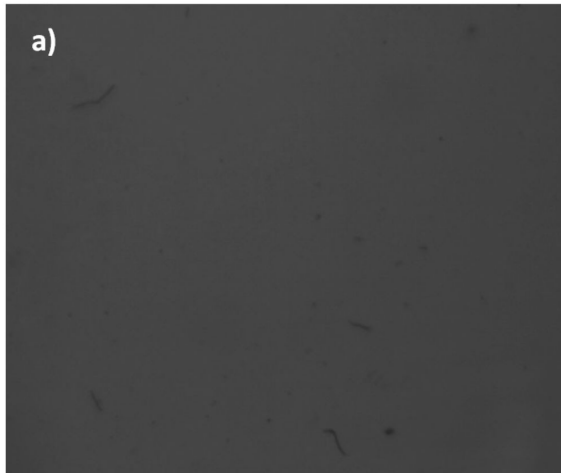


Figura 3. Micrografías de la superficie a 10X a) cristal recubierto con PLA, b) cristal con BSA adsorbida de una solución de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en recubrimiento polimérico y c) cristal con Colágeno adsorbido de una solución de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en recubrimiento polimérico.

3.1 Discusión final

Las propiedades termodinámicas de adsorción a partir de las mediciones de EIE y de QCM fueron comparadas. Un aumento en el ΔG corrobora la hipótesis planteada de la activación en el PLA al ser irradiado con luz ultravioleta a una misma temperatura.

Los valores obtenidos de entalpía y entropía concuerdan con la literatura, mostrando un proceso endotérmico, resultado de las siguientes contribuciones: cambios en el estado de hidratación de la superficie, asociación/disociación de protones de grupos cargados en la superficie, a la superposición de campos eléctricos,

debidos a los voltajes aplicados, a la incorporación de otros iones diferentes a protones en la superficie adsorbida y finalmente a la reacomodación de la moléculas de la proteína, dando como resultado un proceso de adsorción espontáneo. Sharon G. Roscoe y colaboradores encontraron que la entalpía de adsorción es debida a algunos aspectos del proceso, como desplazamiento del solvente en la superficie del electrodo y a los cambios en la tensión superficial por el estado de hidratación de las proteínas en adición a sus cambios estructurales. Los grandes valores de la entropía se deben a la gran dispersión de proteína en la superficie, favoreciendo la adsorción [32,39-42].

Tal como se observa en la figura 3, la adsorción de proteína sobre la superficie polimérica de PLA se llevó a cabo mostrando una zona de mayor adsorción de proteína (parte superior figura 3.b), como resultado de la activación superficial.

4. CONCLUSIONES

Las mediciones simultaneas de espectroscopía de impedancia electroquímica y en microbalanza de cristal de cuarzo, permitió establecer que el proceso de adsorción fue descrito por la isoterma de Langmuir. A partir de las micrografías, se evidencia que el colágeno adsorbido tuvo un mayor direccionamiento sobre la superficie polimérica activada, debido probablemente a su forma helicoidal la cual permite una mejor acomodación e interacción que la BSA, que posee una forma esférica.

La tendencia observada de los valores de energía de Gibbs de adsorción, muestran que las moléculas de proteína con menor peso molecular (BSA) tienen mayor afinidad con la superficie.

La hidrofiliidad del PLA, en contacto con las soluciones que contienen colágeno, aumenta al activar la superficie de material con un sobrepotencial, o por irradiación con luz ultra violeta, debido al aumento en la energía libre de Gibbs, que es directamente proporcional a la tensión superficial, evidenciando una mejora en la hidrofiliidad y en la biocompatibilidad.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a Colciencias, proyecto 1102-403-20771 y a la VIE-UIS, proyecto 5433, por el financiamiento de esta investigación.

REFERENCIAS

- [1] Williams, D. F., *The Williams Dictionary of Biomaterials*, Liverpool University Press, 1999.
- [2] Brash, J. L. and Wojciechowski, P. W., *Interfacial Phenomena and Bioproducts*, JL Brash, PW Wojciechowski, eds, Marcel Dekker, 1996.
- [3] Andrade, J. D., Hlady, V., Wei, A. P., Ho, C. H., Lea, A. S., Jeon, S. I., Lin, Y. and Stroup, E., *Proteins at interfaces: principles, multivariate aspects, protein resistant surfaces, and direct imaging and manipulation of adsorbed proteins*, *Clinical Materials* 11, pp. 67–84, 1992.
- [4] Urry, D.W. and Luan, C. H., *Proteins at interfaces II*, Edition, No. 602 in ACS Symposium series, Washington DC, 1995.
- [5] Mcguire, J. and Wahlgren, M. C., Arnebrandt, T., *Structural stability effects on the adsorption and Dodecyltrimethylammonium Bromide-Mediated, elutability of bacteriophage T4 lysozyme at silica surfaces*, *Journal of Colloid and Interface Science* 179, pp. 182–192, 1995.
- [6] Norde, W., *Driving forces for protein adsorption at solid surfaces*, *Macromolecular Symposium* 103, pp. 5–81, 1996.
- [7] Blomberg, E. and Claesson, P. M., *Proteins at interfaces II*, TA Horbett and JL Brash Edition, No. 602 in ACS Symposium series, Washington DC, 1995.
- [8] Andrade, J. D. and Hlady, V., *In Advances in polymer science* 79, pp. 1–63, 1986.
- [9] Kadler, K., *Protein profile*, 1, 519, 1994 *Experimental Cell Research*, 182, 668, 1989.
- [10] Peters, JR. T., *All About Albumin: Biochemistry, Genetic and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, 1996.
- [11] McClellan, S.J. and Franses, E.I., *Effect of concentration and denaturation on adsorption and surface tension of bovine serum albumin*, *Colloids Surf.B: Biointerfaces* 28, pp. 63–75, 2003.
- [12] Brandes, N. and Welzel, P.B., Werner, C., Kroh, L.W., *Adsorption-induced conformational changes of proteins*

onto ceramic particles: differential scanning calorimetry and FTIR analysis, *J. Colloid Interface Sci.* 299, 56–69, 2006.

[13] Huang, B.X. and Kim, H.Y., Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrum.* 15, pp. 1237–1247, 2004.

[14] Denis, F.A, Pallandre, A, Nysten, B, Jonas, A.M. and Dupont-Gillain, C.C., Alignment and assembly of adsorbed collagen molecules induced by anisotropic chemical nanopatterns. *Small*, 1.984–91, 2005.

[15] Evans, H.J., Sweet, J.K., Price, R.L., YOST, M. and Goodwin, R.L., Novel 3D culture system for study of cardiac myocyte development. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 285:H570–8, 2003.

[16] Guo, C. and Kaufman, L.J., Flow and magnetic field induced collagen alignment, *Biomaterials*, 28:1105–14, 2007.

[17] Lee, P., Lin, R., Moon, J. and Lee, L.P., Microfluidic alignment of collagen fibers for in vitro cell culture. *Biomedical Microdevices*, 8, pp. 35–41, 2006.

[18] Silver, F.H., Christiansen, D.L., Snowhill, P.B. and Chen, Y., Role of storage on changes in the mechanical properties of tendon and self-assembled collagen fibers, *Connective Tissue Research*, 41:155–64, 2000.

[19] Silver, F.H., Freeman, J.W. and Seehra, G.P., Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *Journal of Biomechanics*, 36:1529–53, 2003.

[20] TORBET, J., RONZIERE, M.C., Magnetic alignment of collagen during self-assembly. *Biochemical Journal*, 219:1057–9, 1984.

[21] Mosser, G., Anglo, A., Helary, C., Bouligand, Y. and Giraud-Guille, M.M. Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions. *Matrix Biology*, 25: pp. 3–13, 2006.

[22] Matthews, J.A., Wnek, G.E., Simpson, D.G. and Bowlin, G.L. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 3:232–8, 2002.

[23] Xingguo, et al, Ozan Akkus. An electrochemical fabrication process for the assembly of anisotropically

oriented collagen bundles. *Biomaterials* 29, pp. 3278–3288, 2008.

[24] Hook, A.L., Voelcker, N.H. and Thissen, H. Patterned and switchable surfaces for biomolecular manipulation. *Acta Biomaterialia* 5:7, pp. 2350-2370, 2009.

[25] Falconnet, D, Koenig, A, Assi, T. and Textor, M., A combined photolithographic and molecular-assembly approach to produce functional micropatterns for applications in the biosciences. *Adv Funct Mater*, 14:749–56, 2004.

[26] Otsuka, H, Hirano, A, Nagasaki, Y, Okano, T, Horiike, Y. and Kataoka, K. Two-dimensional multiarray formation of hepatocyte spheroids on a microfabricated PEG-brush surface. *ChemBioChem*, 5:850–5, 2004.

[27] McFarland, C.D., Thomas, C.H., Defilippis, C., Steele, J.G. and Healy, K.E. Protein adsorption and cell attachment to patterned surfaces. *J Biomed Mater Res*, 49:200–10, 2000.

[28] Papavasiliou, G., Songprawat, P., Perez-Luna, V., Hammes, E., Morris, M., Chiu, Y.C., et al. Three-dimensional patterning of poly (ethylene Glycol) hydrogels through surface-initiated photopolymerization. *Tissue Eng Part C Methods*. Jun;14(2):129-40, 2008.

[29] Santos, F., Mendes, R.K. and Tatsuo, L., Applications of QCM, EIS and spr in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (bio)sensors. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.

[30] Xueen J., Qingji X., Youyu Z., and Shouzhuo Y., Simultaneous Quartz Crystal Microbalance – Electrochemical Impedance Spectroscopy Study on the Adsorption of Antihuman Immunoglobulin G and Its Immunoreaction at Nanomaterial-modified Au Electrode Surfaces. *Analytical Sciences*, 23. 2007.

[31] Wright, J. and Roscoe, S.. Electrochemical impedance spectroscopy and quartz cristal nanobalance (EQCN) studies of insulin adsorption on Pt. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 564, pp. 185–197. 2004.

[32] Smiechowski, M. Electrochemical detection and characterization of proteins. *Biosensors and Bioelectronics* 22, pp. 670–677. 2006.

- [33] Milonjić, S.K. A consideration of the correct calculation of thermodynamic parameters of adsorption. *J. Serb. Chem. Soc.* 72 (12) 1363–1367. 2007.
- [34] Nomura, T. and Iijima, M., ESCA. Study of the oxidation of platinum-tin (Pt₃Sn). 2. Exposure to air, *Anal. Chem. Acta* 131, 97. 1981.
- [35] Kanazawa, K.K., Gordon, J.G., Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid *Anal. Chem.* 57, 1770, 1985.
- [36] Bruckenstein, S. and Shay, M., *Electrochim. Acta* 30, 1295, 1985.
- [37] Elwing, H., Polar adhesion of *Treponema denticola* on wettability gradient surfaces *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 11, pp. 255–264, 1998.
- [38] M.S. Jenkins, *Biotechnology and bioengineering*, 88, 3, pp. 392-398, 2004.
- [39] Omanovic S. and Roscoe S., Interfacial Behavior of Lactoglobulin at a Stainless Steel Surface: An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study. *Journal of Colloid and Interface Science* 227, pp. 452–460, 2000.
- [40] Roscoe S., Electrochemical studies of the interfacial behaviour of a-lactalbumin and bovine serum albumin. *Food Research International*, 30, 1, pp. 13-20, 1997.
- [41] Roscoe, S. Electrochemical Studies of the Interfacial Behavior of Insulin. *Journal of Colloid and Interface Science* 184, pp. 449–455, 1996.
- [42] Cosman, N., Fatih, K. and Roscoe, S., Electrochemical impedance spectroscopy study of the adsorption behaviour of a-lactalbumin and b-casein at stainless steel. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 574, pp. 261–271, 2005.