

Obtención de colágeno a partir de tejidos animales subproductos de la industria cárnica

Obtaining Collagen From Animal Tissues By-Products Of The Meat Industry

Janet Carvajal de la Osa^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-7954-8359>

Javier Luis Villegas Santos¹ <https://orcid.org/0000-0003-2773-3469>

Juan Prohías Martínez² <https://orcid.org/0000-0003-1274-6320>

Carlos Rafael Figueroa¹ <https://orcid.org/0000-0002-3821-8748>

Yunier Serrano Rivera³ <https://orcid.org/0000-0003-1575-9530>

Ahmed Valdés Martínez⁴ <https://orcid.org/0000-0002-7544-3303>

Reyniel Gómez González¹ <https://orcid.org/0000-0002-8720-6065>

José María Ameneiros Martínez¹ <https://orcid.org/0000-0001-5184-7568>

John William Sandino del Busto⁵ <https://orcid.org/0000-0002-2925-3998>

¹Universidad Tecnológica de La Habana José A. Echeverría (CU JAE). La Habana, Cuba.

²Cardiocentro Hospital Hermanos Ameijeiras. La Habana, Cuba.

³Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC)v

⁴Centro de Estudios Avanzados de Cuba (CEA). La Habana, Cuba.

⁵Universidad Nacional de Colombia (UNAL). Bogotá, Colombia.

*Autor para la correspondencia: aliciaal25@nauta.cu

RESUMEN

Introducción: El colágeno es la proteína estructural más abundante en el cuerpo humano, por este motivo es muy utilizado en ingeniería de tejidos. Cuando se requieren buenas prestaciones mecánicas del producto final se intenta mantener

con el mayor contenido en fibra larga. Para su caracterización se acude a técnicas como la electroforesis y la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, que permiten determinar la pureza y contenido proteico de la misma.

Objetivos: Caracterizar el colágeno obtenido de pollo y cerdo para su posterior uso en ingeniería de tejidos cardiovasculares.

Métodos: La disolución de la fuente del colágeno se realizó en ácido acético al 5 %. El colágeno se caracterizó utilizando pruebas de electroforesis mediante el método SDS-PAGE y la espectrometría infrarroja por transformada de Fourier utilizando el modo de análisis por reflexión con el accesorio ATR SPECAC y rango de 600 a 4000 1/cm, para determinar la pureza.

Resultados: Como resultado del trabajo se obtiene colágenos tipo I y III en la mezcla de patas más cresta de pollo. También colágeno tipo I en las muestras de patas, crestas de pollo y piel de cerdo.

Conclusiones: Se concluyó que las materias primas utilizadas pueden ser fuentes de colágeno utilizables para la regeneración del tejido cardiovascular.

Palabras claves: colágeno, cadenas alfa, electroforesis de proteínas, bandas de absorción, biomaterial.

ABSTRACT

Introduction: Collagen is the most abundant structural protein in the human body, for this reason it is widely used in tissue engineering. When good mechanical performance of the final product is required, an attempt is made to maintain the highest long fiber content. For its characterization, techniques such as electrophoresis and infrared spectroscopy by Fourier transform are used, which allow to determine the purity and protein content of the same.

Objectives: To characterize the collagen obtained from chicken and pork for later use in cardiovascular tissue engineering.

Methods: The dissolution of the collagen source was performed in 5% acetic acid. Collagen was characterized using electrophoresis tests using the SDS-PAGE method and Fourier transform infrared spectrometry using the reflection analysis

mode with the SPECAC ATR accessory and range from 600 to 4000 1/cm, to determine purity.

Results: As a result of the work, type I and III collagens are obtained in the mixture of legs plus chicken crest. Also type I collagen in the samples of legs, chicken crests and pig skin.

Conclusions: It was concluded that the raw materials used may be sources of collagen usable for the regeneration of cardiovascular tissue.

Keywords: collagen,; alpha chains; protein electrophoresis; absorption bands; biomaterial.

Recibido: 13/01/2022

Aprobado 18/02/2022

Introducción

El colágeno está formado por aminoácidos (GXY) en los que la glicina siempre ocupa la primera posición. Las otras dos posiciones se encuentran ocupadas por el aminoácido prolina e hidroxiprolina. En la posición Y la prolina es transformada en 4-hidroxiprolina, lo que repercute en la estabilidad de la molécula, lo que es necesario para soportar las temperaturas corporales sin degradarse.⁽¹⁾ Esta composición puede variar según el lugar de la anatomía donde se encuentre, cambia la proporción que ocupa el colágeno en el cuerpo de los vertebrados, entre 13% y 30%.^(2, 3) No obstante, es uno de los más utilizados como biomaterial en ingeniería de tejidos.⁽⁴⁾

El colágeno tipo I es el más frecuente y está formado por dos cadenas $\alpha 1$ idénticas y una $\alpha 2$,⁽²⁾ se caracterizan por su resistencia al estiramiento y están presentes en la piel, huesos, dentina y cornea. Estas dos cadenas $\alpha 1$ tienen un peso molecular de aproximadamente 137,755 kDa y la cadena $\alpha 2$ de aproximadamente 128,995 kDa.⁽⁵⁾ El colágeno tipo III se encuentra en la pared de los vasos sanguíneos, mucosa intestinal y fibras musculares, y está formado por tres cadenas $\alpha 1$ idénticas, formando redes de fibras sumamente delgadas, las que tienen un peso molecular de aproximadamente 131,249 kDa.^(2, 5)

Las arterias y el corazón en su estructura están compuestas de elastina, fibrina y colágenos I y III. El colágeno es el que aporta el entramado que finalmente contribuye a la integración de los componentes de la matriz y le da forma de soporte. En el corazón las fibras de colágeno tipo I representan el 80 % y la fibra de colágeno tipo III cerca del 10 %.⁽⁶⁾ En el caso de las arterias el colágeno ocupa un 20 % en la matriz extracelular y quien predomina es el tipo III un 10 % por encima de los demás compuestos.⁽⁷⁾ Las fibras de colágeno tipo I proveen un soporte estructural y otorgan propiedades que incluyen firmeza y resistencia a la deformación. Las fibras de colágeno tipo III desempeñan un importante rol como eslabón entre los elementos contráctiles adyacentes, llevando información útil para la función celular.⁽⁸⁾

En los procesos de obtención de colágeno, cuando se requieren buenas prestaciones mecánicas del producto final se intenta mantener el colágeno en estado nativo con el mayor contenido en fibra larga, es decir, sin deshidratar, para que después al reconstruirlo se obtengan productos con colágeno de alto peso molecular. Cuanto mayor es el peso molecular final, mejores prestaciones mecánicas tiene el producto.⁽⁹⁾

La industria alimenticia anualmente aporta aproximadamente un 20 %⁽⁷⁾ de desechos de productos alimenticios, contribuyendo a la contaminación ambiental. Las fuentes de obtención de colágeno seleccionadas responden fundamentalmente a que aportan la estructura y biocompatibilidad requeridas para la regeneración de tejidos. Estas fuentes garantizan la obtención de una matriz extracelular con las mismas características que la del cuerpo humano y no requieren de tratamientos de fortalecimiento de sus propiedades, como es el caso de los organismos marinos los cuales tienen bajas temperaturas de desnaturalización.⁽¹⁰⁾

Las patas de pollo poseen en su estado natural entre un 2 % y 10 % de colágeno tipo I.⁽¹¹⁾ Las crestas, que también contienen colágeno tipo I, lo revelan a través de la electroforesis en las bandas entre 97 kDa y 120 kDa.⁽¹²⁾

Los trabajos más frecuentes de extracción de colágeno en aves, reportados en la literatura se han realizado a partir de crestas,⁽¹²⁾ patas^(13, 14, 15) y piel de pollos⁽¹⁶⁾

y pato.⁽¹⁷⁾ El resultado de esta extracción en su mayoría se destina a la obtención de gelatinas y subproductos para la industria alimentaria,⁽¹³⁾ farmacéutica,⁽¹⁴⁾ aplicaciones para la industria cosmética⁽¹⁸⁾ y la industria médica.⁽⁹⁾

El cerdo, ha sido utilizado por la ingeniería de tejidos moderna, para su uso en aplicaciones médicas,⁽¹⁰⁾ con buenos resultados. Sin embargo, hay que tener en cuenta la forma de extracción para que mantenga la estructura de las proteínas y no se degrade.⁽¹⁹⁾

El objetivo del presente trabajo es obtener colágeno de las patas, crestas de pollo y piel de cerdo, para su caracterización y propuesta en la fabricación de andamios destinados a la regeneración de tejidos del sistema cardiovascular.

Materiales y métodos

Materiales

La materia prima utilizada para la obtención del colágeno se obtuvo de dos fuentes animales, crestas y patas de pollo de la raza Lego, adquiridas de un centro de sacrificio de aves y piel de cerdo Yorkshire Canadiense adquirido en el mercado agropecuario. Como disolvente se utilizó ácido acético glacial (98 %) llevado al 5 % y para eliminación de grasas alcohol etílico 70 %, además, agua destilada, cloruro de sodio (NaCl) 98,8 %, papel de filtro para dializado, tubos de ensayo, Erlenmeyer y otros, dispositivos de cristalería de laboratorio, pesa digital, cámara de refrigeración y una centrifuga marca KOKUSAM (Japonesa).

Para el cálculo del rendimiento se utilizó una balanza digital marca KERN PBJ (Alemana) de ajuste automático con capacidad de peso neto aproximadamente 3,2 kg.

Para la electroforesis de proteínas SDS-PAGE se utilizaron geles de acrilamida al 6%, el equipo de electroforesis marca Sistema MiniV8.10 Biometra (Estados Unidos), solución de azul de Coomassie R-250 al 0,1 % y el patrón de peso molecular Broad range Protein Molecular Weight marker (Promega, Estados Unidos).

Para la espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se utilizó un equipo marca SHIMATZU-CORP, modelo IR prestige 21 AIM/8800 (Japonés).

Método de obtención del colágeno

Para la obtención del colágeno se prepararon soluciones separadas de patas, crestas de pollo y piel de cerdo, y una solución con patas y crestas de pollo mezcladas. El material fue lavado con agua común, solución salina, alcohol y agua destilada. Esto se realiza para arrastrar la mayor cantidad de impurezas posible, luego del lavado se trituran y se vierten en una solución de ácido acético y se conservan a una temperatura de 4 °C. A los 5 y 21 días se filtran las diferentes disoluciones en tamices de 1 mm. La sustancia obtenida de cada disolución se centrifuga por 40 min a 2 000/g a temperatura ambiente. Se recoge el sobrenadante, al que se le aplica lentamente 3 g de cristales de NaCl por cada 15 mL mientras se revuelve. Esta operación se realiza por espacio de 2 horas y se deja reposar 30 min. Se centrifuga nuevamente 10 min a 8 000/g a temperatura ambiente. Se recoge el precipitado desprendido de la ionización provocada por la sal y se somete a un dializado con papel de filtro, lavándolo con agua destilada hasta que no se observen impurezas. Se somete la muestra obtenida a pruebas físico-químicas.

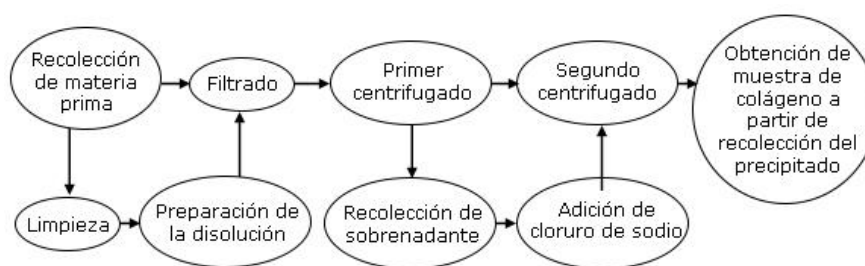


Fig. 1. Proceso de extracción del colágeno.

Cálculo del rendimiento

El rendimiento en las extracciones de colágeno es el resultado de una cantidad obtenida de material final, luego del procesamiento de un volumen de materia

prima inicial, expresado en porcentaje. En cualquier fuente se obtiene a través de la fórmula siguiente:

$$\% \text{Rendimiento} = (\text{gramos de producto} / \text{gramos de materia prima}) \cdot 100$$

En este caso se tomaron las cantidades de materia prima a utilizar en cada disolución y se pesaron en una balanza digital. Luego de la obtención del colágeno se pesó la cantidad resultante del precipitado y se aplicó la fórmula antes expuesta.

Caracterización del colágeno obtenido mediante SDS-PAGE

Todas las muestras obtenidas se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 6 %, según Laemmli⁽²⁰⁾ en condiciones reductoras. Se tomaron 5 µL de la proteína en tampón de carga. Se calentaron las muestras 10 min a 95 °C. Las corridas electroforéticas se realizaron a un valor de corriente constante de 25 mA y la tensión se mantuvo libre, según las indicaciones del fabricante del equipo. Los geles se revelaron con la solución de azul de Coomassie R-250 al 0,1 % en una mezcla con agua, metanol y ácido acético (45:45:10 v/v).

Caracterización del colágeno obtenido mediante FTIR

El análisis se realizó tomando una pequeña porción de la muestra de características viscosas, se ejerció presión sobre ella para garantizar contacto entre la muestra y la ventana óptica para un buen resultado del análisis. Se procedió a realizar la medición, pasando radiación infrarroja a través de la muestra que absorbe una parte y transmite la otra creando una huella digital molecular única. El rango de análisis utilizado estuvo entre 600 a 4000 1/cm, el modo de análisis fue por reflexión total atenuada (ATR) y el accesorio ATR SPECAC.

Resultados

Cálculo del rendimiento

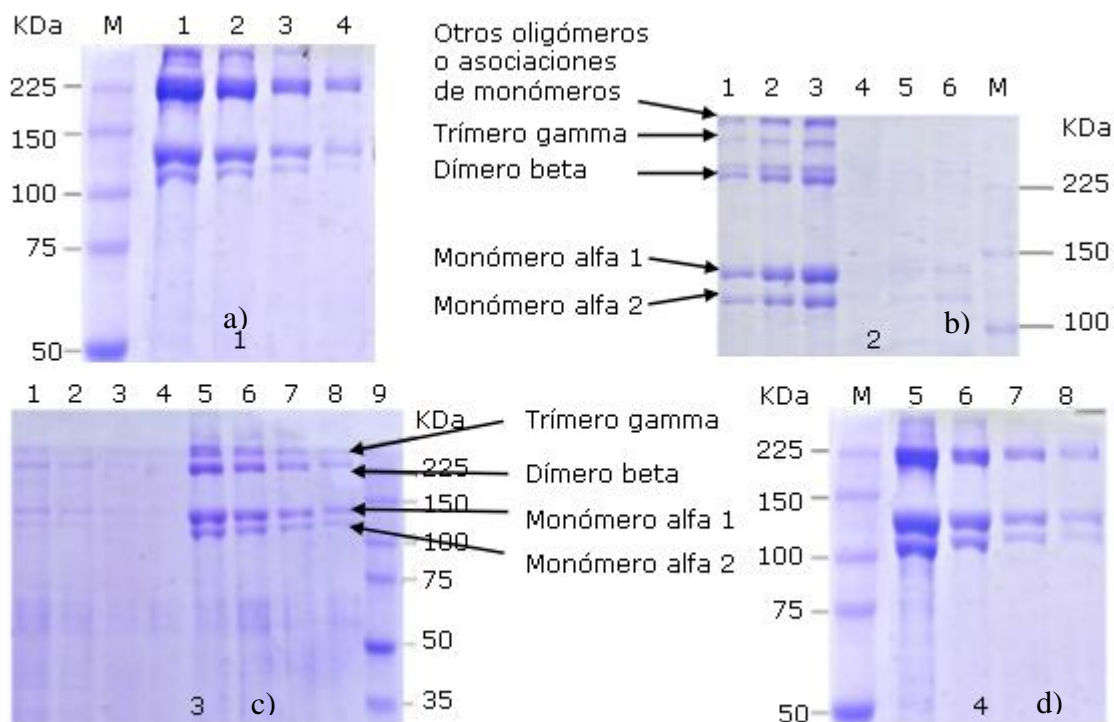
Para la obtención del colágeno se utilizaron 2 270 g de crestas de pollo y de ellos se consiguieron 44 g de precipitado para un rendimiento de 1,93 %. En el caso de las patas de pollo se utilizaron 1 362 g del material neto, obteniéndose 91 g de precipitado para un rendimiento de 6,68 %. En la disolución de patas y crestas se utilizaron 227 g de patas y 227 g de crestas de pollo (454 g total), se obtuvo un precipitado de 16 g para un rendimiento del 3,54 %. Del cerdo se utilizó piel en una proporción de 1 816 g, se obtuvieron 116 g del precipitado para un rendimiento del 6,38 %.

Caracterización del colágeno obtenido mediante SDS-Page

Los resultados de electroforesis SDS-PAGE (Fig. 2), evidencian mediante diferentes grupos, bandas o zonas la separación de las proteínas de acuerdo con su peso molecular. Se utilizó el mismo patrón de peso molecular (Promega) analizando las bandas que aparecen entre los 100 kDa y 250 kDa. Generalmente las cadenas $\alpha 1$ se encuentran representadas entre los 100 kDa y los 135 kDa, las cadenas $\alpha 2$ en las bandas desde 90 kDa hasta los 125 kDa y las cadenas β y γ representadas por encima de los 200 kDa. ^(21,22)

En la figura 2 (1, 2 y 4) se observan bandas que oscilan alrededor de los 135 kDa y 120 kDa, estas corresponden a las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, respectivamente, y bandas por sobre los 200 kDa que representan los componentes β , lo que sugiere presencia de colágeno tipo I. En la figura 2(3), además de las bandas antes mencionadas, aparece también una triple cadena $\alpha 1$ en los alrededores de los 131 kDa que sugiere la presencia de colágeno tipo III.

También en la figura 2(2 y 3) se observa una diferencia entre la presentación de las disoluciones de 5 y 21 días en la que se manifiesta que a mayor tiempo de disolución mayor concentración de la proteína, corroborado con las muestras de las figuras 2(1 y 4), las que solo fueron extraídas a los 21 días.



*Alfa 1 colágeno tipo 1/alfa 1 colágeno tipo 3

Fig. 2. Resultados de las pruebas de electroforesis de proteínas. a) Electroforesis realizada a las crestas de pollo con gel separador al 6 %. Carriles 1-4 muestras en dilución seriada 1:2, carril M patrón. b) Electroforesis realizada a la muestra de colágeno de patas con gel separador al 6%. Carriles 1-3 muestras de 21 días en disolución 1:2, carriles 4-6 muestras de 5 días en disolución carril M patrón. c) Electroforesis realizada con gel separador al 6 % a la muestra de patas y crestas de pollo mezcladas 50/50 %. Carriles del 1-4 muestra de 5 días de disolución. Carriles del 5-8 muestra con 21 días en disolución. Carril 9 Patrón. d) Electroforesis de proteínas de colágeno piel de cerdo: carriles 5-8 muestra disuelta 1:2, carril M patrón.

Caracterización del colágeno obtenido mediante FTIR

En esta prueba se expone como resultado la composición y tipo de colágeno obtenido. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.

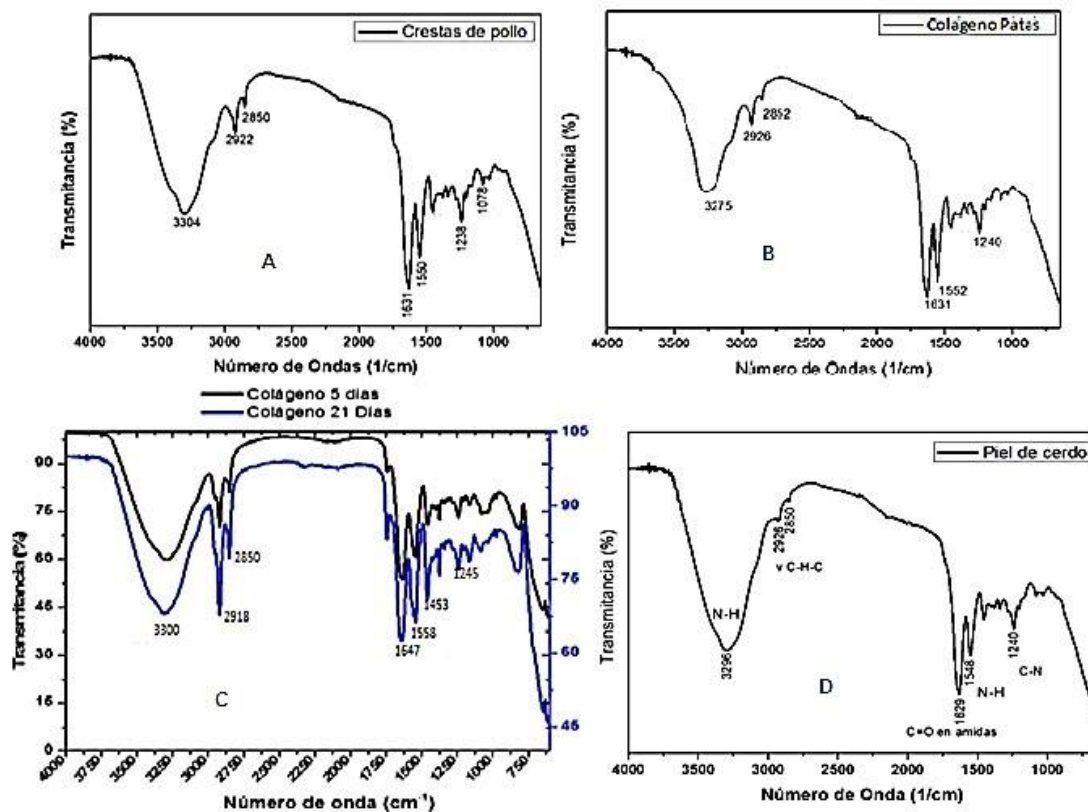


Fig. 3. Resultados de FTIR. a) Cresta de pollo. b) Patas de pollo. c) Mezcla de patas más crestas de pollo 50/50 %. d) Piel de cerdo.

Los espectros obtenidos en todos los casos muestran una banda de C-H₂ entre 2850-2852, la que demuestra presencia de residuos del ácido acético. El resto de las bandas se muestran en la tabla 1 para mejor comprensión.

Tabla 1. Resultados obtenidos para la prueba de FTIR

| Muestra | Amida A | Amida B | Amida I | Amida II | Amida III |
|---------------|---------|---------|---------|----------|-------------|
| Crestas | 3304 | 2922 | 1631 | 1550 | 1238 |
| Patatas | 3275 | 2926 | 1631 | 1552 | 1240 |
| Crestas+patas | 3300 | 2918 | 1647 | 1558 | 1453 y 1245 |
| Piel de cerdo | 3296 | 2926 | 1629 | 1548 | 1240 |

Discusión

Los rendimientos de obtención de colágeno reportados en la literatura sobre las fuentes utilizadas son 2,44 % para las crestas⁽¹²⁾ y para las patas, $9,07 \pm 0,18$ %^(2, 14) y $9,52 \pm 0,18$ %.⁽¹³⁾ Con respecto al cerdo se han reportado desde 1,5 % al 2 %, ⁽¹⁹⁾ entre $6,37 \pm 0,12$ % y $18,08 \pm 0,08$ %⁽²³⁾ y hasta 30,7%.⁽²⁴⁾ La fluctuación entre rendimientos se debe a diferentes variables que afectan de manera directa e indirecta el resultado, entre estas variables se pueden citar el disolvente escogido, la anatomía, su tamaño y volumen, y el lugar del animal de donde se extrae el colágeno.^(25, 26)

Las disoluciones para este trabajo se realizaron en ácido acético, obteniéndose un rendimiento para las crestas de 1,93 %, para las patas 6,68 %, para la mezcla de patas más crestas 3,54 % y para la piel de cerdo 6,38 %. Teniendo en cuenta las variables mencionadas y las partes del animal escogidas para la extracción, se puede determinar que los valores obtenidos se deben a que el desarrollo del colágeno en el animal depende de las funciones que desempeña el órgano, muchas de las cuales implica un alto grado de reemplazo o recambio proteico, presentando una gradual variabilidad en el tejido conectivo y muscular del mismo.⁽²⁶⁾

Al realizar un análisis de electroforesis de proteínas a cada muestra, se tuvo en cuenta que para aves y cerdo típicamente se reporta colágeno tipo I. Este está compuesto por dos cadenas $\alpha 1$, una $\alpha 2$ y una estructura de componentes β .⁽²⁷⁾ Las muestras estudiadas de cresta (Fig. 2 a), patas de pollo (Fig. 2 b) y piel de cerdo (Fig. 2 d) manifestaron este tipo de colágeno en la aparición de dos cadenas $\alpha 1$ en los alrededores de los 130 kDa, una $\alpha 2$ alrededor de los 120 kDa y un componente β situado por sobre los 200 kDa y 225 kDa. Estos resultados son compatibles con los reportados en la literatura para colágeno de salmón, lubina y pargo asiático,^(28, 29) piel de cerdo^(19, 23, 24, 25) y patas de pollo.^(2, 13, 18)

Sin embargo, en la prueba realizada a la mezcla de patas más crestas 50/50 % (Fig. 2 c), se revela la presencia de colágeno tipo I con la aparición de las dos cadenas $\alpha 1$ de aproximadamente 133,55 kDa, una cadena $\alpha 2$ de aproximadamente 129,01 kDa y un componente β por sobre los 225 kDa, y además colágeno tipo III

el que se observa mediante tres cadenas $\alpha 1$ de aproximadamente 131,25 kDa. Este tipo de colágeno en su estructura tiene enlaces S-S,^(27, 30) a diferencia del colágeno tipo I que no los presenta, pues en el proceso de biosíntesis celular este tipo de enlace disulfídico fue eliminado del procolágeno como parte de la supresión del propéctido N-terminal, dejando una molécula con tres cadenas helicoidales de polipéptidos, con terminales no helicoidales conocidos como telopéptidos.

Por otro lado, cuando se requiere aislar colágeno de un tejido como en el caso de esta investigación donde se utilizan, patas y crestas de pollo y piel de cerdo, es necesario disolver ese tejido en un medio, como por ejemplo el ácido acético. En este proceso ocurre una alteración de la estructura proteica de las fibras de colágeno original, donde se eliminan impurezas propias del tejido, quedando disueltas las proteínas del colágeno en el ácido. Para recuperar nuevamente la estructura proteica del colágeno original se añaden cristales de cloruro de sodio, ocurriendo la precipitación de la proteína, esto acontece gracias a la carga iónica que esta sal le proporciona.^(10, 26, 30)

La aparición de colágeno tipo III en la mezcla de crestas y patas de pollo, pudo estar motivada por la formación de enlaces disulfídico derivados de la presencia de sulfatos en la sal⁽³¹⁾ y en el ácido,⁽³²⁾ que fueron utilizados en el proceso de extracción de colágeno.^(26, 33)

En las pruebas de FTIR la amida A es característica entre las bandas (3400-3300) y está relacionada con el estiramiento de N-H. La amida B generalmente entre (3100-2800) y relacionada con el estiramiento asimétrico y simétrico de enlaces C-H. Las amidas I entre (1700-1600), II entre (1550-1300) y III entre (1250-1000), están relacionadas directamente con la configuración del colágeno. Específicamente las bandas entre 1500-600 son identificadas como la “huella dactilar”, es por esto que algunos trabajos reportan la amida III entre (1450-1400) haciendo alusión al colágeno tipo III.^(17, 34) Los resultados expuestos en las electroforesis de proteínas se corroboran en el FTIR para la mezcla de crestas y patas de pollo, donde se observa la aparición de dos picos en bandas pertenecientes a la amida III en (1245 y 1453 1/cm), poniendo de manifiesto la

presencia de dos tipos de colágeno (I y III).^(17, 34) Mientras que para crestas, patas de pollo y piel de cerdo se observa colágeno tipo I. Estas bandas poseen gran similitud con los valores logrados por esta técnica y reportados por autores como Suparno y Fiodorovich.^(15, 19) Además de coincidir con las bandas reportadas para válvulas del corazón por Campos Vidal,⁽³⁴⁾ lo que confirma su posible utilización en regeneración de sistema cardiovascular.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados alcanzados se puede concluir que todos los materiales colagénicos obtenidos reúnen los requisitos necesarios para ser utilizados como fuente de colágenos en la ingeniería de tejidos cardiovascular. Se recomienda que la mezcla de crestas más patas sea analizada en investigaciones futuras, para su utilización en construcción de andamios para el sistema cardiovascular.

Referencias bibliográficas

1. Paredes Puerto A., Camacho Villegas T., Vallejo Cardona A., Esquivel Solís H., Colágenas Recombinantes para Andamios de Ingeniería de Tejidos. Revista Mexicana De Ingeniería. 2017;38(1):103-114. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.7>
2. Liu DC, Lin YK and Chen MT. Optimum condition of extracting collagen from chicken feet and its characteristics, Asian-Aust J Anim Sci. 2001;14(11):1638-44. DOI: <https://10.5713/ajas.2001.1638> 8
3. Copes F, Pien N, Van Vlierberghe S, Boccafoschi F and Mantovani D. Collagen-Based Tissue Engineering Strategies for Vascular Medicine. Front. Bioeng. Biotechnol. (2019) 7:166. Disponible en: DOI: <https://10.3389/fbioe.2019.00166>
4. Kazuhisa M. Skin-Moisturizing Effect of Collagen Peptides Taking Orally. J Nutr Food Sci. 2018;8(2):682-90. DOI: <https://10.4172/2155-9600.1000682>

5. Robert J, Hartmann DJ, Sengel P. Production of fibronectin and collagen types I and III by chick embryo dermal cells cultured on extracellular matrix substrates. *Int. J. Dev. Biol.* 1989; 33:267-275.
6. Wickham A. Multifunctional Biomimetic Scaffolds Tailored for Cardiac Regeneration. 1era ed, Ed. LiU-Tryck. 2015. Consultado en diciembre de 2019. Disponible en: <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:848329/FULLTEXT01.pdf>,
7. Silva Tiago H, Moreira Silva J, Marques AL, Domingues A, Bayon Y and Reis Rui L Marine Origin Collagens and Its Potential Applications. *Mar. Drugs.* 2014;12:5881-5901. DOI: <https://10.3390/md12125881>
8. Belbachir K, Noreen R, Gouspillou G, Petibois C. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem.* 2009;395:829-837. DOI: <https://10.1007/s00216-009-3019-y>
9. Cantero Belinchón P, Palacios Lasa M, Urdanoz Izco B. Procedimiento de obtención de colágeno a partir de la piel de un animal- Google Patents”, Publication 2013-01-03, PCT/ES2011/070467, WO2013001103A1. Disponible en: <https://patentados.com/2013/obtencion-de-colageno-a-partir>
10. Gómez González R, Figueroa Hernández C, Ameneiros Martínez JM, Prohías J. Obtención de una matriz de colágeno de origen porcino, 19 CCIA CUJAE. 2018. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/329488378>
11. Baburina MI, Ivankin AN, Stanovova IA. Chemical and biotechnological processing of collagen-containing raw materials into functional components of feed suitable for production of high-quality meat from farm animals; 2017. 59th International Meat Industry Conference MEATCON 2017, IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.85 012037. DOI: <https://10.1088/1755-1315/85/1/012037>
12. Castro Vargas CD. Obtención de colágeno a partir de crestas de pollos. Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander; 2012. Disponible en: <https://docplayer.es/30123336-Obtencion-de-colageno-a-partir-de-crestas-de-pollos.html>
13. Mohd Shakrie PA, Mohamed Ibrahim N, Syed Ibrahim Mohd I, Shaik N, Jasamai M, Kok Wai L, Nur Murnisa M, Ahmad Fuad Sh. Physicochemical Evaluation and

- Spectroscopic Characterisation of Gelatine from Shank and Toes of Gallus gallus domesticus., Sains Malaysiana. 2016;45(3):435-449. Disponible en: www.researchgate.net/publication/291330340_Physicochemical_evaluation_and_spectroscopic_characterisation_of_gelatine_from_shank_and_toes_of_Gallus_gallus_domesticus,
14. Dhiya Mokhtar N, Abdul Wahab W, Ashima Hamdan N, Abdul Hadi H, Muhamad Shafiq AH, Muhamad Bunnori N. Extraction Optimization and Characterization of Collagen from Chicken (Gallus gallus domesticus) Feet. 5th International Conference on Chemical, Agricultural, Biological and Environmental Sciences (CAFES-17) Kyoto (Japan) April 18-19; 2017- Disponible en: http://irep.iium.edu.my/56704/12/56704_Extraction%20Optimization%20and%20Characterization%20of%20Collagen.pdf
 15. Suparno O, Prasetyo N B. Isolation of collagen from chicken feet with hydro-extraction method and its physico-chemical characterisation, ICDALC 2018 IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 335. 2019;012018 IOP. DOI: <https://10.1088/1755-1315/335/1/0120181>
 16. Chia Wei L, Loughran M, Tsung Yu T, Shuo Wen T. Evaluation of convenient extraction of chicken skin collagen using organic acid and pepsin combination. J. Chin. Soc. Anim. Sic. 2013;42(1):27-38. Disponible en: <https://docplayer.net/57689804-Evaluation-of-convenient-extraction-of-chicken-skin-collagen-using-organic-acid-and-pepsin-combination.html>
 17. Huda N, Seow EK, Normawati MN, Nik Aisyah NM. Preliminary Study on Physicochemical Properties of Duck Feet Collagen. International Journal of Poultry Science. 2013;12(10):615-621. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/272964562_Preliminary_Study_on_Physicochemical_Properties_of_Duck_Feet_Collagen
 18. Braz Da Silva Araújo I. , Alves Bezerra T. K., Silva Do Nascimento E., De Almeida Gadelha C.A., Santi-Gadelha T., Suely Madruga M., Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization , Food Sci. Technol, Campinas, (2018) 38(1):167-173, disponible en: <https://doi.org/10.1590/fst.27517>

19. Fiodorovich Gorlov I, Ivanovich Titov E, Viacheslavovich Semenov G, Ivanovna Slozhenkina M, Yurievich Sokolov A, Saferbegovich Omarov R, Ivanovich Goncharov A, Yurievna Zlobina E, Viktorovna Litvinova E, Vladimirovna Karpenko E. Collagen from porcine skin: a method of extraction and structural properties , International Journal of Food Properties. 2018;21(1):1031-1042. DOI: <https://10.1080/10942912.2018.1466324>
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-685.
21. Xuan Ky, P, Bao Vy P, Viet Ha D, Ho Khanh Hy L, Thu Hong N, Thi Thiet D, Phuong Anh N. Investigation of protein patterns and antioxidant activity of collagen hydrolysates from skin of fanbellied leather jacket monacanthus chinensis by various enzymes. Journal of Marine Science and Technology. 2018;18(4A):141-150. DOI: <https://10.15625/1859-3097/18/4A/13642>
22. Wu J, Guo X, Liu H, Chen L. Isolation and Comparative Study on the Characterization of Guanidine Hydrochloride Soluble Collagen and Pepsin Soluble Collagen from the Body of Surf Clam Shell (*Coelomactra antiquata*). Foods. 2019;8:11. DOI: <https://10.3390/foods8010011>
23. Ki Hong J, Yoon Seon H, Young Boong K, Yun Sang Ch, Byoung Mok K, Dong Wook K, Aera J., Jinyoung Ch. Quality Characteristics of Pork Skin Collagen with Enzyme Treatments, Korean J. Food Nutr. 2016;29(5):760-766. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.9799/ksfan.2016.29.5.760>
24. Knight KR, Mccann JJ, Vanderkolk CA, Coe SA, Mcc O'brien B. Microsurgery The redistribution of collagen in expanded pig skin. British Journal of Plastic Surgery. 1990; 43:565-570. Disponible en: [https://www.jpr Surg.com/article/0007-1226\(90\)90121-F/pdf](https://www.jpr Surg.com/article/0007-1226(90)90121-F/pdf)
25. Yang H, Shu Z. The extraction of collagen protein from pigskin, J. Chem. Pharm. Res. 2014;6(2):683-687. Disponible en <http://www.jocpr.com/articles/the-extraction-of-collagen-protein-from-pigskin.pdf>
26. Torres Arreola W, Pacheco Aguilar R, Sotelo Mundo RR, Rouzaud Sández O, Ezquerro Brauer JM. Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del

- manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) CYTA. Journal of Food. 2008;6(2):101-108. DOI: <https://10.1080/11358120809487634>
27. Gorgieva S, Kokol V. Collagen - vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. In: Biomaterials Applications for Nanomedicine. Edited by Prof. Rosario Pignatello. Publisher InTech; 2011. Disponible en: https://books.google.com/cu/books?hl=es&lr=&id=b8ePDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR11&dq=Biomaterials+Applications+for+Nanomedicine&ots=I2_5FVCENW&sig=METtzkMdv6AXjUxQiFdOVXGcKc&redir_esc=y#v=onepage&q=Biomaterials%20Applications%20for%20Nanomedicine&f=false
28. Tanaka T, Takahashi K, Tsubaki K, Hirata M, Yamamoto K, Biswas A, Moriyama T, Kawamura Y. Isolation and characterization of acid soluble bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) skin collagen. Fisheries and Aquatic Sciences. 2018;21:7. DOI: <https://10.1186/s41240-018-0084-1>
29. Gaurav KP, Suresh PV. Comparative assessment of physic-chemical characteristics and fibril formation capacity of thermostable carp scales collagen, Materials Science and engineering. 2017;70:32-40. DOI: <https://10.1016/j.msec.2016.08.047>
30. Meyer M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties, Meyer BioMed Eng OnLine (2019) 18:24, 74pages, <https://doi.org/10.1186/s12938-019-0647-0>
31. MERCK. Sodium chloride for analysis EMSURE® ACS ISO Reag. Ph. Eur. Disponible en: https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Sodium-chloride,MDA_CHEM-106404?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F#anchor_Specifications
32. PanReac AppliChem. Ácido Acético glacial (Reag. USP, Ph. Eur.) para análisis, ACS, ISO, <https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/ga-para-analisis-ac-iso/%C3%81cido+ac%C3%A9tico+glacial+%28reag.+usp%2C+ph.+eur.%29+para+an%C3%A1lisis%2C+acs%2C+iso/131008>

33. Cliche S, Amiot J, Avezard C, Gariepy C. Extraction and Characterization of Collagen with or Without Telopeptides from Chicken Skin, Poultry Science. 2003;82:503-509. disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003257911944978X?via%3Dihub>
34. De Campos Vidal B, Mello ML. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy, Micron. 2011;42:283-289. DOI: <https://10.106/j.micron.2010.09.010>

Conflicto de intereses

No existen conflictos de intereses.

Contribución de autoría

Conceptualización: Juan Prohías Martínez, Carlos Rafael Figueroa, Reyniel Gómez González, Janet Carvajal de la Osa.

Investigación: Javier Luis Villegas, Yunier Serrano Rivera, Ahmed Valdés Martínez, Reyniel Gómez González, Janet Carvajal de la Osa.

Metodología: Carlos Rafael Figueroa, Javier Luis Villegas, Janet Carvajal de la Osa.

Administración del proyecto: José María Ameneiros Martínez, Janet Carvajal de la Osa.

Recursos: José María Ameneiros Martínez, John William Sandino del Busto.

Supervisión: Juan Prohías Martínez, Carlos Rafael Figueroa, John William Sandino del Busto.

Validación: José María Ameneiros Martínez, John William Sandino del Busto.

Redacción del borrador original: Javier Luis Villegas, Janet Carvajal de la Osa.

Redacción, revisión y edición: Juan Prohías Martínez, Carlos Rafael Figueroa, John William Sandino del Busto, José María Ameneiros Martínez.