

**Obtención de colágeno a partir de subproductos avícolas con potencial uso
en la síntesis de materiales poliméricos para aplicaciones biomédicas**

Corin Daniela Torres Ospina

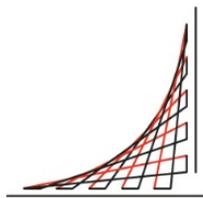
Trabajo Dirigido

Tutoras

**Diana Consuelo Rodríguez Burbano, PhD
Marcela Cristina Múnera Ramírez, PhD**



**Universidad del
Rosario**



**ESCUELA
COLOMBIANA
DE INGENIERÍA
JULIO GARAVITO**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ D.C
2022**

Agradecimientos

Agradezco a mis padres, Martha y Oscar, quienes siempre me han apoyado y me han brindado su más sincero amor. Gracias por educarme, por confiar y creer en mí y por ser mi mayor motivación en todo lo que hago día a día. También doy gracias a mis hermanas, Camila y Tatiana, por acompañarme y aconsejarme siempre, y a mi cuñado, Jimmy, por el apoyo en este proceso. También agradezco a mi sobrino, Juan Pablo, por sacarme siempre las mejores sonrisas con sus ocurrencias.

Agradezco a Hugo, por estar incondicionalmente para mí, escucharme cuando más lo necesité y acompañarme en esta gran etapa de mi vida. A mi mejor amigo, Nicolás, por soportarme, aconsejarme y por ayudarme durante toda la carrera, especialmente en el laboratorio.

Agradezco a mis tutoras, la doctora Diana Consuelo Rodríguez Burbano y la doctora Marcela Cristina Múnera Ramírez, quienes me acompañaron, aconsejaron y guiaron a lo largo de este proceso. Gracias por creer en mí y responder siempre todas mis dudas.

Agradezco también a mi amiga de Neiva, Tania, a mis amigos de la universidad, Jose, Laura y Karol, y a mis amigos de laboratorio, por ayudarme, aconsejarme y hacerme reír cada vez que era posible.

Por último, les quiero agradecer a todos los profesores de la Universidad del Rosario y la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito por sus enseñanzas a lo largo de esta carrera. Especialmente a Julián Gutierrez, Johnny Arévalo y Alejandro Reina. Por último, agradezco a Juan Guarín y a Sonia Perilla, por su gran labor y apoyo dentro del laboratorio.

Resumen

El colágeno es la proteína estructural fibrosa más abundante de los tejidos conectivos de las especies vertebradas del reino animal. Su presencia en los diferentes tejidos proporciona soporte estructural y resistencia. Se han descubierto más de 28 tipos de colágenos, de los cuales el tipo I se destaca por la capacidad que tiene de formar fibras, la resistencia a la tracción y su estabilidad térmica, además de ser, con gran diferencia, el más abundante de todos los tipos de colágeno. Se han reportado distintas fuentes para la obtención de esta proteína, tales como la piel y tendones de aves, especies bovinas o porcinas y las escamas de especies acuáticas, entre otras. Estas fuentes actúan como precursores en diferentes métodos de extracción de colágeno. Se reporta en diversos estudios que los subproductos como las patas de pollo generadas por el procesamiento de la carne de pollo en la industria avícola, se emplean como fuente precursora de colágeno. Sin embargo, se ha identificado falta de información relacionada con los protocolos de extracción enzimática de colágeno tipo I a partir de las patas de pollo utilizando tripsina.

Este proyecto tiene como objetivo la estandarización y desarrollo de un protocolo para obtener colágeno a partir de las extremidades posteriores del pollo empleando tripsina. Para esto, se estudian diferentes parámetros experimentales asociados al proceso de extracción de esta proteína a partir del método enzimático.

En el presente documento se describen los diferentes procedimientos implicados y pruebas efectuadas para la estandarización del protocolo de extracción de colágeno. Adicionalmente, las pruebas de caracterización realizadas al producto obtenido representan los principales resultados obtenidos, comprueban la efectividad del protocolo al demostrar la presencia de las amidas características y de las bandas de absorción relacionadas a la composición estructural del colágeno.

Finalmente, la importancia de desarrollar un protocolo de extracción de colágeno radica en que esta importante proteína es ampliamente utilizada en aplicaciones biomédicas como apósitos para heridas, injertos de hueso, córneas, injertos vasculares, entre otras, gracias a que es un polímero natural que presenta excelentes propiedades biológicas. Por lo tanto, con el fin de establecer una potencial aplicación del colágeno extraído, se realiza una revisión literaria para establecer la propuesta de un protocolo para la síntesis de un hidrogel basado en colágeno y dextrano.

Índice general

Agradecimientos	I
Resumen	II
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Motivación	1
1.2. Objetivos	3
1.2.1. General	3
1.2.2. Específicos	3
1.3. Contribuciones	3
1.4. Organización del documento	3
2. ESTADO DEL ARTE	5
2.1. Aminoácidos	5
2.2. Proteínas	7
2.3. Colágeno	9
2.3.1. Tipos de colágeno	11
2.3.2. Colágeno tipo I	12
2.4. Principales fuentes animales de colágeno tipo I	13
2.4.1. Fuente bovina y porcina	13
2.4.2. Fuente marina	13
2.4.3. Subproductos avícolas	14
2.5. Métodos de extracción de colágeno	14
2.5.1. Método en medio ácido	14
2.5.2. Método alcalino	14
2.5.3. Método enzimático	15
2.6. Biomateriales a base de colágeno	16
2.6.1. Andamios a base de colágeno	16
2.6.2. Hidrogeles a base de colágeno	17
3. METODOLOGÍA	18
3.1. Revisión bibliográfica de protocolos de extracción de colágeno con tripsina	18
3.2. Estandarización del protocolo de extracción de colágeno	20
3.2.1. Protocolo de extracción	20
3.2.2. Prueba de condiciones	22
3.3. Caracterización del colágeno	23
3.3.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	23

3.3.2. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)	23
3.4. Reproducibilidad del protocolo	23
3.5. Rendimiento del protocolo	24
3.6. Revisión de protocolos para la síntesis de hidrogeles de colágeno	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Revisión de protocolos de extracción de colágeno	26
4.2. Etapa de tratamiento de la fuente	28
4.3. Primera prueba de condiciones para la extracción de colágeno	29
4.4. Segunda prueba de condiciones para la extracción de colágeno	30
4.5. Formación de la fibra	33
4.6. Caracterización del colágeno final	34
4.7. Reproducibilidad del protocolo	38
4.8. Rendimiento del protocolo	40
4.9. Propuesta de protocolo para la síntesis de hidrogel de colágeno y dextrano	40
5. CONCLUSIONES	43
6. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS	44
6.1. Recomendaciones	44
6.2. Trabajos futuros	44
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXO	52

Índice de figuras

2.1. Estructura de los aminoácidos. Fuente propia.	5
2.2. Estructura de las proteínas. Tomado de: [25]	8
2.3. Jerarquía del colágeno desde el nivel de secuencia de aminoácidos hasta la escala de formación de fibras. Tomado de: [34].	9
2.4. Ruta de síntesis del colágeno. Tomado de:[36]	10
2.5. Estructura del colágeno: a) Triple hélice, b) Cadenas α , c) Triplete Gly-X-Y. Tomado de:[42]	11
2.6. Estructura del colágeno tipo I. Tomado de:[50]	12
3.1. Diagrama de flujo de la metodología general del proyecto.	18
3.2. Diagrama de flujo del protocolo de extracción de colágeno a partir de las patas de pollo.	20
3.3. Tratamiento de la piel y hueso de las patas de pollo: a) patas de pollo empleadas en la extracción, b) Trozos de 1x1 cm de piel, c) Lavado de la fuente, d) Macerado.	21
3.4. Diagrama de flujo de la metodología para las pruebas de condiciones realizadas en el protocolo.	23
4.1. Fibra de colágeno producida por las condiciones piel-PBS-0,5:1.	29
4.2. FTIR de colágeno reportado en la literatura. Tomado de: [87].	32
4.3. FTIR de colágeno en condiciones de: a) piel, tripsina y H_2O , AcOH 0,5:1, b) piel, tripsina y PBS, AcOH 0,5:1, C) piel, tripsina y H_2O , AcOH 2:1, d) hueso, tripsina en polvo, AcOH 0,5:1	32
4.4. Formación de fibra de colágeno: primer filtrado (izquierda), tercer filtrado (derecha). Condición de tripsina y H_2O (rojo), condición de tripsina y PBS (azul).	33
4.5. Espectros de colágeno con condición de tripsina y H_2O (rojo), condición de tripsina y PBS (azul). a) Primera formación, b) segunda formación, c) tercera formación de fibra de colágeno.	34
4.6. Colágeno en estado sólido, resultante del proceso de extracción con la condición de tripsina y H_2O	35
4.7. Colágeno en estado sólido, resultante del proceso de extracción con la condición de tripsina y PBS.	35
4.8. FTIR del colágeno resultante del proceso de extracción, para la condición tripsina y H_2O	36
4.9. FTIR del colágeno resultante del proceso de extracción, para la condición tripsina y PBS.	36

4.10. FTIR del colágeno resultante del proceso de extracción (rojo) y del colágeno comercial (negro).	37
4.11. UV-Vis del colágeno resultante del proceso de extracción con la condición tripsina y H ₂ O, disperso en agua (negro) y en PBS (rojo).	38
4.12. UV-Vis del colágeno resultante del proceso de extracción con la condición tripsina y PBS, disperso en PBS.	38
4.13. Réplicas del proceso de extracción para las condiciones de tripsina y H ₂ O, y tripsina y PBS.	39
4.14. Reacciones entre el colágeno, HDI y dextrano para la síntesis del hidrogel. Fuente propia.	42

Índice de tablas

2.1. Símbolo, abreviación y estructura de los 20 aminoácidos esenciales. Tomado de: [20]	6
2.2. Símbolo, abreviación y estructura de los 20 aminoácidos esenciales (continuación).	7
2.3. Clase y distribución de los colágenos I-X. Tomado y adaptado de: [32]	12
2.4. Resumen de procesos enzimáticos reportados en la literatura.	15
3.1. Número de estudios encontrados en las diferentes bases de datos al aplicar las ecuaciones de búsqueda.	19
4.1. Condiciones reportadas en la literatura para la etapa de tratamiento de la fuente y digestión enzimática.	27
4.2. Condiciones reportadas en la literatura para la etapa de solubilización en del colágeno en medio ácido.	28
4.3. Condiciones reportadas en la literatura para la etapa de formación y purificación de la fibra.	28
4.4. Pesos obtenidos de la materia prima durante la etapa de tratamiento.	29
4.5. Resultados de la primera prueba de condiciones para la extracción (18 muestras).	30
4.6. Resultados de la segunda prueba de condiciones para la extracción (5 muestras).	31
4.7. Medición de pesos de las fibras de colágeno obtenidas en la replicación.	39
4.8. Desviación estándar y coeficiente de variación de los pesos obtenidos en las réplicas del protocolo.	39
4.9. Rendimiento del protocolo.	40
4.10. Rendimiento promedio de las réplicas del protocolo.	40
4.11. Resumen de revisión bibliográfica acerca de agentes entrecruzadores en la síntesis de hidrogeles de colágeno.	41

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

En este primer capítulo se presenta la motivación general del trabajo, en la cual se abarcan conceptos teóricos acerca del colágeno, algunos tipos y las diversas aplicaciones que tiene en el campo de la Ingeniería Biomédica, además de los métodos existentes para la extracción a través de fuentes animales. Estos conceptos permiten contextualizar y justificar la investigación realizada en este trabajo a través del planteamiento de sus objetivos, buscando finalmente contribuir con la estandarización de un protocolo de extracción de colágeno, dando paso a la exploración en la síntesis de biomateriales, como los hidrogeles, a base de esta proteína.

1.1 Motivación

La carne de pollo se ha convertido en una fuente de proteína fundamental en la alimentación de los colombianos. Según la Federación Nacional de Avicultores de Colombia (FENAVI), la cifra registrada para el año 2021, en cuanto a la producción anual de pollo, superó el 1.671.581 de toneladas, lo que llevó a alcanzar un consumo anual per cápita de 34,2 kilogramos/habitante [1].

El gran consumo de carne de pollo hace que la industria avícola en Colombia se expanda y año tras año eleve sus cifras de producción y consumo. Es así como, pese a que el auge de esta industria alimentaria resulte en un beneficio hacia consumidores y productores, se genera un gran volumen de subproductos que no generan utilidades, como huesos, sangre, grasa, huevos no eclosionados, pollos desechados, plumas, cabezas y patas, entre otros. Generalmente la cantidad de estos productos derivados se ubican entre el 22 y el 30 % de la producción total [2]. Por lo anterior, se deduce que, en el año 2021, Colombia reportó una producción de hasta 501.474 toneladas de subproductos.

A pesar de que la cantidad de subproductos que resultan de la producción avícola es considerable, los precios de estos resultan muy bajos [3]. Según FENAVI, en promedio, sólo el 10 % de la producción de pollo corresponde a los subproductos que son comestibles, es decir que el porcentaje restante (12 % - 20 %), son desechados como residuos [1]. Sin embargo, la mayoría de los subproductos avícolas generados contienen proteínas, grasas, carbohidratos, buenas cantidades de nutrientes como aminoácidos esenciales, minerales y vitaminas, lo que abre la posibilidad de emplearlos como materia prima en la obtención de otros productos que proporcionen un valor agregado a la industria avícola [4].

Las extremidades del pollo (patas), representan el 5 % del peso del pollo sacrificado, y aunque en Colombia en ocasiones son utilizadas en procesos culinarios y productos gastronómicos

micos, una gran proporción es desechada. Las patas de pollo contienen una gran cantidad de contenido proteico, en el que el colágeno se resalta como una de las proteínas más abundantes [5]. Por lo tanto, una forma de agregar valor a este tipo de subproductos puede resultar al lograr realizar la extracción y purificación del colágeno de las patas de pollo, el cual podría tener aplicación en la industria farmacéutica, biomédica, cosmética o alimentaria [6].

El colágeno es la proteína que se encuentra en mayor proporción en los diferentes tejidos de animales vertebrados, representando entre el 25 % y el 35 % del contenido proteico de todo el cuerpo [7] - [8]. Al menos 28 tipos de colágeno han sido identificados, donde el colágeno más abundante en los seres humanos es el tipo I. El colágeno tipo I está compuesto, en términos de aminoácidos, con un 33 % de glicina y 10 % de prolina, además de 0,5 % de 3-hidroxiprolina, 10 % de 4-hidroxiprolina y 1 % de 5-hidrolisina [9]. Su función principal es ayudar a mantener la integridad estructural de diferentes tejidos presentes en órganos como la piel, huesos, tendones, etc., mediante el ensamblaje de la macromolécula de colágeno en las fibras características responsables de la funcionalidad de cada tejido, aportando firmeza y elasticidad estructural [10]-[11]. Tanto el colágeno I como el III son principales en la piel, debido a que son esenciales para dar fuerza y para mantener la arquitectura de los tejidos que forman este gran órgano [12].

El colágeno tipo I es importante en el campo de la Ingeniería Biomédica, ya que con él se pueden obtener películas delgadas o de forma tridimensional (3D), esponjas, andamios, hidrogeles, entre otros, utilizados para cicatrización de heridas, liberación de fármacos, reparación ósea, injertos vasculares y diversas aplicaciones más [13].

Los hidrogeles a base de colágeno, ampliamente utilizados por su biocompatibilidad y baja citotoxicidad, son redes poliméricas 3D que retienen cantidades de agua y fluidos biológicos, en los que su integridad estructural se mantiene por los enlaces químicos y físicos entre las cadenas poliméricas de esta proteína. El hecho de que el colágeno sea un polímero natural, proporciona al hidrogel ventajas sobre otros biomateriales a base de diversos polímeros, las cuales se asocian a la baja inmunogenicidad y a la gran compatibilidad biológica que tiene esta proteína con los tejidos humanos. También se destaca que el uso del colágeno como polímero base en la síntesis de hidrogeles reduce el riesgo de provocar respuestas inflamatorias y reacciones alérgicas [14].

La extracción de colágeno se puede realizar a través del uso de medios ácidos, como ácido acético, clorhídrico, cítrico o láctico, ya que su solubilidad es mayor en medios ácidos que en medios acuosos. Al resultado de esta extracción se le denomina colágeno soluble en ácido (ASC). Sin embargo, los colágenos provenientes de diversas fuentes animales no logran disolverse completamente en medio ácido, razón por la cual se emplea la ayuda de enzimas como pepsina, tripsina, papaína, y diferentes colagenasas bajo ciertas condiciones de temperatura, pH, entre otras. Estos métodos son conocidos como métodos de extracción enzimática [15].

Las aplicaciones de colágeno extraído por métodos enzimáticos aumentan en las industrias farmacéuticas y alimentarias, ya que emplear la ayuda de enzimas en el proceso de extracción en medio ácido permite aumentar la solubilización del colágeno y, por ende, se mejora la eficiencia del proceso. Otras ventajas importantes de este método se relacionan con el desarrollo de la digestión enzimática, ya que se puede reducir la antigenicidad del colágeno y su proceso no interfiere con su estructura de triple hélice [15].

La tripsina, enzima perteneciente a la familia de serina proteinasas, hidroliza específicamente los enlaces peptídicos y éster que se forman en el lado carboxilo de los residuos de arginina y lisina. Igualmente, esta enzima actúa en procesos biológicos como la digestión de

proteínas, la activación de zimógenos de quimotripsina y otras enzimas [16]. De acuerdo con la viabilidad de emplear como fuente las patas de pollo, diversos estudios reportan el uso de tripsina para la digestión enzimática del colágeno presente en este tipo de fuente, en órganos como la piel y los huesos. El colágeno extraído por esta enzima es aplicado principalmente a la construcción de andamios, en combinación con otros polímeros como el quitosano [17].

Pese a que la tripsina es una enzima utilizada en la extracción de colágeno, la información presente en los estudios, relacionada a su uso y a los parámetros experimentales asociados al proceso de extracción de colágeno, es limitada. Es así como este proyecto tiene la finalidad de estandarizar un protocolo de extracción de colágeno, empleando como fuente las patas de pollo (tanto piel como huesos y garra), haciendo uso de la acción enzimática de la tripsina. Finalmente, se analiza la viabilidad del colágeno obtenido para el desarrollo de hidrogeles, a partir de una revisión literaria que permita establecer la propuesta de un protocolo para su síntesis.

1.2 Objetivos

1.2.1. General

Desarrollar un protocolo para la extracción de colágeno a partir de subproductos avícolas, con potencial aplicación de ser un polímero base en la síntesis de un hidrogel.

1.2.2. Específicos

1. Realizar una revisión literaria acerca de las diferentes fuentes animales y procedimientos implicados en la extracción de colágeno tipo I.
2. Estandarizar un protocolo de extracción enzimática del colágeno, a partir de las extremidades posteriores del pollo.
3. Caracterizar estructuralmente el colágeno obtenido.
4. Proponer, a partir de una búsqueda bibliográfica, un protocolo para la síntesis de un hidrogel a base de colágeno.

1.3 Contribuciones

Este trabajo plantea un protocolo estandarizado para extraer colágeno a partir de subproductos avícolas como las patas de pollo. Teniendo como punto de partida la información de los protocolos encontrados en la literatura, se encuentra una ruta experimental para el proceso de extracción. Por medio de la caracterización del colágeno y las cantidades de fibra obtenidas en la diferentes réplicas del procedimiento, se comprueba el éxito del protocolo y la reproducibilidad del mismo.

1.4 Organización del documento

El presente documento se divide en seis capítulos principales. El primero abarca la motivación fundamental del proyecto, que va contextualizada previamente por medio del planteamiento del problema. También se presentan los objetivos del trabajo, sus contribuciones y

la organización del escrito. El segundo capítulo es el estado del arte, el cual comprende los conceptos teóricos necesarios que para comprender la temática del proyecto. De manera general, en este capítulo se describe la composición y estructura de las proteínas, especificando la información que respecta al colágeno, los tipos de colágeno y su ruta de síntesis. También se presentan las distintas fuentes animales para la obtención del colágeno y los métodos existentes. Además, se mencionan las generalidades de los biomateriales desarrollados hasta el momento a base de colágeno, como los hidrogeles.

En el tercer capítulo se encuentra la metodología del trabajo, la cual comprende cuatro fases principales; revisión de protocolos de extracción de colágeno a partir de patas de pollo, estandarización de un protocolo a partir del efecto enzimático de la tripsina en la fuente escogida, caracterización del colágeno obtenido y por último, una revisión bibliográfica sobre protocolos de síntesis de hidrogeles de colágeno y dextrano.

El cuarto capítulo muestra los resultados obtenidos con su respectivo análisis. Los datos importantes que se reportan en este capítulo involucran las pruebas de condiciones, la caracterización estructural del colágeno y la reproducibilidad del protocolo estandarizado. El quinto capítulo presenta las conclusiones obtenidas luego del análisis de los resultados y, por último, en el capítulo seis se reportan las recomendaciones y trabajos futuros que pueden desarrollarse a partir de la finalización de este proyecto.

Capítulo 2

ESTADO DEL ARTE

Este capítulo proporciona una discusión teórica acerca de las bases esenciales para comprender las estructuras de las proteínas y, por ende, introducir al análisis de la triple hélice del colágeno. También se describen las diferentes fuentes y métodos encontrados en la literatura para la extracción de esta proteína, y su posterior aplicación en la síntesis de biomateriales a base de colágeno.

2.1 Aminoácidos

La unidad básica, el cimiento de la formación de proteínas como el colágeno, son los aminoácidos. Como su nombre lo indica, estas moléculas orgánicas contienen un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$). En la figura 2.1 se muestra la estructura básica de todos los aminoácidos, en la cual se ubica al carbono α como el sitio de unión del hidrógeno, grupo carboxilo α , grupo amina α y de una cadena lateral o grupo R que determina sus propiedades [18].

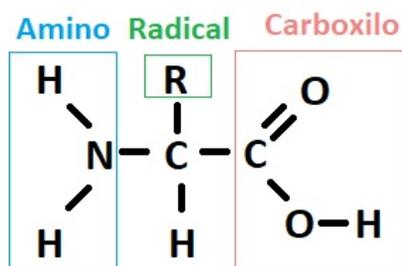


Figura 2.1: Estructura de los aminoácidos. Fuente propia.

Aunque se han identificado una gran cantidad de aminoácidos, sólo 20 son considerados aminoácidos estándar o esenciales por su presencia en casi todas las proteínas [19]. La estructura de estos 20 aminoácidos, junto con su símbolo y abreviación, pueden observarse en la tabla 2.2.

Tabla 2.1: Símbolo, abreviación y estructura de los 20 aminoácidos esenciales. Tomado de: [20]

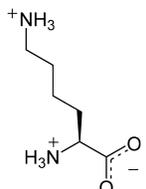
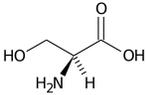
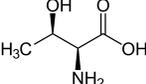
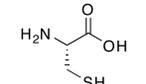
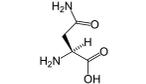
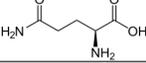
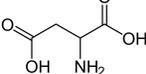
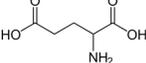
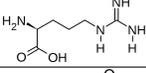
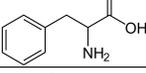
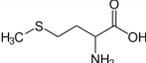
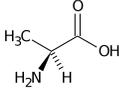
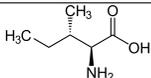
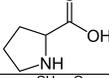
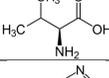
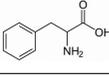
Nombre	Símbolo	Abreviación	Estructura
Lisina	K	Lys	
Serina	S	Ser	
Treonina	T	Thr	
Cisteína	C	Cys	
Asparagina	N	Asn	
Glutamina	Q	Gln	
Ácido aspártico	D	Asp	
Ácido glutámico	E	Glu	
Arginina	R	Arg	
Fenilalanina	F	Phe	
Triptófano	W	Trp	
Metionina	M	Met	

Tabla 2.2: Símbolo, abreviación y estructura de los 20 aminoácidos esenciales (continuación).

Nombre	Símbolo	Abreviación	Estructura
Alanina	A	Ala	
Glicina	G	Gly	
Isoleucina	I	Ile	
Leucina	L	Leu	
Prolina	P	Pro	
Valina	V	Val	
Histidina	H	His	
Tirosina	Y	Tyr	

Durante la síntesis de proteínas, los aminoácidos con sus cadenas laterales amino y carboxilo, por acción del ARN mensajero, se condensan químicamente en el ribosoma, perdiendo una molécula de agua y formando un enlace que los une covalentemente denominado enlace peptídico. De esta manera los aminoácidos se unen formando largas cadenas que reciben el nombre de polipéptidos [21].

La secuencia de los polipéptidos es denominada estructura primaria y su importancia radica en determinar los órdenes superiores de la estructura de una proteína; es decir que a este tipo de estructura se le atribuye la unificación estructural que poseen las proteínas [22]. Sus dos extremos son conocidos como terminal amino (terminal N) y terminal carboxilo (terminal C), y en cuanto a los 20 aminoácidos que la componen, estos se pueden unir varias veces en el mismo polipéptido mediante enlaces covalentes para crear una secuencia de estructura primaria específica para cada proteína [23].

2.2 Proteínas

Como se mencionó en la sección anterior, la estructura central de las proteínas es la estructura primaria, sin embargo, esta estructura puede adquirir distintas conformaciones en el momento de su formación, tal como se indica en la figura 2.2. Estas conformaciones estructurales se dan por enlaces como puentes disulfuro, de hidrógeno y salinos, que son interacciones iónicas que se dan entre residuos cargados, y también por interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas que implican enrollamiento, doblamiento o plegamiento de la estructura primaria, resultando en la denominada estructura secundaria, cuyas conformaciones más comunes son

la hélice α y la hoja plegada β [24].

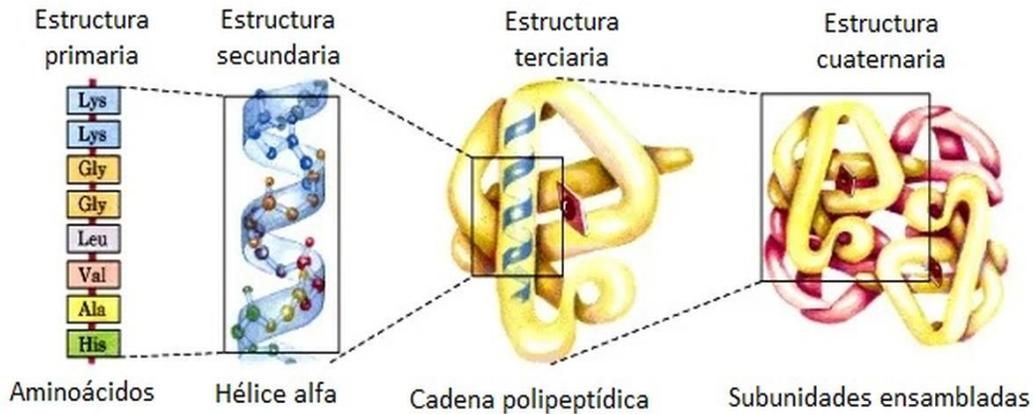


Figura 2.2: Estructura de las proteínas. Tomado de: [25]

En la hélice α , la ramificación de aminoácidos se pliega a la derecha formando una estructura helicoidal. El giro se denomina “diestro” o dextrógiro y su estructura se mantiene por puentes de hidrógeno entre los enlaces peptídicos. Los enlaces peptídicos C-O se unen por hidrógeno a los enlaces N-H cada cuatro residuos, mientras que las cadenas laterales o grupos R de los aminoácidos apuntan fuera de la hélice. La estructura hoja plegada β es más extendida y se mantiene por puentes de hidrógeno entre los grupos C-O y N-H de los enlaces peptídicos consecutivos [9].

El siguiente nivel de complejidad en la estructura de una proteína es la estructura terciaria. Esta estructura se refiere al plegamiento terciario que inicia mientras la proteína se forma en su secuencia primaria y, generalmente, se estabilizan mediante interacciones de enlace iónico e interacciones hidrofóbicas entre cadenas laterales de aminoácidos no polares [26] - [27]. La última estructura de las proteínas se denomina estructura cuaternaria. Esta corresponde a un arreglo de varias cadenas de proteínas, donde cada una de ellas posee una estructura propia primaria, secundaria y terciaria. Esta estructura compleja se mantiene unida por fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno entre los grupos R no polares [28].

Debido a la variedad de formas y tamaños que pueden tener las proteínas, una forma de clasificarlas es en tres grandes grupos; proteínas fibrosas, de membrana y globulares. En las proteínas fibrosas la estructura predominante es la secundaria y su función principal es la de brindar apoyo estructural en el cuerpo, incluyendo aquellas que están involucradas en el movimiento. Una característica importante de estas proteínas con forma alargada es que no se disuelven en agua. Como ejemplo de ellas está el colágeno, el cual es el componente principal del tejido conjuntivo [29].

Las proteínas de membrana poseen diversas dimensiones y morfologías, y se encuentran restringidas a la membrana bicapa de fosfolípidos presente en la célula. La función principal de este tipo de proteínas es la de garantizar el transporte de iones y moléculas a través de la membrana. Por último, se encuentran las proteínas globulares, en las cuales se encuentra una estructura compacta única y cuya secuencia no es repetitiva. En estas proteínas los grupos R de aminoácidos no polares se agrupan para formar un núcleo hidrofóbico en el interior de las proteínas, a la vez que los grupos R polares hidrofílicos permanecen en el exterior de la

estructura [30].

2.3 Colágeno

El colágeno se considera el principal tipo de molécula fibrilar, formado por tres polipéptidos helicoidales zurdos, donde las cadenas α son ricas en residuos de prolina e hidroxiprolina [31]. En la mayoría de los tejidos y órganos de soporte como la piel, los tendones, los huesos, entre otros tejidos de especies vertebradas, la abundante presencia de colágeno atribuye la función de provisión de resistencia a la tracción, al estiramiento y al desgarrar. La característica principal de esta proteína es su notable resistencia, tanto así que una fibra de colágeno de 1 mm de diámetro podría soportar una carga de 10 a 40 kg [32]. Las propiedades estructurales y la forma de una macromolécula de colágeno se determinan de acuerdo con el o los dominios que posea. Dependiendo del tipo de colágeno, el dominio de triple hélice podría llegar a comprender hasta el 95 % de la macromolécula [33].

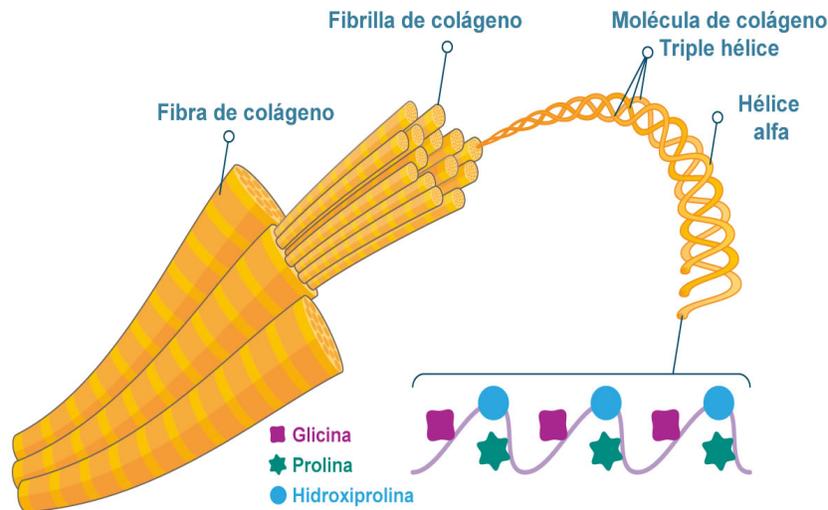


Figura 2.3: Jerarquía del colágeno desde el nivel de secuencia de aminoácidos hasta la escala de formación de fibras. Tomado de: [34].

Para entender la jerarquía de la estructura del colágeno (figura 2.3), es esencial conocer la ruta de síntesis de esta proteína (figura 2.4), la cual inicia en el núcleo de células del tejido conjuntivo, donde se genera la molécula del ARN mensajero (ARNm) a partir un gen de colágeno. El proceso de traducción del ARNm hace que se formen cadenas polipeptídicas, es decir, que se generen enlaces covalentes entre los aminoácidos para formar una estructura primaria. Posteriormente las cadenas se organizan en una triple hélice a la que se le denomina procolágeno, cuya estructura corresponde a una terciaria [35].

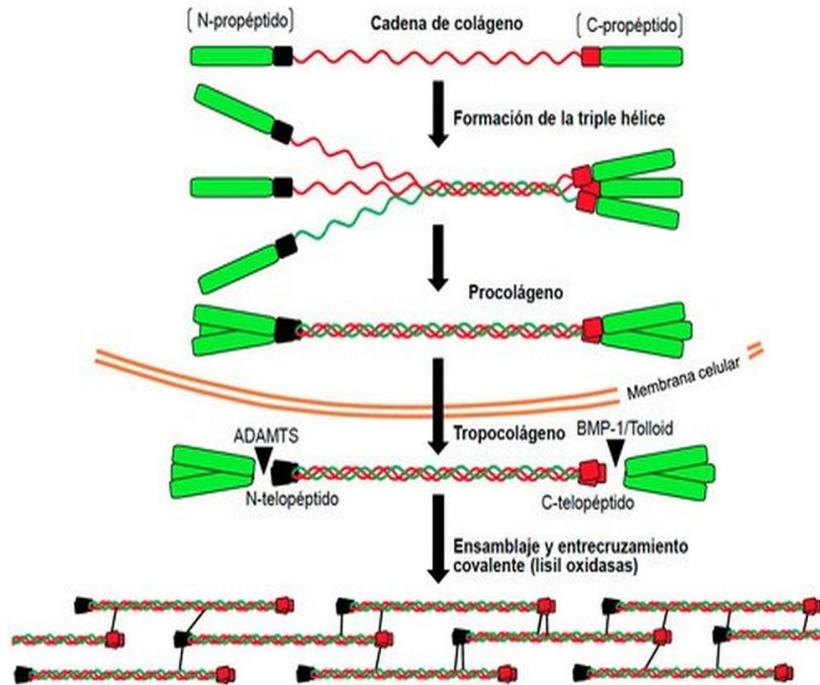


Figura 2.4: Ruta de síntesis del colágeno. Tomado de:[36]

Las moléculas de procolágeno son enviadas al aparato de Golgi, donde se empaqueta en vesículas secretoras y se expulsan de la célula. En el proceso de exocitosis, los telopéptidos que se ubican al final de la molécula de procolágeno se hidrolizan por medio de proteasas específicas, lo que da como resultado la formación de la molécula de tropocolágeno [35]. Esta molécula es la unidad de construcción monomérica a partir de la cual se obtiene la fibra de colágeno [37].

La molécula de tropocolágeno posee un diámetro de 1,5 nm, una longitud aproximada de 300 nm y su estructura está definida por tres cadenas peptídicas que se unen en espiral, a lo largo de la triple hélice [38]. Esta triple hélice, como se observa en la figura 2.4, consta de tres cadenas α helicoidales (α_1 , α_2 y α_3) unidas, las cuales se componen de una secuencia de aminoácidos en forma de hélice poliprolina II [33]. Estas tres cadenas se enrollan entre sí de forma dextrógira por medio de enlaces de hidrógeno intermoleculares, transversales al eje helicoidal [39]. La fibrilla de colágeno se forma a partir de la unión de las moléculas de tropocolágeno por entrecruzamiento que a su vez forman, finalmente, la fibra de colágeno [35].

Para que se ensamblen las cadenas y formen la estructura de triple hélice característica del colágeno, estas deben estar escalonadas por un residuo entre ellas, además, todos los residuos terceros de las cadenas deben estar cerca del eje helicoidal común. Es por esto por lo que las cadenas se componen por tripletes repetitivos Gly-X-Y como se observa en la figura 2.5, siendo la glicina quien debe tomar la posición del tercer residuo [39].

En las posiciones X y Y del triplete Gly-X-Y puede ir cualquier aminoácido, sin embargo, por lo general estas posiciones las ocupan la prolina (Pro) y la hidroxiprolina (Hyp), respectivamente. Ambos aminoácidos estabilizan la conformación poliprolina II de las cadenas

peptídicas, sin embargo, la Hyp es quien aporta una mayor estabilidad desde su posición Y [40]. Es así como la presencia de grandes cantidades de Hyp en algunos tipos de colágeno incrementa su estabilidad conformacional [41].

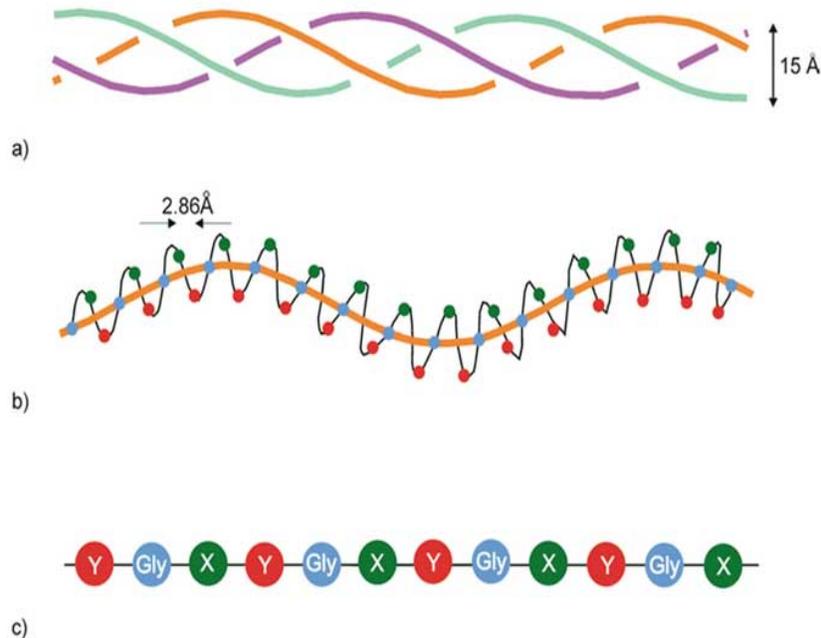


Figura 2.5: Estructura del colágeno: a) Triple hélice, b) Cadenas α , c) Triplete Gly-X-Y. Tomado de:[42]

2.3.1. Tipos de colágeno

Se conocen al menos 28 tipos de colágeno designados con números romanos, cuya composición ronda alrededor de 46 cadenas polipeptídicas diferentes [43]. En esta familia, todos sus miembros se caracterizan por contener el triplete Gly-X-Y, rico en prolina, brindando a su estructura la triple hélice característica de los colágenos. La extensa familia del colágeno es parte fundamental, en términos estructurales, de todos los tejidos conjuntivos. Estos colágenos son también partícipes de mantener la integridad estructural y dar estabilidad a tejidos como el intersticial, en prácticamente todos los órganos parenquimatosos [44].

De acuerdo con la estructura polimérica de cada tipo de colágeno o por medio de otras características, la familia de colágeno se puede dividir en pequeños grupos: formadores de fibrillas, asociados a fibrillas con hélices interrumpidas, formadores de redes hexagonales, asociados a las membranas basales, formador de filamentos en forma de perla, formador de fibrillas de anclaje y, por último, los colágenos con dominio transmembrana [45] - [46]. En la tabla 2.3 se presentan los 10 primeros tipos de colágeno, con su clasificación y distribución en los tejidos. De acuerdo con su estructura y por ende con su clasificación, los colágenos actuarán adaptando el tejido a numerosas funciones fisiológicas y mecánicas en el cuerpo [47].

Tabla 2.3: Clase y distribución de los colágenos I-X. Tomado y adaptado de: [32]

Tipo	Clase	Distribución
I	Fibrilar	Abundante y generalizado en piel, huesos, tendones y ligamentos
II	Fibrilar	Cartílago, vítreo
III	Fibrilar	Piel, vasos sanguíneos, intestino
IV	Redes	Generalizado en huesos, dermis, cornea y placenta
V	Fibrilar	Dermis, vejiga
VI	Redes	Generalizado en dermis, cerebro, corazón y riñones
VII	Fibrillas de anclaje	Cartílago, córnea, vítrio
VIII	Redes	Cartílago
IX	Asociados a fibrillas con hélices interrumpidas	Cartílago, disco intervertebral
X	Redes	Dermis, tendón

2.3.2. Colágeno tipo I

El tipo de colágeno más abundante, cuya expresión ocurre en la gran mayoría de tejidos conectivos, es el colágeno tipo I. Es también un componente importante del tejido intersticial y, estructuralmente, la principal proteína de órganos y tejidos como los huesos, tendones, piel y córnea, entre los que se destaca una mayor proporción en órganos como la piel y los huesos [46].

En la figura 2.6 se observa la estructura molecular del colágeno tipo I. La macromolécula de este tipo de colágeno contiene aproximadamente 1000 aminoácidos y posee una longitud que alcanza los 300 nm junto con un espesor de aproximadamente 1,5 nm [48]. Se compone de dos cadenas α_1 y una α_2 y sus dominios son de hélice no triple (N-telopéptido o también conocido como entrecruzamiento de colágeno amino terminal), de hélice triple central y de no helicoidal triple (C-telopéptido o también conocido como entrecruzamiento de colágeno carboxi-terminal) [49].

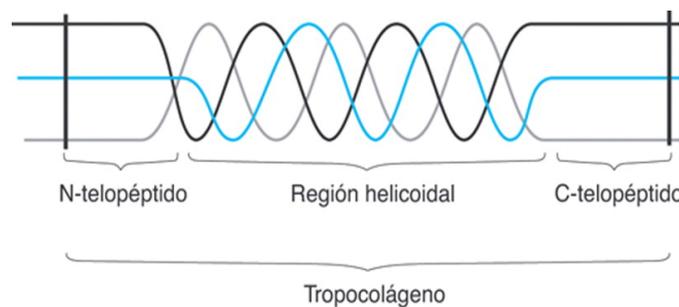


Figura 2.6: Estructura del colágeno tipo I. Tomado de:[50]

2.4 Principales fuentes animales de colágeno tipo I

El colágeno tipo I puede extraerse de diferentes fuentes animales como el cartílago, la piel, los tendones, huesos, entre otros, de especies bovinas como vacas y toros, de avícolas como pollos y de marinas como la tilapia y el atún, según lo reportado en diferentes estudios [51] - [52].

2.4.1. Fuente bovina y porcina

Las fuentes bovinas y porcinas son las fuentes animales tradicionales de colágeno. A lo largo de los años se han propuesto y desarrollado diversos protocolos de extracción de colágeno a partir de diferentes partes animales. La piel de animales como el toro, la vaca, la ternera y el buey ha sido materia prima de diversos estudios que tienen como fin implementar un método de extracción de colágeno. A partir de este tipo de fuente se han logrado desarrollar distintos protocolos de extracción que se complementan con el fácil acceso a la fuente [7] - [53].

Otro tipo de fuente natural utilizada son los tejidos de pericardio bovino. Mediante el tejido recogido de animales machos en edad de sacrificio, se extrae el colágeno y se caracteriza. Los resultados de utilizar este tipo de fuente atribuyen propiedades morfológicas propias del colágeno tipo I al material extraído, además de un contenido de alta pureza que podría transferirse a escala industrial [54].

Pese al logro de extracción del colágeno tipo I derivado de las fuentes bovinas, se reporta que este carece de aminoácidos esenciales, lo que lo hace una fuente incompleta [53]-[55]. Otra desventaja importante se asocia a los brotes de enfermedades como la fiebre aftosa, la enfermedad de las vacas locas, entre otras, que pueden ser provocadas por el uso de este colágeno, implicando amenazas para los humanos. También se presenta una desventaja al tener en cuenta la población humana que es alérgica a productos que provienen de este tipo de fuentes, ya que se generarían respuestas biológicas no deseadas, lo que dificultaría la aplicación del colágeno extraído [56] - [57].

En el caso de las fuentes porcinas, la piel de cerdo fue utilizada para extraer colágeno tipo I y aplicarlo a la creación de biopolímeros funcionales [58]. Otro tipo de fuente empleada es la placenta porcina, destinada a la producción de hidrolizados de colágeno [59]. De la misma manera que con las fuentes bovinas, la fuente porcina presenta riesgo de contaminación como es el caso de la zoonosis reversa, sin embargo, no tiende a generar respuesta alérgica ya que el colágeno porcino es similar al colágeno humano [56]-[60]-[61].

2.4.2. Fuente marina

El interés por extraer colágeno de fuentes marinas radica en la diversidad de organismos que habitan los océanos. Además, se ha reportado que colágeno derivado de los diferentes animales marinos resulta similar al colágeno convencional que se extrae de fuentes bovinas o porcinas, en relación con la composición de aminoácidos y biocompatibilidad [53].

Otra razón de peso por la que la investigación hacia fuentes marinas crece es por los posibles efectos adversos que producen los colágenos extraídos de fuentes terrestres. Es así como hasta el momento diversas especies marinas han sido estudiadas como alternativas a las fuentes tradicionales [62].

A pesar de que las especies marinas resultan ser una gran alternativa, el colágeno tipo I que se obtiene manifiesta un nivel bajo de temperatura de desnaturalización, lo que exige

establecer total control de la temperatura sobre la producción de este colágeno [53]. Sin embargo, la temperatura de desnaturalización permite contemplar la producción de nuevas formas de colágeno o estructuras derivadas del mismo, como la gelatina [62].

2.4.3. Subproductos avícolas

Los desechos que resultan de la producción avícola y que luego son descartados por las industrias alimentarias reciben el nombre de subproductos. Huesos, plumas, vísceras, patas, entre otros, hacen parte de los subproductos que se generan día a día con la producción cárnica del pollo, pato, pavo, entre otros. Todos ellos son una fuente prometedora de extracción de colágeno, que no sólo puede otorgar un valor agregado a estos desechos, si no que eliminaría problemas relacionados a la contaminación ambiental [63].

Los subproductos del pollo son la materia prima más utilizada dentro de las fuentes avícolas para el proceso de extracción de colágeno. Dentro de estos subproductos, las patas de pollo se destacan por su alto contenido de colágeno tipo I [55]. Es por lo anterior que diversos estudios han implementados protocolos de extracción de colágeno a partir de las patas de pollo, en órganos específicos como la piel [52] y los huesos [17].

Los resultados de caracterización que presentan los colágenos extraídos a partir de las patas de pollo resultan favorables pues revelan características únicas del colágeno y además proporcionan al producto extraído una baja antigenicidad, sugiriendo que esta fuente puede ser una alternativa de obtención de colágeno de alta calidad [64]. Sin embargo, es una fuente poco explorada, por lo tanto, la información relacionada que se presenta es relativamente limitada.

2.5 Métodos de extracción de colágeno

A partir de las diferentes fuentes animales se emplean diversos métodos de extracción en los que se somete el precursor a la acción de enzimas, ácidos o sustancias alcalinas. A continuación se presenta una descripción de los métodos más comunes reportados para la extracción de colágeno.

2.5.1. Método en medio ácido

En la extracción del colágeno soluble en ácido se hace uso de ácidos orgánicos como el ácido acético (AcOH), ácido cítrico, ácido láctico, entre otros, e igualmente de ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico [65].

A grandes rasgos la metodología que se emplea inicia con la exposición de la fuente a una concentración de ácido durante un determinado tiempo. El papel que tiene esta solución ácida es aumentar la repulsión entre las moléculas de tropocolágeno que son capaces de inducir la solubilización de las moléculas de colágeno [28]. Posteriormente, se forma la fibra con precipitación salina y por último se realiza un proceso de purificación [66].

2.5.2. Método alcalino

El método alcalino es otro de los métodos con los cuales se puede extraer el colágeno. Este método es utilizado en diversas fuentes, especialmente las correspondientes a piel de bovinos o porcinos [67], ya que son materiales de gran grosor. La base del proceso es el tratamiento de

la fuente con una solución básica, que comúnmente es hidróxido de sodio (NaOH), durante un largo tiempo, ya que se necesita una penetración más agresiva de estos agentes en la fuente. Luego del pretratamiento de la fuente se realiza la formación de la fibra de colágeno y su respectiva purificación [65].

2.5.3. Método enzimático

El método enzimático es uno de los métodos más empleados debido a la diversidad de enzimas que pueden mejorar el rendimiento de la extracción de colágeno soluble en ácido [28]. Este método es utilizado ampliamente, especialmente porque se obtiene el colágeno biológicamente activo, sin tener que alterar los aminoácidos que lo componen. Otras de sus ventajas son, por ejemplo, el bajo consumo de energía, condiciones de reacción básicas y que no produce corrosión en los equipos que se emplean. Sin embargo, también posee desventajas como que el tiempo de reacción es largo y el hecho de que no se realiza una hidrólisis completa. Las enzimas más utilizadas en este proceso de retención de la triple hélice de colágeno son la pepsina, tripsina, papaína y alcalasa [67] - [68].

Generalmente, en este método, la fuente escogida se mezcla con la enzima y se realiza la digestión enzimática. Posteriormente, en el proceso de solubilización del colágeno, se añade AcOH a las muestras y se incuba durante determinado tiempo. Por último, la mezcla se filtra y la fibra se forma para ser dializada y así obtener un colágeno purificado [67] - [65]. En la tabla ?? se resumen los procedimientos de extracción utilizados por diversos estudios por medio de diferentes enzimas.

Tabla 2.4: Resumen de procesos enzimáticos reportados en la literatura.

Autores	Enzima	Proceso de extracción
Kim HW et al., 2016	Pepsina	La materia prima se trata con una solución de AcOH y pepsina, y se centrifuga. La pepsina se inactiva por medio de la adición de NaOH al sobrenadante. La fibra se forma por precipitación salina y el colágeno se disuelve en AcOH. Finalmente, el colágeno obtenido se liofiliza y se pulveriza.
Hashim et al., 2014	Papaína	La solución con las muestras se centrifuga, se precipita y se vuelve a centrifugar. Por último, el colágeno se dializa y se liofiliza, para luego ser caracterizado.
Agrippine et al., 2019	Tripsina	La materia prima se mezcla con tripsina en polvo y se incuba a 37 °C. Se añade AcOH, almacenando las muestras a 4 °C. Las muestras se centrifugan dos veces, manteniendo el sobrenadante en cada centrifugación, el cual se precipita con una solución salina. Las fibras de colágeno formadas se dializan y el resultado se centrifuga.

La enzima más empleada en este método es la pepsina, por lo que la información relacionada a las condiciones de extracción a partir de esta enzima es abundante en las diferentes fuentes de búsqueda. Kim HW et al., 2016, desarrollan un protocolo de extracción de colágeno a partir de fuentes derivadas de las patas de patos como la piel, huesos y tendones. La caracterización del colágeno mediante electroforesis en gel, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (SEM), demuestra que el colágeno obtenido se puede caracterizar como una mezcla de colágeno tipo I y II, donde se justifica la eficacia de la digestión con pepsina [69].

Hashim et al., 2014, emplearon la papaína en el proceso de extracción. Al igual que en el proceso con pepsina, las muestras se suspendieron en una solución de AcOH con papaína. La caracterización se realiza por medio de electroforesis en gel, FTIR y calorimetría diferencial de barrido (DSC), además de una comparación con los colágenos comerciales. Esta caracterización demuestra la similitud en composición y peso molecular entre el colágeno de patas de pollo y los colágenos comerciales, destacando la efectividad de la digestión con papaína [70].

Pocos estudios como el de Agrippine et al., 2019, reportan el uso de la tripsina para la extracción de colágeno a partir de las patas de pollo [17]. Debido a que el estudio está enfocado a la fabricación de andamios a base de colágeno, no se reporta una fase de caracterización del colágeno extraído.

2.6 Biomateriales a base de colágeno

En el campo de la Ingeniería Biomédica, el colágeno posee numerosas aplicaciones, ya que presenta una alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, exhibe baja inmunogenicidad y toxicidad. Todas estas características le atribuyen elegibilidad a la hora de ser utilizado como unidad de construcción en la síntesis de diversos materiales para aplicaciones biomédicas [71] - [67].

En la ingeniería de tejidos, el colágeno se involucra con la reparación de diferentes tejidos como la piel, huesos, cartílago, tejidos vasculares, entre otros. La fabricación de biomateriales de colágeno para restaurar la funcionalidad de tejidos ha provocado su gran campo de acción en el campo de la ingeniería de tejidos que sigue creciendo intensivamente [72]. En esta sección se comentan los dos tipos de biomateriales a base de colágeno más comunes que son empleados en la ingeniería de tejidos; los andamios y los hidrogeles.

2.6.1. Andamios a base de colágeno

Los andamios de colágeno son parte de las estructuras más comunes en este campo. Al ser el colágeno un polímero natural, el crecimiento celular se ve beneficiado, dotando de méritos al andamio como el ser una buena plataforma para la reparación y reconstrucción de tejidos [73]. La estructura que poseen los andamios es una cualidad importante en cuanto a sus propiedades mecánicas. Además, su estructura también regula la unión, proliferación y diferenciación de la célula [74].

Los andamios pueden prepararse por diferentes métodos: por liofilización, impresión 3D, separación de fases inducida térmicamente, electrohilado, entre otros [75]. El tamaño del poro de los andamios define su aplicación, por lo tanto, debe haber un control a la hora de la síntesis. Este control puede realizarse por métodos como liofilización, electrohilado o fundición con disolventes [74].

A pesar de que el andamio de colágeno posea excelentes propiedades biológicas, las propiedades mecánicas y su estabilidad estructural no son las adecuadas para su aplicación en algunos tejidos como cartílago, hueso, entre otros [72]. Para poder mejorar estas propiedades mecánicas se deben sacrificar las buenas propiedades biológicas, ya que las estrategias existentes implican modificaciones químicas que pueden proporcionarle toxicidad al andamio, o mezclas con otros polímeros sintéticos que introducen efectos negativos en la respuesta celular [73].

2.6.2. Hidrogeles a base de colágeno

Otro tipo de estructuras que se destacan por su utilidad en la reparación de tejidos, en el transporte de fármacos, entre otras aplicaciones, son los hidrogeles de colágeno. Este tipo de biomateriales están conformados por redes tridimensionales de cadenas poliméricas obtenidas por el entrecruzamiento físico o químico del colágeno. El entrecruzamiento del colágeno se da gracias a la formación de enlaces iónicos o covalentes entre moléculas y fibrillas por medio de compuestos como los aldehídos, diisocianatos, polifenólicos, entre otros, o por procedimientos de reticulación física como el secado por calentamiento [76].

Gracias a interacciones electrostáticas y enlaces hidrofílicos, los hidrogeles mantienen su estructura. Estos tienen la capacidad de hidratarse fácilmente por remojo o hinchamiento con líquidos, y es aquí donde se identifica una de sus mayores cualidades; conservan su estructura durante y después del remojo, ya que se produce un intercambio de iones y metabolitos con el medio, de manera isotrópica [67] - [17].

Los hidrogeles de colágeno tienen diversas aplicaciones gracias a su estructura y funcionalidad. Por ejemplo, para regenerar y cicatrizar heridas cutáneas, estos pueden liberar cantidades adecuadas de fármacos, ajustando sus propiedades de degradación para que influya en el crecimiento celular, la regeneración y cicatrización de la piel, la liberación de las moléculas bioactivas y en el control hemostático [76].

Capítulo 3

METODOLOGÍA

Teniendo en cuenta los objetivos específicos trazados para este trabajo, la metodología para su correspondiente desarrollo se divide en 4 fases principales, tal como se puede observar en el diagrama de flujo de la figura 3.1. La primera de las fases corresponde a una revisión bibliográfica en la que se espera obtener la información necesaria para que posteriormente se logre plantear un protocolo de extracción de colágeno a partir de las patas de pollo. Siguiendo este planteamiento, el protocolo se pone a prueba y se estandariza mediante el proceso de extracción, constatando su funcionamiento a través de la caracterización del colágeno obtenido. Finalmente, como aplicación del colágeno que se extrae, se realiza una revisión bibliográfica con la cual se busca proponer un protocolo para la síntesis de un hidrogel de colágeno en combinación con otro material polimérico.

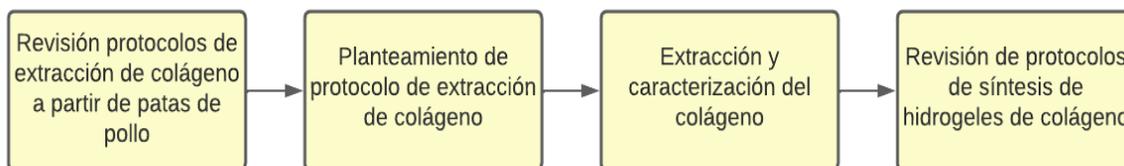


Figura 3.1: Diagrama de flujo de la metodología general del proyecto.

3.1 Revisión bibliográfica de protocolos de extracción de colágeno con tripsina

La investigación de esta revisión parte de los diferentes métodos de extracción del colágeno tipo I a partir de las patas de pollo que se describen en el capítulo anterior. A partir de la literatura se concluye que el método más empleado corresponde a la extracción enzimática por el efecto de retención que tiene sobre la estructura del colágeno. Es así como la búsqueda se reduce a un primer filtro, que corresponde a protocolos que hagan uso del método enzimático. En vista de que la información de los estudios que reportan el uso de tripsina es escasa, se plantea partir de esta necesidad para lograr estandarizar un protocolo de extracción enzimática de colágeno utilizando tripsina. Por lo tanto, el segundo filtro se realizó teniendo en cuenta los estudios que emplearan esta enzima.

Posterior al filtrado, se empleó la técnica PICO, con el fin de identificar factores impor-

tantes en la revisión como el problema de interés, intervención, comparación y resultados. Por medio de esta técnica se determinó que el problema de interés es la extracción de colágeno tipo I por métodos enzimáticos, con la tripsina como enzima y las patas de pollo como fuente de colágeno. Para esta revisión bibliográfica se plantearon criterios de inclusión y exclusión, que permiten identificar los artículos objetivo de los que no proporcionan información relevante.

Criterios de inclusión:

- Estudios relacionados a la extracción de colágeno por tripsina.
- Estudios relacionados a la extracción enzimática con tripsina a partir de patas de pollo
- Estudios relacionados al efecto de la tripsina en el colágeno animal.
- Idioma: en inglés y español.
- Fecha de publicación: 2001-2022.

Criterios de exclusión:

- Tesis.
- Estudios relacionados a la extracción enzimática del colágeno por otro tipo de enzimas.
- Estudios que no detallen el proceso de extracción del colágeno.

A partir de los criterios de inclusión y exclusión, se crearon cuatro ecuaciones de búsqueda, empleadas en Pubmed, Scopus y Google Académico. Ecuaciones de búsqueda:

1. Collagen extraction AND Trypsin digestion AND NOT Pepsin
2. Collagen extraction AND Chicken feet AND Trypsin
3. Enzymatic extraction AND Collagen AND Trypsin AND Chicken feet
4. Trypsin soluble collagen NOT Pepsin

En la tabla 3.1 se observa la cantidad de estudios que se encontraron en la búsqueda con cada ecuación, aplicando criterios de idioma y de fecha de publicación. En total 186 artículos fueron encontrados, de los cuales sólo 20 se seleccionaron de acuerdo con la lectura del título y del resumen. Los 166 restantes no cumplían con los criterios de inclusión o se encontraban repetidos. Aplicando los criterios más a profundidad en los 20 estudios, sólo la mitad se seleccionaron pues mencionaban procesos detallados de la extracción del colágeno con tripsina o efectos de esta enzima en el colágeno.

Tabla 3.1: Número de estudios encontrados en las diferentes bases de datos al aplicar las ecuaciones de búsqueda.

Base de datos	Ecuación 1	Ecuación 2	Ecuación 3	Ecuación 4
Pubmed	41	0	0	42
Scopus	16	0	0	0
Google Académico	32	9	4	42
Total	186			

3.2 Estandarización del protocolo de extracción de colágeno

El planteamiento del protocolo de extracción de colágeno a partir de las patas de pollo se realizó de acuerdo con la información de los estudios encontrados en la sección anterior, con algunas modificaciones resultantes de las diferentes pruebas de condiciones que permitieron su estandarización.

3.2.1. Protocolo de extracción

Inicialmente, se decide evaluar dos tipos de fuentes para la extracción, ambas derivadas de las patas de pollo, como lo son la piel y los huesos, con el objetivo de identificar la fuente que genera una mayor producción de colágeno. La figura 3.2 resume en un diagrama de flujo la metodología planteada para la extracción de colágeno.

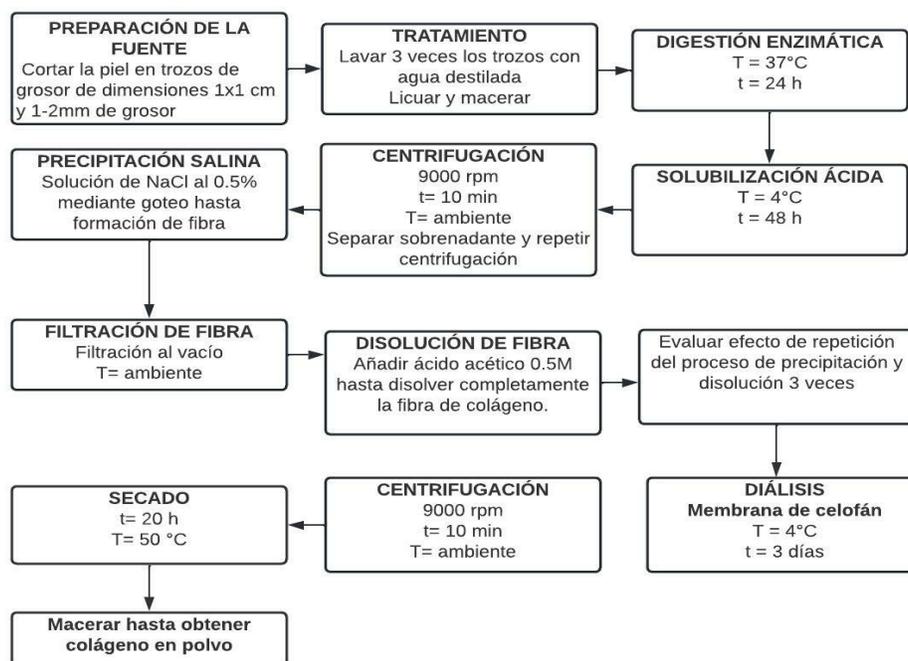


Figura 3.2: Diagrama de flujo del protocolo de extracción de colágeno a partir de las patas de pollo.

Las patas de pollo, como las de la figura 3.3a, se adquieren en el mercado local y se mantienen a temperaturas bajas antes de emplearlas en el proceso de extracción. Para la preparación de las fuentes, la piel se separa de los diferentes tejidos y se corta en trozos cuadrados de 1 cm de lado y 2 mm de grosor, aproximadamente (figura 3.3b). En el caso de los huesos, no se tienen en cuenta los cortes, pero sí se elimina el tejido cartilaginoso que los acompaña. Ambas fuentes se lavan con agua destilada 3 veces, cambiando el agua en cada lavado, como se muestra en la figura 3.3c. La piel y los huesos, por separado, son triturados por medio de una licuadora esterilizada y posteriormente son macerados (3.3d) [17].

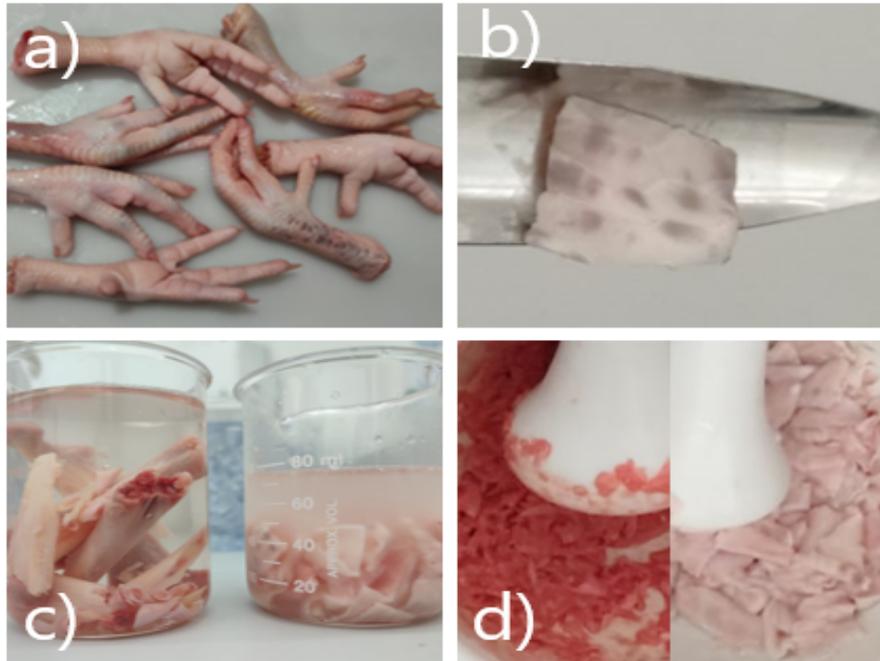


Figura 3.3: Tratamiento de la piel y hueso de las patas de pollo: a) patas de pollo empleadas en la extracción, b) Trozos de 1x1 cm de piel, c) Lavado de la fuente, d) Macerado.

Una vez la fuente es tratada, se agrega 0,5 % de tripsina (Gibco™, US) con relación a la masa de la fuente [77]. Al no haber suficiente información relacionada a la condición de la tripsina, se plantean diferentes soluciones para evaluar la efectividad de la digestión enzimática por parte de la tripsina. La primera es agregar tripsina en polvo directamente en la masa como lo indica la literatura [17], la segunda es añadir una solución de tripsina al 0,25 % en agua destilada y la última es una solución de tripsina al 0,25 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Independientemente de la condición de la tripsina añadida, todas las muestras se almacenan a una temperatura de 37 °C durante 24 h en una incubadora de baño seco [78] - [79].

Cumplido el tiempo de incubación, se añade AcOH (Emsure®, Alemania) ya que, debido a su composición, ayuda al aumento de iones H⁺, favoreciendo así el acceso del agua a las fibras de colágeno, para que luego esta agua sea retenida por enlaces de hidrógeno, o por fuerzas electrostáticas entre grupos polares cargados [80]. Debido a la falta de información reportada en los estudios sobre la concentración de AcOH que se debe agregar con respecto a la masa de la fuente, se realizan pruebas con diferentes proporciones en peso de AcOH:fuentes como lo son 0.5:1, 1:1 y 2:1. Todas las muestras se almacenan a una temperatura de 4 °C durante 48 h [81] - [82].

La siguiente etapa del proceso de extracción corresponde a la formación de la fibra y la purificación, sin embargo, es necesario separar la solución de colágeno de los restos de la masa y otro tipo de impurezas de la fuente empleada. Para esto se emplea el método de centrifugación a 9000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente [77]. Posterior a ello, se efectúa la separación de fases, donde se conserva el sobrenadante que de nuevo es purificado al centrifugarlo bajo las mismas condiciones que se mencionaron anteriormente.

Para la formación de la fibra de colágeno se emplea el método de precipitación salina, en el cual se neutraliza la carga superficial de las moléculas de colágeno por la acción de los iones de sal presentes en la solución, precipitándolo gradualmente por la disminución de las interacciones electrostáticas entre estas moléculas [70]. Para esto, al sobrenadante de la última centrifugación se le añade, por goteo una solución al 5 % de NaCl en agua destilada hasta observar la fibra en la solución [82].

La fibra formada se filtra al vacío y luego se disuelve de nuevo en una solución de AcOH 0.5 M [17]. El proceso de formación, filtración y disolución se repite hasta tres veces con el fin de obtener una fibra de colágeno más purificada. Posteriormente, para garantizar la eliminación del AcOH y de la solución de NaCl de la fibra de colágeno obtenida, se plantea una última etapa de purificación.

En la etapa de purificación final, el colágeno se somete a un proceso de diálisis en el que se dispone de una membrana de celofán. Este proceso se realiza bajo agitación durante tres días, manteniendo una temperatura de 4 °C y cambiando el agua cada 12 h [17]. Una vez se cumple el proceso de purificación, la solución de colágeno se centrifuga una última vez a 9000 rpm durante 10 min, conservando el sobrenadante. Finalmente, se realiza el secado del colágeno en un concentrador de vacío centrífugo durante 20 h a una temperatura de 50 °C y el material resultante se macera, con el fin de obtener un producto final de colágeno en polvo.

3.2.2. Prueba de condiciones

Como se plantea en el protocolo, la fuente y las condiciones tanto de la tripsina como del AcOH se pusieron a prueba con el fin de obtener las condiciones ideales que garanticen una mayor producción de fibra de colágeno. Inicialmente se dispuso de dieciocho muestras, donde nueve correspondían a la piel y, las nueve restantes, a los huesos de las patas de pollo. De las nueve muestras de cada fuente, tres se sometieron a la adición de tripsina en polvo, tres a la solución de tripsina con agua y tres a la solución de tripsina con PBS. A cada una de las tres muestras por cada condición de tripsina se le añadió AcOH en las tres proporciones diferentes mencionadas en la sección 3.2.1.

La figura 3.4 muestra la metodología general que se emplea para la elección de las condiciones. Para las muestras de la primera prueba de condiciones, es decir, para las dieciocho muestras iniciales, la masa que se utilizó de cada fuente, luego del tratamiento descrito en la sección 3.2.1, es de 0.5 g. Se analizó la producción de colágeno de las dieciocho condiciones diferentes, eliminando las condiciones que no lograron mostrar una cantidad considerable de colágeno. Posteriormente, a las condiciones seleccionadas de la primera prueba, se les realizó una segunda prueba, esta vez duplicando la masa, es decir 1 g. Para esta segunda prueba se realizó una espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) a la fibra de colágeno obtenida, analizando su composición y eliminando las condiciones que no presentan un espectro similar al que se reporta en el colágeno de la literatura. Es así como, finalmente, se seleccionaron las condiciones ideales para la estandarización del protocolo de extracción de colágeno a partir de las patas de pollo.

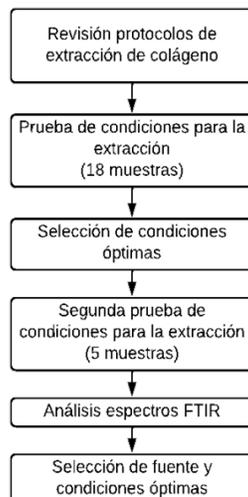


Figura 3.4: Diagrama de flujo de la metodología para las pruebas de condiciones realizadas en el protocolo.

3.3 Caracterización del colágeno

Para verificar los resultados de cada una de las etapas del proceso de extracción, el colágeno, en forma de solución o de fibra, se caracteriza por FTIR. Para caracterizar el producto final de colágeno en estado sólido, se emplea FTIR y espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis). Adicional a ello, se realiza una comparación de los espectros infrarrojos del colágeno obtenido con los del colágeno comercial.

3.3.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR se midieron en un espectrofotómetro de infrarrojo ThermoScientific Nicolet iS5 FTIR, US y el software OMNIC, en un rango de longitud de onda de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , mientras que el análisis de los datos obtenidos se realizó por medio del software Origin Lab®.

3.3.2. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

Los espectros de absorción UV-Vis del colágeno en estado sólido se midieron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES, Alemania, con el software Ocean View. Los datos obtenidos por el software fueron procesados con el software Origin Lab®.

3.4 Reproducibilidad del protocolo

Con el fin de garantizar el éxito de la estandarización del protocolo y así mismo la capacidad de que este sea reproducido o replicado para emplearlo en otros estudios, se realiza tres veces el experimento de acuerdo con las condiciones seleccionadas. La masa inicial de la fuente de las muestras correspondientes a las réplicas del protocolo es de 1 g, y sus pesos se registran hasta la fase de formación de la fibra. A partir de los pesos finales de las fibras colágeno,

se calculan medidas estadísticas como la desviación estándar y el coeficiente de variación; medidas que permiten identificar y comprobar que el protocolo es reproducible.

Para calcular la desviación estándar de los datos se emplea la ecuación 3.1, donde N es el número de muestras, X_i un peso específico y \bar{x} el promedio de los pesos.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_N^1 (X_i - \bar{x})^2}{N}} \quad (3.1)$$

En el caso del coeficiente de variación, este se calcula a partir de la ecuación 3.2, donde X es la variable a la que se desea calcular el coeficiente, \bar{x} el promedio de la variable y σ_x la desviación estándar.

$$CV = \frac{\sigma_x}{\bar{x}} \quad (3.2)$$

3.5 Rendimiento del protocolo

Con el objetivo de obtener un indicador de desempeño del protocolo estandarizado, se realiza el cálculo del parámetro de rendimiento por medio de la ecuación 3.3.

$$\%R = \frac{Peso_{colageno}}{Peso_{fuente}} \times 100 \% \quad (3.3)$$

3.6 Revisión de protocolos para la síntesis de hidrogeles de colágeno

Debido a que los hidrogeles de colágeno poseen propiedades mecánicas deficientes, es común combinarlos con otro polímeros [83]. Teniendo en cuenta la disponibilidad de los materiales en el laboratorio para la síntesis del hidrogel, se selecciona el dextrano, el cual, en combinación con el colágeno, reporta una mejoría en las propiedades mecánicas de los hidrogeles sin afectar su biocompatibilidad [84]. A partir de esto, se plantea la búsqueda bibliográfica de un hidrogel de dextrano y colágeno, empleando el método de entrecruzamiento. Por lo tanto, la revisión se realizó con ecuaciones de búsqueda que combinaban las palabras clave “hydrogels”, “collagen”, “crosslinking” y “synthesis”. Para esta revisión bibliográfica se plantearon criterios de inclusión y exclusión, que permiten identificar los artículos objetivo de los que no proporcionan información relevante. Criterios de inclusión:

- Estudios relacionados a la síntesis de hidrogeles de colágeno con dextrano.
- Estudios relacionados al entrecruzamiento de colágeno
- Idioma: inglés y español.

Criterios de exclusión:

- Tesis.
- Estudios relacionados a la síntesis de hidrogeles con otro polímero.
- Estudios que no detallen el proceso de síntesis del hidrogel.

Teniendo en cuenta los criterios de exclusión e inclusión y las palabras claves, se realizó la búsqueda en bases de datos como Pubmed y Google Académico. Con los estudios encontrados se plantea la propuesta de protocolo para la síntesis de un hidrogel de colágeno y dextrano.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se encuentran los resultados obtenidos en las diferentes etapas del proceso planteado. Se presentan los resultados de las pruebas de condiciones, los espectros infrarrojos, los espectros de absorbancia, la reproducibilidad del protocolo junto con la comparación entre el colágeno obtenido y el colágeno que se encuentra en el mercado y, por último, la propuesta de protocolo para la síntesis del hidrogel de colágeno y dextrano.

4.1 Revisión de protocolos de extracción de colágeno

Teniendo en cuenta los resultados de la revisión literaria descrita en la sección 3.1, se plantean las variables que proporcionan la dirección de la búsqueda. La intervención que se debe abordar es ¿qué protocolos se han desarrollado para la extracción enzimática del colágeno tipo I con tripsina, a partir de patas de pollo? Los protocolos encontrados se comparan en cuanto a procedimientos y parámetros experimentales como tiempo, temperatura, solventes y reactivos, estandarizando finalmente un protocolo para extraer colágeno tipo I con tripsina, utilizando las patas de pollo como la fuente precursora de la proteína.

En esta sección se exponen los protocolos más importantes encontrados en la literatura, los cuales coinciden en la presentación de las etapas de tratamiento de la fuente, digestión enzimática, solubilización ácida y formación y purificación del colágeno. En la tabla 4.1, se resumen las condiciones de las etapas iniciales, es decir, las condiciones que corresponden a la etapa de tratamiento de la fuente y digestión enzimática. Tanto el protocolo empleado por Gao et al., 2003, como el empleado por L. Ma. et al., 2003, hacen uso del tendón de bovino para la extracción de colágeno [85] - [79]. Pese a que no corresponde con la fuente que se desea emplear en este proyecto, algunas condiciones de estos dos protocolos pueden ser útiles debido a la similitud encontrada en esta etapa con los protocolos que sí emplean como fuente las patas de pollo.

Inicialmente, el tratamiento de la fuente en los protocolos de los cinco estudios abarca la reducción del área de la materia prima por medio de la división en pequeños trozos para el caso de la piel y, tanto para el hueso como para la piel, una fase de trituración por medio de una licuadora. También se menciona una limpieza de la fuente con el fin de remover grasas e impurezas. Por lo tanto, para la estandarización del protocolo, la etapa de tratamiento estaría compuesta de estas tres fases: corte en trozos, trituración y limpieza de la fuente. Posteriormente, ocurre la digestión enzimática por el efecto de agregar la tripsina a la materia prima tratada. En este caso, todos los estudios coinciden en el tiempo y temperatura de la

reacción de la tripsina con la fuente. Sin embargo, algunos de ellos reportan el uso de la tripsina en polvo (0.5 %) [17] – [77], mientras que otros la reportan en solución (0.25 %) pero sin aportar el solvente [85] - [79]. Con el fin de plantear una condición estándar, la etapa de digestión enzimática del protocolo implicaría una prueba de condiciones, en las que se evalúe tanto los resultados del uso de la tripsina en polvo, como los resultados de la tripsina en solución, probando con al menos dos solventes diferentes.

Tabla 4.1: Condiciones reportadas en la literatura para la etapa de tratamiento de la fuente y digestión enzimática.

Autor	Fuente empleada	Tratamiento implementado	Condición de tripsina	Tiempo de reacción (h)	Temperatura de reacción (° C)
Agrippine et al., 2019 [17]	Huesos y garras	Triturar la fuente con licuadora	0.5 g de tripsina en polvo con respecto a la masa de la fuente	24	37
Winias et al., 2017 [76]	Piel	Cortar en pequeñas piezas	No se indica	24	37
Gao et al., 2003 [85]	Tendón de bovino	Corta en piezas de grosor de 1-2mm	Solución de tripsina (0.25 %) (no se indica el solvente)	24	37
L. Ma et al., 2003 [79]	Tendón de bovino	Remover grasa e impurezas (no se indica cómo)	Solución de tripsina (0.25 %) (no se indica el solvente)	24	37
Pratiwi et al., 2017 [77]	Pata de pollo sin hueso	Cortar en piezas y licuar	Polvo de tripsina (no indica cantidad)	24	37

La siguiente etapa corresponde a la solubilización del colágeno en medio ácido, en la que se agrega AcOH a las muestras con tripsina y luego se incuban a una temperatura y tiempo determinados. El estudio realizado por Gao et al., 2003, se elimina de la revisión ya que el protocolo difiere en gran medida de los demás protocolos en los reactivos empleados y en los valores de los diversos parámetros, esto a causa de la diferencia de la fuente utilizada. Por otro lado, como se observa en la tabla 4.2, el protocolo adoptado por L. Ma. et al., 2003, 2003, es el único que reporta una concentración de 0.5 M para el AcOH [79]. Sin embargo, la mayoría de los estudios indican el mismo tiempo de incubación y la misma temperatura; 48 h y 37 °C, respectivamente. Para estandarizar el valor de la concentración del AcOH, se plantea una segunda prueba de condiciones, esta vez variando la relación de proporción entre el ácido y la masa de la fuente.

Posterior a esto, con el objetivo de separar la materia prima y sus impurezas de la solución de colágeno en AcOH, las muestras se centrifugan hasta dos veces. Nuevamente la mayoría de los protocolos coinciden en las revoluciones por minuto y en el tiempo al que se someten las diferentes muestras en la fase de centrifugación. Debido a que la separación de fases de una sola centrifugación puede no resultar del todo efectiva, lo ideal sería realizar una segunda centrifugación para cerciorarse de que no hay restos de la materia prima en la solución de colágeno.

Tabla 4.2: Condiciones reportadas en la literatura para la etapa de solubilización en del colágeno en medio ácido.

Autor	Concentración AcOH (M)	Tiempo de reacción (h)	Temperatura de reacción (° C)	Cantidad de centrifugaciones	Revoluciones por minuto	Tiempo (min)
Agrippine et al., 2019 [17]	No se reporta	48	4	2	9000	10
Winias et al., 2017 [76]	No se reporta	No se reporta	No se reporta	1	9000	No se reporta
L. Ma et al., 2003 [79]	0.5	48	4	1	No se reporta	No se reporta
Pratiwi et al., 2017 [77]	No se reporta	48	4	2	9000	10

Una vez se tiene la solución de colágeno, el siguiente paso es la formación y purificación de la fibra. En este caso, todos los protocolos coinciden en el método de formación de la fibra, el cual corresponde a la precipitación salina. Como se observa en la tabla 4.3, todos los estudios emplean una solución de NaCl al 5% p/p para precipitar la solución de colágeno. Una vez la fibra es formada, se desea eliminar la solución salina de la muestra, por lo que se realiza un filtrado de la fibra. Luego de este filtrado, la fibra vuelve a disolverse en AcOH a una concentración reportada de 0,5 M y el proceso de formación se repite. Agrippine et al., 2019, indican haber realizado tres veces la etapa de disolución, formación y filtrado [17], mientras que L. Ma. et al., 2003, y Pratiwi et al., 2003, dos veces [79]-[77]. Teniendo en cuenta que se desea estandarizar el protocolo, se plantea evaluar el efecto de la cantidad de repeticiones del proceso de disolución, formación y filtrado, en la estructura del colágeno, y así identificar su utilidad en el proceso de purificación.

Por último, para cerrar la etapa de purificación, los estudios coinciden en la realización de una fase de diálisis durante 3 días, cambiando el agua cada 12 h. Sólo Agrippine et al., 2019, proporcionan en su protocolo la temperatura a la que se dializa el colágeno, la cual corresponde a 4 °C. Este estudio, al igual que el presentado por Pratiwi et al., 2017, presentan un último procedimiento, el cual corresponde a una centrifugación a 9000 rpm durante 10 minutos, donde el sobrenadante corresponde al colágeno obtenido finalmente en suspensión acuosa [17] - [77].

Tabla 4.3: Condiciones reportadas en la literatura para la etapa de formación y purificación de la fibra.

Autor	Concentración NaCl (% wt)	Concentración AcOH (M)	Cantidad de filtraciones	Tiempo de diálisis	Temperatura de diálisis (° C)	Tiempo de cambio de agua (h)
Agrippine et al., 2019 [17]	5	0.5	3	3 días	4	12
Winias et al., 2017 [76]	5	No se reporta	No se reporta	No se reporta	No se reporta	No se reporta
L. Ma et al., 2003 [79]	5	0.5	2	3 días	No se reporta	12
Pratiwi et al., 2017 [77]	5	0.5	2	3 días	No se reporta	No se reporta

4.2 Etapa de tratamiento de la fuente

Como primer ensayo de exploración, se realiza la medición de la cantidad de materia prima tratada que se puede obtener de una sola pata de pollo, registrando los pesos obtenidos en cada paso de la fase de tratamiento de la fuente. La tabla 4.4 muestra la cantidad de piel y de hueso que se obtiene de tres patas de pollo diferentes, y su pérdida de peso durante los pasos de licuado y macerado. De la tabla se deduce que, de acuerdo con el promedio de los pesos obtenidos luego de macerar la fuente proveniente de las diferentes patas de pollo, de una pata de pollo se puede extraer aproximadamente 5.601 g y 6.108 g de piel y hueso tratado, respectivamente. Estos valores indican únicamente la cantidad de materia prima tratada que

puede obtenerse de una pata de pollo. La cantidad de fuente tratada que se empleó en los experimentos posteriores de extracción se indica en futuras secciones.

Tabla 4.4: Pesos obtenidos de la materia prima durante la etapa de tratamiento.

Pesos (g)		
Piel	Inicial	6.023
	Licuada	5.239
	Macerado	5.542
Hueso	Inicial	6.312
	Licuada	6.085
	Macerado	5.930

4.3 Primera prueba de condiciones para la extracción de colágeno

La primera prueba de condiciones abarca el protocolo desde el tratamiento de la fuente hasta la etapa de formación de la fibra de colágeno, es decir, hasta la precipitación salina. Visualmente se analizan las dieciocho muestras, registrando las observaciones para cada una, como se puede ver en la tabla 4.5. El descarte de condiciones se realiza teniendo en cuenta la premisa de que no genera fibra o, en algunos casos, la centrifugación no genera sobrenadante suficiente para realizar la formación de la fibra. El aspecto de la fibra se puede observar en la figura 4.1.



Figura 4.1: Fibra de colágeno producida por las condiciones piel-PBS-0,5:1.

Según lo descrito en la tabla, de las dieciocho condiciones se eliminan en total trece de ellas y únicamente pasan a la segunda prueba las cinco condiciones cuya observación apunta a la generación de fibra.

Inicialmente, como se observa en la tabla 4.5, la mayoría de condiciones que lograron generar fibra de colágeno pertenecen a la fuente correspondiente a la piel de las patas de pollo. En el caso del hueso, ya que su composición de minerales como el calcio le brinda gran resistencia, se analiza que probablemente la producción de fibra se ve reducida al ser necesaria una etapa de pretratamiento como la desmineralización del hueso. Esta etapa se puede realizar por medio de ácidos que disuelvan el calcio, como el AcOH, quedando así únicamente los tejidos blandos como el conectivo, donde se encuentra el colágeno.

La mayoría de condiciones que presentaron poco sobrenadante luego de la acción del AcOH corresponden a las muestras a las que se les añade la tripsina en polvo al 0.25 %. Esto puede deberse a que, ya que la cantidad de materia prima empleada en cada muestra fue poca y la tripsina no se encuentra en solución, el sobrenadante se reduce y no es suficiente para realizar una separación de fases.

Tabla 4.5: Resultados de la primera prueba de condiciones para la extracción (18 muestras).

Fuente	Condición tripsina	Proporción AcOH	Observaciones
Piel	En polvo	0.5:1	No genera fibra
		1:1	No generó sobrenadante
		2:1	No genera fibra
	H ₂ O	0.5:1	Formación de fibra pequeña
		1:1	No genera fibra
		2:1	Poco sobrenadante
	PBS	0.5:1	Formación de gran fibra
		1:1	No genera fibra
		2:1	Genera algo que parece ser fibra
Hueso	En polvo	0.5:1	Genera algo que parece ser fibra
		1:1	Poco sobrenadante, color oscuro
		2:1	No genera fibra
	H ₂ O	0.5:1	Genera algo que parece ser fibra
		1:1	No genera fibra
		2:1	No genera fibra
	PBS	0.5:1	No genera fibra
		1:1	No genera fibra
		2:1	No genera fibra

En el caso de las relaciones de concentración de AcOH como 1:1 y 2:1, se analiza que un aumento de la concentración de este ácido desencadena el aumento de iones H⁺, lo que acelera el proceso de hidrólisis del colágeno, transformándolo en gelatina. Es por esto que en la mayoría de muestras con estas concentraciones no hubo formación de fibra de colágeno.

Por otro lado, se observa que tres muestras generaron fibra con la fuente de piel y dos con la de hueso. De estas cinco muestras se destaca que la mejor condición para la tripsina es corresponde a la solución en H₂O, mientras que para el AcOH es la relación de concentración 0.5:1.

4.4 Segunda prueba de condiciones para la extracción de colágeno

Para esta segunda prueba, el protocolo se replica desde tratamiento de la muestra hasta la tercera formación de la fibra de colágeno con las cinco condiciones que lograron pasar la primera prueba. En esta prueba no sólo se realiza un análisis visual, si no que también se analizan los espectros infrarrojos de la fibra formada por las diferentes condiciones.

La tabla 4.6 muestra las observaciones realizadas para las cinco condiciones. A partir de los resultados obtenidos se confirma el análisis de que el hueso necesita una etapa de desmineralización, ya que la cantidad de fibra que se obtuvo en ambas muestras de esta fuente fue muy poca. Por lo anterior, la fuente de hueso queda eliminada de la estandarización del protocolo.

Así mismo, la relación de concentración de AcOH 2:1 no produce los resultados esperados para la estandarización del proceso, por lo que también se elimina esta condición. Por otro lado, las condiciones de la tripsina en solución tanto como H₂O como con PBS, con una relación de concentración de AcOH 0.5:1, mostraron buenos resultados, generando un aumento de fibra que corresponde con el aumento de la masa de la materia prima. Es por esto que las dos condiciones para la tripsina se tienen en cuenta para la estandarización, junto con la condición del AcOH 0.5:1.

Tabla 4.6: Resultados de la segunda prueba de condiciones para la extracción (5 muestras).

Fuente	Condición tripsina	Relación de concentración de AcOH	Observaciones
Piel	H2O	0.:1	Aumento en cantidad de fibra
	PBS	0.5:1	Aumento en cantidad de fibra
	PBS	2:1	Poca formación de fibra
Hueso	En polvo	0.5:1	Poca formación de fibra
	H2O	0.5:1	No se produjo suficiente fibra para la medición de espectros

La fibra resultante se caracteriza por FTIR debido a que se requiere un análisis estructural que permita seleccionar las condiciones óptimas para el proceso de estandarización del protocolo. Estos espectros se realizan con el fin de apreciar si la fibra de colágeno obtenida por las diferentes condiciones realmente posee los enlaces químicos y estructurales característicos de la molécula de colágeno. Para esto, se comparan los espectros infrarrojos del colágeno tipo I reportados en la literatura (figura 4.2) con los obtenidos en la experimentación a partir de las cuatro condiciones (figura 4.3).

Inicialmente se puede observar que, a pesar de que la fibra aún no se purifica, en los FTIR obtenidos es posible identificar ligeramente los picos característicos que corresponden a las amidas A, B, I y II cuya longitud de onda se reporta en la literatura a 3464 cm⁻¹, 2927 cm⁻¹, 1639 cm⁻¹, 1555 cm⁻¹, respectivamente y, por último, la amida III en un rango de longitud de onda entre 1200 cm⁻¹ y 1300 cm⁻¹. En primera medida, para las cuatro condiciones, la amida A se identifica con facilidad entre los valores de número de onda de 3300 cm⁻¹ y 3350 cm⁻¹, lo que se asocia a la presencia de enlaces -NH en el colágeno obtenido. Entre 3000 cm⁻¹ y 2750 cm⁻¹ se observa un ligero quiebre en los colágenos obtenidos que representa la amida B. Esta banda se asocia con el estiramiento asimétrico del CH₂ [86] - [87]. Como observación, este pequeño pico se identifica mejor en los FTIR de las dos primeras condiciones.

En el caso de las amidas I y II, estas se encuentran entre 1800 cm⁻¹ y 1500 cm⁻¹, siendo la primera banda la correspondiente a la amida I y seguidamente, la banda de la amida II. Estas representan el estiramiento de C=O a lo largo de la estructura del colágeno en el caso de la amida I, y la flexión del enlace N-H junto con el estiramiento del enlace C-N para la amida II [88]. De nuevo, se observa que la banda de absorción de la amida II es más visible en las dos primeras condiciones que en las dos últimas. Por último, se identifica la amida III entre 1200 cm⁻¹ y 1300 cm⁻¹, la cual representa la deformación N-H y el estiramiento C-N.

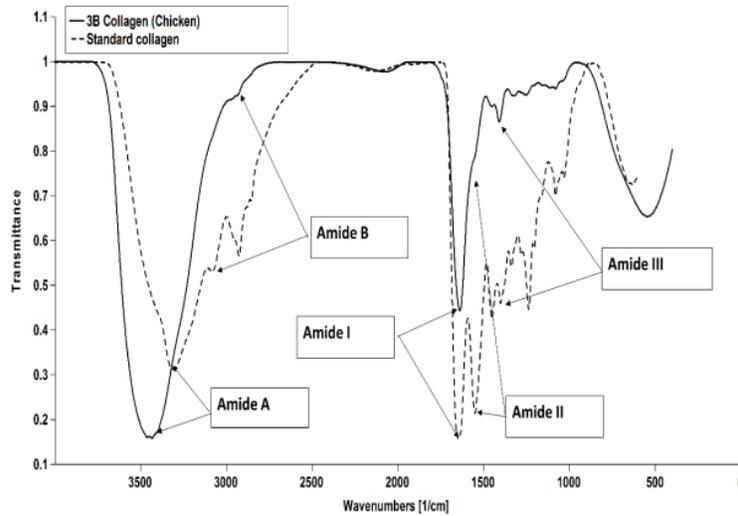


Figura 4.2: FTIR de colágeno reportado en la literatura. Tomado de: [87].

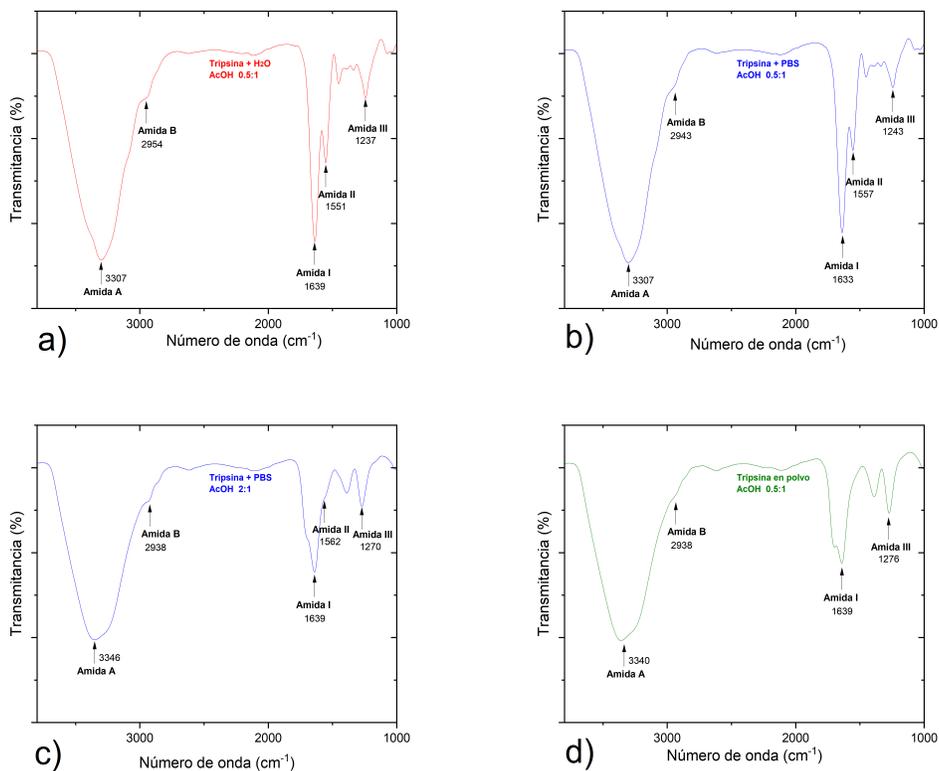


Figura 4.3: FTIR de colágeno en condiciones de: a) piel, tripsina y H₂O, AcOH 0,5:1, b) piel, tripsina y PBS, AcOH 0,5:1, C) piel, tripsina y H₂O, AcOH 2:1, d) hueso, tripsina en polvo, AcOH 0,5:1

Es así como a partir de las observaciones se eliminan las dos últimas condiciones, quedando como fuente la piel de las patas de pollo junto con la solución de tripsina tanto en agua destilada como en PBS, con una proporción de AcOH de 0.5:1.

4.5 Formación de la fibra

Un último paso importante en la estandarización del protocolo de extracción implica evaluar el efecto que tiene replicar el proceso de formación, filtración y disolución de la fibra de colágeno. Con el fin de conocer si hay una mejoría en el resultado del proceso de extracción al realizar tres veces la formación de la fibra, al colágeno obtenido de las dos condiciones seleccionadas anteriormente se les realizan mediciones de FTIR después de la primera, segunda y tercera formación de la fibra.

La figura 4.4 muestra la cantidad de fibra obtenida por las dos condiciones en la primera y en la última formación, respectivamente. Hubo una disminución en la cantidad debido a, posiblemente, la pérdida de fibra en el proceso de filtración al vacío y a la eliminación de impurezas.

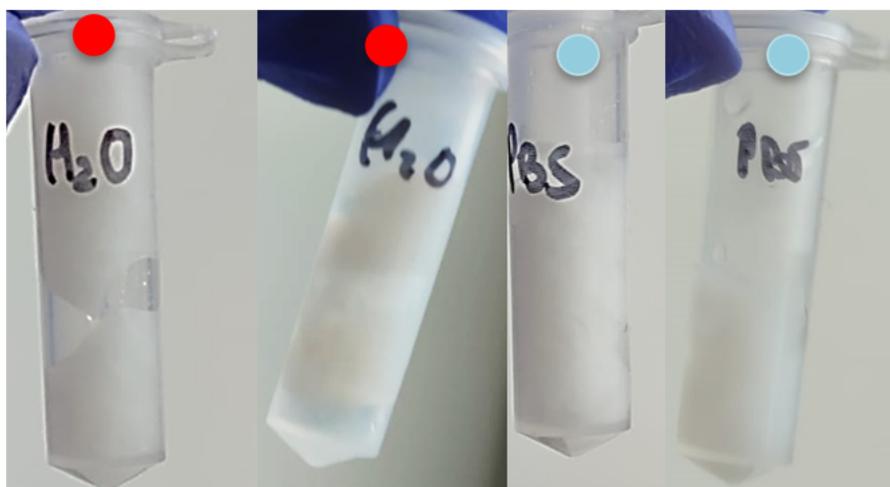


Figura 4.4: Formación de fibra de colágeno: primer filtrado (izquierda), tercer filtrado (derecha). Condición de tripsina y H₂O (rojo), condición de tripsina y PBS (azul).

Los espectros infrarrojos de la primera, segunda y tercera formación para las dos condiciones se pueden observar en la figura 4.5, respectivamente. Analizando únicamente los cambios representativos entre los espectros, se observa que, a medida que aumenta la cantidad de repeticiones del proceso de formación, el pico correspondiente a la banda de absorción de la amida B, entre 3000 cm^{-1} y 2750 cm^{-1} , se pronuncia más. Esto indica que se presenta un mayor grado de distribución molecular o un balanceo en los átomos que componen el colágeno obtenido en la banda de la amida B, a medida que se repite el proceso evaluado. Por lo tanto, se deduce que replicar el proceso de formación, filtración y disolución hasta tres veces es útil en el proceso de purificación del colágeno.

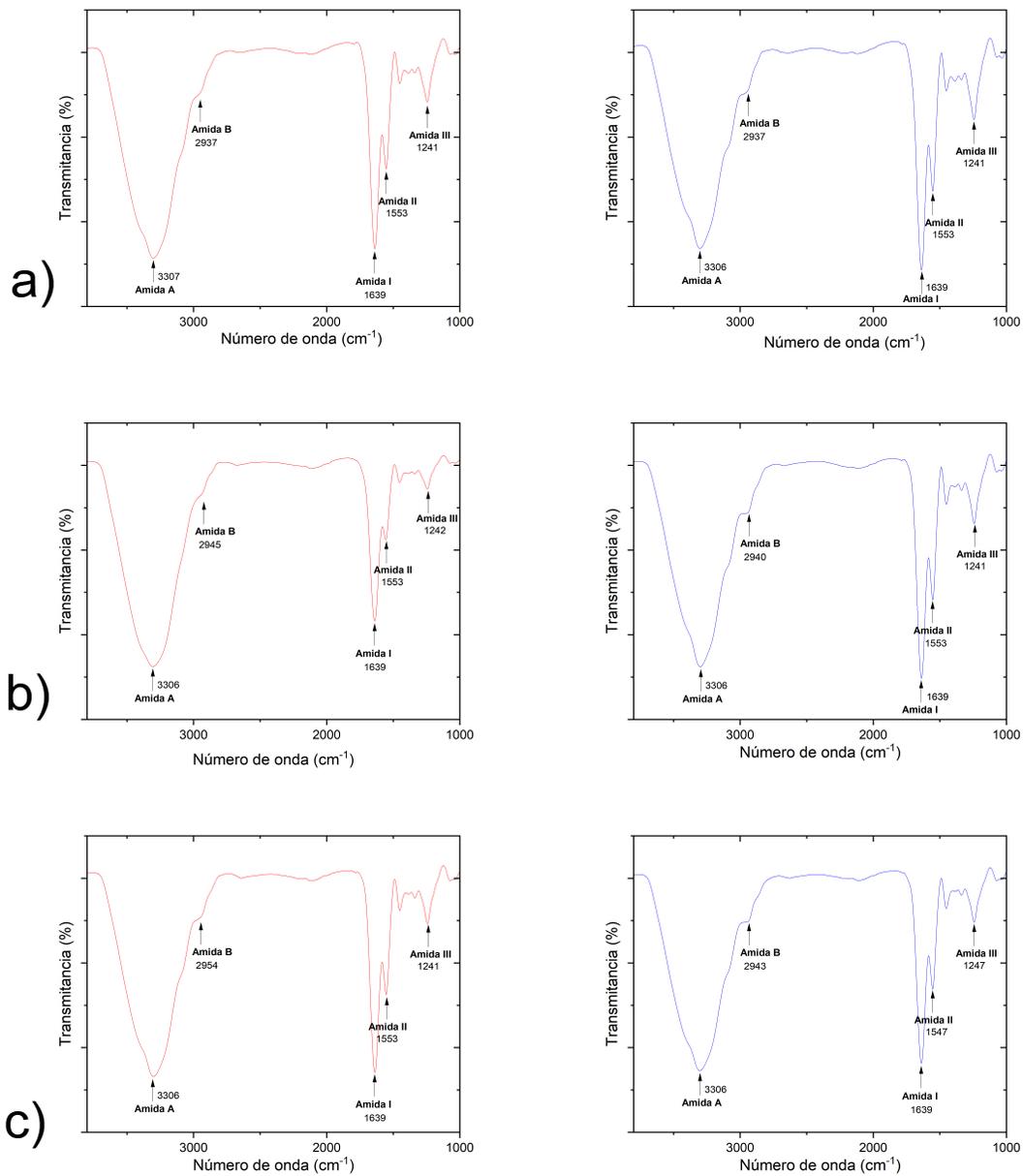


Figura 4.5: Espectros de colágeno con condición de tripsina y H₂O (rojo), condición de tripsina y PBS (azul). a) Primera formación, b) segunda formación, c) tercera formación de fibra de colágeno.

4.6 Caracterización del colágeno final

El producto final obtenido a partir de las dos condiciones seleccionadas con el proceso de extracción corresponde al colágeno en estado sólido, como se puede ver en las figuras 4.6 y 4.7. Como se menciona anteriormente, el colágeno en polvo se caracteriza por espectroscopía

de infrarrojo y UV-Vis para su respectiva comparación con el colágeno comercial.



Figura 4.6: Colágeno en estado sólido, resultante del proceso de extracción con la condición de tripsina y H₂O.

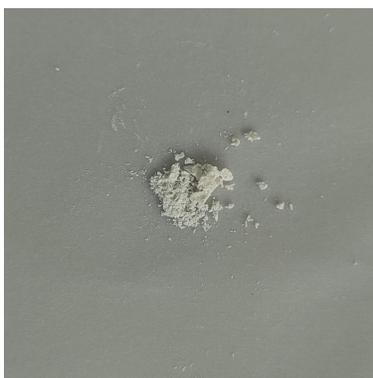


Figura 4.7: Colágeno en estado sólido, resultante del proceso de extracción con la condición de tripsina y PBS.

En las figuras 4.8 y 4.9 se muestran los espectros infrarrojos de los colágenos obtenidos por cada condición. Inicialmente se comprueba mediante los espectros que el colágeno en ninguno de los casos se desnaturalizó al no presentar la banda de absorción característica de la gelatina correspondiente al estiramiento -NH en 3300 cm^{-1} [86]. Esta importante observación implica que la fase de purificación conservó la conformación del colágeno y que la temperatura empleada en el secado de las muestras no tuvo un impacto en el producto final. Cada figura contiene los valores correspondientes a los que se detectan las cinco amidas que permiten identificar y corroborar la eficacia del protocolo de extracción. Los valores de las longitudes de onda de las amidas entre condiciones no varían significativamente, por lo cual se puede afirmar que no hay mayor diferencia en la estructura molecular del colágeno al emplear PBS o agua destilada en la solución de tripsina. Los espectros muestran también otras vibraciones entre 1200 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} , lo que es considerado único de la conformación molecular que posee el colágeno y que se atribuye a tripéptido Gly-Pro-Hyp [70].

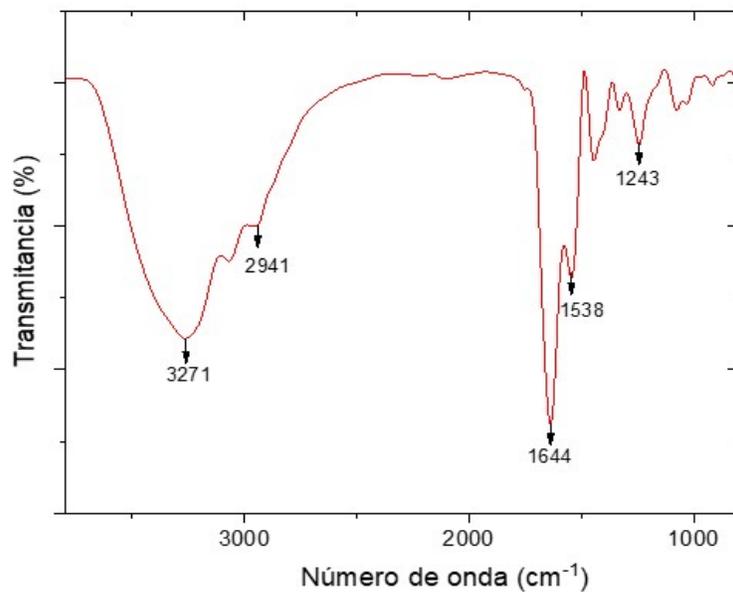


Figura 4.8: FTIR del colágeno resultante del proceso de extracción, para la condición tripsina y H₂O.

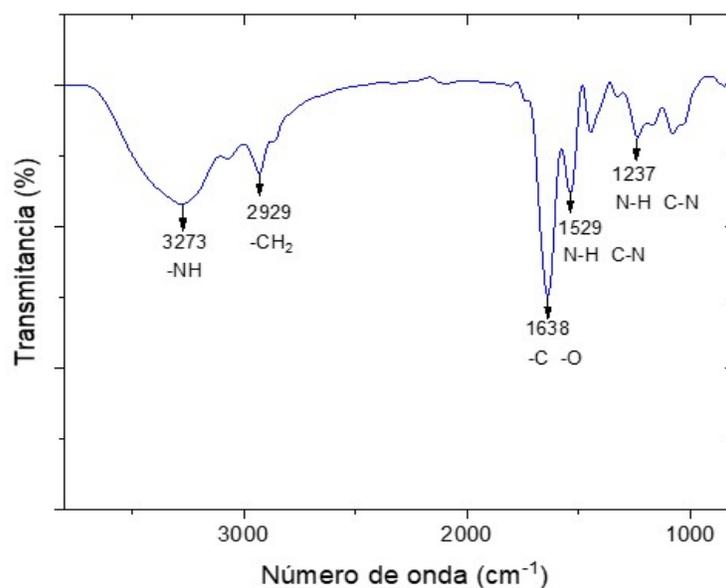


Figura 4.9: FTIR del colágeno resultante del proceso de extracción, para la condición tripsina y PBS.

Como segunda corroboración de la eficacia del protocolo estandarizado, se realizó una comparación del colágeno obtenido con un colágeno comercial. El colágeno comercial empleado corresponde a un alimento en polvo que posee péptidos de colágeno llamado Colag-X, adquirido en un almacén de cadena. El suplemento en polvo se disolvió en agua destilada para

realizar la medición de espectros infrarrojos, los cuales se observan en la figura 4.10, junto con los espectros obtenidos del colágeno extraído.

Se encuentra que el colágeno comercial logra exhibir todos los picos de las amidas A, I, II y III, menos el de la B. Esto puede deberse a la composición del suplemento, ya que, a parte del colágeno, se compone de otras proteínas y elementos que pueden suprimir las vibraciones del enlace $-CH_2$ correspondiente a la amida B. Sin embargo, al estar las demás amidas presentes se destaca la similitud en la composición del colágeno comercial con el extraído a partir de las patas de pollo. En el caso de la amida I, los dos colágenos exhibieron el mismo valor de longitud de onda (1635 cm^{-1}), sin embargo, para el caso de las amidas restantes, la variación en los valores de longitud de onda puede deberse a una estructura molecular diferente de los dos colágenos evaluados.

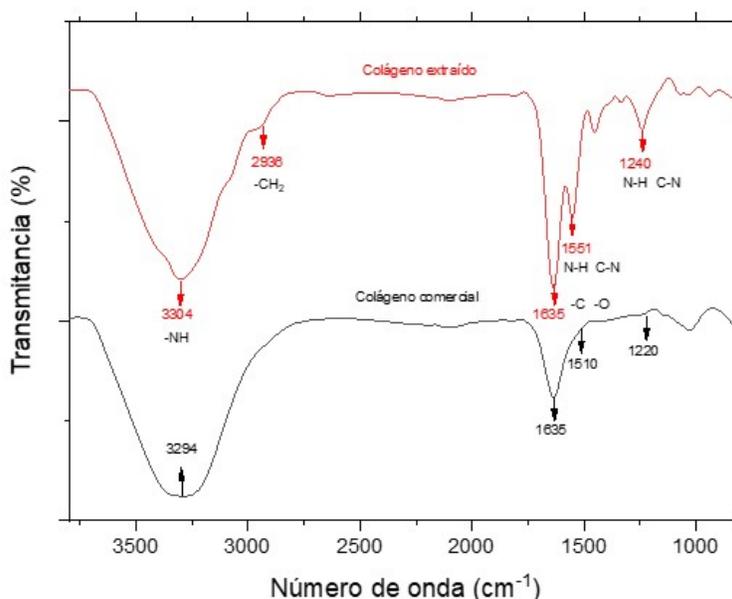


Figura 4.10: FTIR del colágeno resultante del proceso de extracción (rojo) y del colágeno comercial (negro).

Las figuras 4.11 y 4.12 exponen los espectros UV-Vis obtenidos para los colágenos de las dos condiciones mencionadas a lo largo del documento, a longitudes de onda de 200 a 300 nm. El colágeno de la condición tripsina y H₂O se dispersó en tanto en agua como en PBS, mientras que el colágeno de la condición tripsina y PBS se dispersó en este buffer.

De las figuras se destacan los picos de absorción máxima en 232 nm y 228 nm, el cual se atribuye a los enlaces peptídicos que poseen las proteínas. Por otra parte, se identifica otra banda de absorción a 259 nm que se relaciona con la absorción de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, la tirosina y el triptófano, cuyas bandas de absorción se presentan en el rango de 250 a 300 nm.

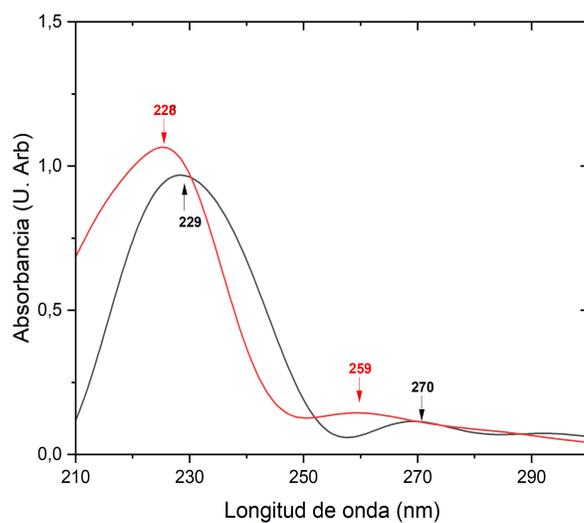


Figura 4.11: UV-Vis del colágeno resultante del proceso de extracción con la condición tripsina y H₂O, disperso en agua (negro) y en PBS (rojo).

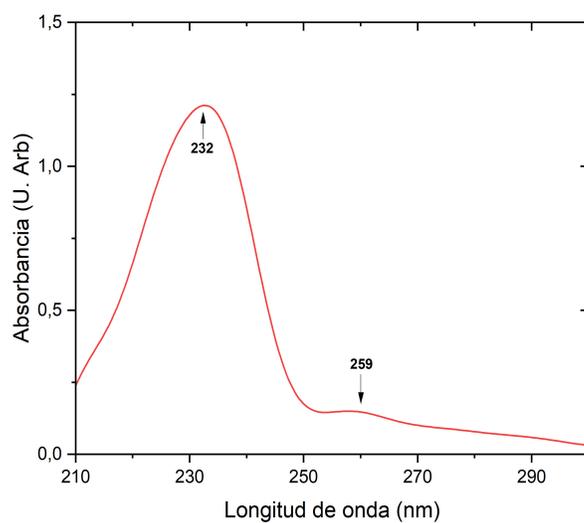


Figura 4.12: UV-Vis del colágeno resultante del proceso de extracción con la condición tripsina y PBS, disperso en PBS.

4.7 Reproducibilidad del protocolo

Se plantea evaluar la reproducibilidad del protocolo a partir de la cantidad de fibra formada por los parámetros seleccionados a través de las diferentes pruebas de condiciones. En la figura

4.13 se observan las fibras de colágeno obtenidas en las tres réplicas del proceso. Se realiza un registro de los pesos de las tres cantidades de fibra obtenidas en cada experimento, el cual se consigna en la tabla 4.7.

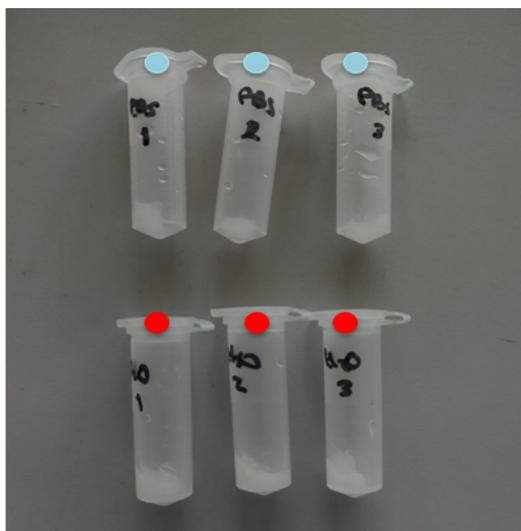


Figura 4.13: Réplicas del proceso de extracción para las condiciones de tripsina y H₂O, y tripsina y PBS.

Tabla 4.7: Medición de pesos de las fibras de colágeno obtenidas en la replicación.

Número de muestra	Tripsina + PBS	Tripsina + H ₂ O
1	0.10 g	0.28 g
2	0.08 g	0.23 g
3	0.13 g	0.24 g

A partir de los pesos registrados, se calcula la desviación estándar junto con el coeficiente de variación con el fin de cuantificar la dispersión de estos pesos por separado de acuerdo con la condición a la que pertenecen y así identificar si el protocolo estandarizado es reproducible. Al realizar los cálculos se obtiene la tabla 4.8, donde se exponen las desviaciones estándar obtenidas para cada condición. Estos resultados indican que el experimento sí es reproducible, por lo tanto, el protocolo logró estandarizarse, cumpliendo uno de los objetivos principales del proyecto.

Tabla 4.8: Desviación estándar y coeficiente de variación de los pesos obtenidos en las réplicas del protocolo.

Condición	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Tripsina + H ₂ O	0.021	8 %
Tripsina + PBS	0.022	6 %

Esto conduce finalmente a la estandarización del protocolo de extracción, el cual se encuentra descrito en el diagrama de flujo de la sección 3.2.1.

4.8 Rendimiento del protocolo

El rendimiento del protocolo es calculado de acuerdo a la sección 3.5 de la metodología. En la tabla 4.9 se observa el rendimiento obtenido para el protocolo estandarizado, teniendo en cuenta los pesos del colágeno obtenido al final de la etapa de secado. El parámetro calculado resulta notablemente bajo si se compara con el de trabajos como el de Araújo et al., 2018, el cual reporta aproximadamente un 75 % de rendimiento [5]. Sin embargo, es válido aclarar que este valor no interfiere con los objetivos principales del presente trabajo, por lo que, si se desea mejorar la viabilidad del protocolo estandarizado, es necesario hacer un estudio adicional que optimice el proceso por medio de la modificación de sus variables.

Tabla 4.9: Rendimiento del protocolo.

Condición	Peso inicial muestras (g)	Peso colágeno (g)	Rendimiento (%)
Tripsina + PBS	2	0.08	4.0
Tripsina + H₂O	2	0.11	5.5

Adicional a ello, también se calculan los rendimientos promedio de las muestras replicadas, los cuales se muestran en la tabla 4.10. Estos rendimientos obtenidos son mayores que los expuestos en la tabla 4.9, ya que estas réplicas sólo abarcan el protocolo hasta la fase de formación de la fibra, por lo tanto se trata de una fibra de colágeno que posee alto contenido de agua y de impurezas, lo que aumenta su peso y por ende, el rendimiento calculado.

Tabla 4.10: Rendimiento promedio de las réplicas del protocolo.

Condición	Peso inicial muestras (g)	Rendimiento promedio (%)
Tripsina + PBS	1	10.3
Tripsina + H₂O	1	25.0

4.9 Propuesta de protocolo para la síntesis de hidrogel de colágeno y dextrano

De acuerdo con la información brindada por los diferentes estudios, se plantea una propuesta de un protocolo para la síntesis de un hidrogel de colágeno y dextrano. Como primera medida, se revisan los diferentes agentes entrecruzadores encontrados en los estudios y se registran las características, como se observa en la tabla 4.11.

El primer agente entrecruzador corresponde a la riboflavina o también conocida como vitamina B2. Esta molécula biológicamente activa es empleada en el entrecruzamiento de hidrogeles de colágeno debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas como la internalización celular específica del transportador, la implicación en reacciones redox, fluorescencia y fotosensibilización [89]. M. Butnaru et al., 2020, utilizan riboflavina para entrecruzar hidrogeles de colágeno y dextrano en composiciones de 100 % colágeno, 75 % colágeno-25 % dextrano y 50 % colágeno-50 % dextrano. Luego de mezclar los dos polímeros, se agrega riboflavina y se expone a radiación UV con longitud de onda de 365 nm y con distancia de 100 mm entre la solución de hidrogel y la fuente de UV [88].

El diisocianato de hexametileno (HDI) es el segundo agente entrecruzador encontrado en la literatura. L. H. Damik et al., 1995, emplean este compuesto orgánico que se compone de dos grupos isocianato para el entrecruzamiento de un hidrogel de colágeno. Para este caso, debido a que el HDI es ligeramente soluble en agua, se hace uso de un tensioactivo con el objetivo de promover la penetración del agente entrecruzante en el colágeno. Dentro de los parámetros a tener en cuenta que se mencionan en este estudio está la monitorización del pH durante el entrecruzamiento [90].

Zhang et al., 2014, realizan una funcionalización al dextrano para sintetizar hidrogeles de colágeno y dextrano. La modificación consiste en la oxidación del dextrano mediante la introducción de grupos aldehído. Esto se realiza por medio de una solución de peryodato de sodio con agua desionizada, a la que se le agrega el dextrano, manteniendo la solución en agitación por 24 h. Posteriormente, se añade etilenglicol a la reacción, cuyo resultado se dializa con el fin de remover el peryodato de sodio. Una vez se obtiene el dextrano modificado, se agrega a la solución de colágeno en AcOH neutralizada por hidróxido de sodio, y se mantiene en agitación a una temperatura de 4 °C. Para formar el hidrogel, se incuba la mezcla a 37 °C por 24 h [84].

Por último, P.-P. Georgeta et al., 2016, presentan un hidrogel entrecruzado con glutaraldehído, a partir del compuesto de colágeno-dextrano-óxido de zinc. Bajo el ajuste del pH del colágeno se forma un gel, al que se le añade óxido de zinc y dextrano para formar el compuesto. Por último, se añade 0,25 % de glutaraldehído al compuesto, relacionado con el colágeno en estado sólido. No se mencionan parámetros importantes en el proceso de la síntesis del hidrogel, como tiempos o temperaturas [91].

Tabla 4.11: Resumen de revisión bibliográfica acerca de agentes entrecruzadores en la síntesis de hidrogeles de colágeno.

ENTRECRUZADOR	GENERALIDADES
Riboflavina	Se utiliza en una concentración de 1 % y el entrecruzamiento se efectúa por la exposición a radiación UV durante 15 min [88].
Diisocianato de hexametileno (HDI)	Tampón de fosfato que contiene 1.5 % (p/p) de HDI y 1.0 % (p/p) de polisorbato 80 como tensioactivo [90].
Dextrano funcionalizado con aldehído(DAD)	Mezclar solución de colágeno con DAD e incubar a 37 °C por 24 h [84].
Glutaraldehído	Mezclar colágeno con dextrano y con 0.25 % de glutaraldehído [91].

Teniendo en cuenta la disponibilidad de los materiales en el laboratorio y la información presentada en cada estudio, se plantea la propuesta con base en el uso de HDI como entrecruzador. El protocolo propuesto se realizaría en dos etapas de reacción entre el colágeno, el dextrano y el HDI. Como se muestra en la figura 4.14, primero se realiza la reacción entre el grupo amina del colágeno (-NH₂) y el grupo isocianato del entrecruzador HDI (N=C=O). Esta reacción generaría un grupo urea y formaría la estructura HDI-Col-HDI. Por último, se genera una segunda etapa de reacción, en donde el grupo isocianato de la estructura formada reacciona con el grupo hidroxilo (-OH) del dextrano, formando una red de hidrogel estable.

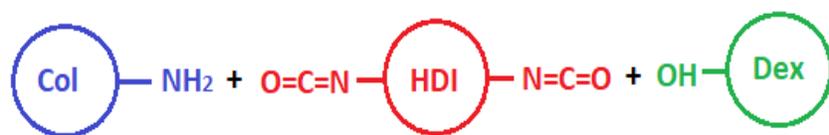


Figura 4.14: Reacciones entre el colágeno, HDI y dextrano para la síntesis del hidrogel. Fuente propia.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

El desarrollo de este proyecto da como principal resultado la propuesta y desarrollo experimental de un protocolo para la extracción de colágeno a partir de subproductos avícolas. Pese a la escasa información en las diferentes fuentes bibliográficas sobre el uso de tripsina en la fase digestión enzimática, se logró estandarizar un protocolo de extracción mediante diferentes pruebas de condiciones.

Se demostró, por medio del análisis de FTIR y UV-Vis, que el producto final que se obtuvo correspondía a colágeno, proveniente de la piel de las patas de pollo. El colágeno exhibió importantes bandas de absorción a longitudes de onda como 3271 cm^{-1} , 2941 cm^{-1} , 1644 cm^{-1} , 1538 cm^{-1} , y 1243 cm^{-1} , las cuales se atribuyen respectivamente a las amidas A, B, I, II y III. Además, se identificaron otras vibraciones que son producto de la conformación molecular única del colágeno, es decir, el tripéptido Gly-Pro-Hyp. En cuanto a los espectros UV-Vis, el colágeno demostró la presencia de aminoácidos aromáticos en su estructura y de enlaces peptídicos característicos de las proteínas.

La presentación del producto final de la extracción abrió la posibilidad de plantear una propuesta de aplicación de este colágeno obtenido, basado en la búsqueda de protocolos existentes para sintetizar un hidrogel por medio de entrecruzamiento. Los diversos estudios encontrados en la revisión de literatura resultaron de utilidad para plantear una idea inicial con base en el HDI como agente entrecruzador, logrando así cumplir con el último objetivo de este proyecto; presentar una propuesta final del protocolo para la síntesis un hidrogel basado en colágeno y dextrano, bajo la acción del HDI como entrecruzador.

Capítulo 6

RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

6.1 Recomendaciones

Para complementar el proyecto, se recomienda estudiar el uso de otro tipo de enzimas que puedan llegar a optimizar el proceso, y así evaluar el desempeño del protocolo propuesto con respecto a su producción final. También se recomienda realizar un estudio acerca de las propiedades morfológicas y mecánicas del colágeno obtenido y sus características, tales como la temperatura de desnaturalización, además de evaluar más a fondo el efecto de otras condiciones que pueden afectar el proceso de extracción.

6.2 Trabajos futuros

A corto plazo se plantea evaluar la propuesta de este proyecto sobre la reacción de entrecruzamiento que sintetizaría un hidrogel de colágeno y dextrano. Evaluando esto se formalizaría el protocolo y se continuaría la investigación con la caracterización morfológica y estructural del hidrogel.

A mediano plazo se buscaría realizar un estudio de viabilidad celular en presencia del hidrogel a través de un test de citocompatibilidad (MTT). Paralelamente, se propone abrir una investigación sobre los métodos de encapsulación de células en el hidrogel, con el objetivo de que, a largo plazo, se pueda implementar el método de encapsulación escogido y se evalúe la proliferación y diferenciación celular de las células cultivadas, aportando en la creación de un material con futura aplicación en la regeneración de tejidos lesionados.

Bibliografía

- [1] *Producción Pollo*, es. dirección: <https://fenavi.org/estadisticas/produccion-pollo-p/>.
- [2] P. Mrázek, P. Mokrejš, R. Gál y O. Krejčí, «Preparation of collagen concentrate from chicken feet,» en, pág. 8,
- [3] P. F. Almeida, J. A. A. Salles, T. M. B. Farias y J. C. Curvelo Santana, «Use of Chicken Feet as an Alternative to the reduce Wastes from Slaughterhouse,» *Información tecnológica*, vol. 23, n.º 4, págs. 42-52, 2012, Publisher: Centro de Información Tecnológica, ISSN: 0718-0764. DOI: 10.4067/S0718-07642012000400006.
- [4] L. M. Nollet y F. Toldra, *Manual de análisis de subproductos animales comestibles*. DOI: 10.1201/b10785.
- [5] Í. B. d. S. Araújo, T. K. A. Bezerra, E. S. d. Nascimento, C. A. d. A. Gadelha, T. Santi-Gadelha y M. S. Madruga, «Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization,» en, *Food Science and Technology*, vol. 38, págs. 167-173, abr. de 2018, Publisher: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, ISSN: 0101-2061, 1678-457X. DOI: 10.1590/fst.27517. (visitado 22-05-2022).
- [6] P. F. d. Almeida, F. A. Calarge y J. C. Santana, «Production of a product similar to gelatin from chicken feet collagen,» en, *Engenharia Agrícola*, vol. 33, págs. 1289-1300, dic. de 2013, ISSN: 0100-6916.
- [7] A. León-López, L. Fuentes-Jiménez, A. D. Hernández-Fuentes, R. G. Campos-Montiel y G. Aguirre-Álvarez, «Hydrolysed Collagen from Sheepskins as a Source of Functional Peptides with Antioxidant Activity,» eng, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n.º 16, E3931, ago. de 2019, ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms20163931.
- [8] Q. Acton, *Imines—Advances in Research and Application: 2013 Edition: ScholarlyBrief*. ScholarlyEditions, 2013, ISBN: 978-1-4816-8880-2.
- [9] G. Meisenberg y W. H. Simmons, *Principles of Medical Biochemistry E-Book*, en. Elsevier Health Sciences, sep. de 2016, Google-Books-ID: AtsqDQAAQBAJ, ISBN: 978-0-323-39190-0.
- [10] M. E. Nimni, «Collagen: Structure, function, and metabolism in normal and fibrotic tissues,» en, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 13, n.º 1, págs. 1-86, ago. de 1983, ISSN: 0049-0172. DOI: 10.1016/0049-0172(83)90024-0.
- [11] M. I. Avila Rodríguez, L. G. Rodríguez Barroso y M. L. Sánchez, «Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications,» eng, *Journal of Cosmetic Dermatology*, vol. 17, n.º 1, págs. 20-26, feb. de 2018, ISSN: 1473-2165. DOI: 10.1111/jocd.12450.

- [12] A. Nyström, «9 - Collagens in wound healing,» en, en *Wound Healing Biomaterials*, M. S. Ågren, ed., Woodhead Publishing, ene. de 2016, págs. 171-201, ISBN: 978-1-78242-456-7. DOI: 10.1016/B978-1-78242-456-7.00009-X.
- [13] G. Lazovic, M. Colic, M. Grubor y M. Jovanovic, «The application of collagen sheet in open wound healing*,» eng, *Annals of Burns and Fire Disasters*, vol. 18, n.º 3, págs. 151-156, sep. de 2005, ISSN: 1592-9558.
- [14] S. Dinescu, M. Albu Kaya, L. Chitoiu, S. Ignat, D. A. Kaya y M. Costache, «Collagen-Based Hydrogels and Their Applications for Tissue Engineering and Regenerative Medicine,» en *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*, M. I. H. Mondal, ed., Series Title: Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series, Cham: Springer International Publishing, 2019, págs. 1643-1664, ISBN: 978-3-319-77829-7 978-3-319-77830-3. DOI: 10.1007/978-3-319-77830-3_54. (visitado 22-05-2022).
- [15] M. Ahmed, A. K. Verma y R. Patel, «Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review,» en, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, vol. 18, pág. 100315, dic. de 2020, ISSN: 2352-5541. DOI: 10.1016/j.scp.2020.100315.
- [16] L. Devita, M. Nurilmala, H. N. Lioe y M. T. Suhartono, «Chemical and Antioxidant Characteristics of Skin-Derived Collagen Obtained by Acid-Enzymatic Hydrolysis of Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*),» en, *Marine Drugs*, vol. 19, n.º 4, pág. 222, abr. de 2021, Number: 4 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md19040222.
- [17] A. P. Asaeli, A. Yuliati, T. I. Budhy, S. Wilda, I. Silalahi y D. Santoso, *The Profile of Cross-Linked Chitosan and Collagen Derived-Chicken Shank Scaffold as Biomaterials in Tissue Engineering*, en, 2019.
- [18] R. H. Khan, M. K. Siddiqi y P. Salahuddin, «Protein Structure and Function,» en, pág. 39,
- [19] M. Akram, M. Asif, M. Uzair et al., «Amino acids: A review article,» *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 5, págs. 3997-4000, sep. de 2011.
- [20] K. Ahern, I. Rajagopal y T. Tan, *Biochemistry Free For All*, en. Oregon State University.
- [21] S. Maloy, «Amino Acids,» en, en *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, Elsevier, 2013, págs. 108-110, ISBN: 978-0-08-096156-9. DOI: 10.1016/B978-0-12-374984-0.00051-6.
- [22] P. D. Sun, C. E. Foster y J. C. Boyington, «Overview of Protein Structural and Functional Folds,» *Current Protocols in Protein Science*, vol. 35, n.º 1, págs. 1711-171189, feb. de 2004, ISSN: 1934-3655. DOI: 10.1002/0471140864.ps1701s35.
- [23] T. Sanvictores y F. Farci, «Biochemistry, Primary Protein Structure,» eng, en *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
- [24] V. Pollock, «Proteins,» en, en *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, S. J. Enna y D. B. Bylund, eds., New York: Elsevier, ene. de 2007, págs. 1-11, ISBN: 978-0-08-055232-3. DOI: 10.1016/B978-008055232-3.60055-8.
- [25] D. L.-C. M. M. NELSON, *PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA LEHNINGER, 5/ED.* Español. Barcelona, nov. de 2007, ISBN: 978-84-282-1486-5.

- [26] L. R. Engelking, «Chapter 4 - Protein Structure,» en, en *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition)*, L. R. Engelking, ed., Boston: Academic Press, ene. de 2015, págs. 18-25, ISBN: 978-0-12-391909-0. DOI: 10.1016/B978-0-12-391909-0.50004-9.
- [27] W. T. Godbey, «Chapter 3 - Proteins,» en, en *Biotechnology and its Applications (Second Edition)*, W. T. Godbey, ed., Academic Press, ene. de 2022, págs. 47-72, ISBN: 978-0-12-817726-6. DOI: 10.1016/B978-0-12-817726-6.00003-4.
- [28] R. J. Ouellette y J. D. Rawn, «14 - Amino Acids, Peptides, and Proteins,» en, en *Principles of Organic Chemistry*, R. J. Ouellette y J. D. Rawn, eds., Boston: Elsevier, ene. de 2015, págs. 371-396, ISBN: 978-0-12-802444-7. DOI: 10.1016/B978-0-12-802444-7.00014-8.
- [29] K. B. Lipkowitz, T. R. Cundari, V. J. Gillet y D. B. Boyd, eds., *Reviews in Computational Chemistry: Lipkowitz/Reviews in Computational Chemistry, Volume 22*, ép. Reviews in Computational Chemistry. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., feb. de 2006, ISBN: 978-0-471-78036-6 978-0-471-77938-4. DOI: 10.1002/0471780367.
- [30] H. Zhu, I. Sommer, T. Lengauer y F. S. Domingues, «Alignment of Non-Covalent Interactions at Protein-Protein Interfaces,» *PLoS ONE*, vol. 3, n.º 4, e1926, abr. de 2008, ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0001926.
- [31] D. J. Prockop y N. A. Guzmán, «El colágeno,» *Español*, vol. 191, págs. 53-63, 1981.
- [32] E. D. Hay, ed., *Cell Biology of Extracellular Matrix*, en. Boston, MA: Springer US, 1991, ISBN: 978-1-4613-6680-5 978-1-4615-3770-0. DOI: 10.1007/978-1-4615-3770-0.
- [33] B. M. Carlson, «Tissues,» en, en *The Human Body*, Elsevier, 2019, págs. 27-63, ISBN: 978-0-12-804254-0. DOI: 10.1016/B978-0-12-804254-0.00002-8.
- [34] *Síntesis de Colágeno | ¿Cómo Aumentarla? Dieta, Suplementos, Cremas*, es-ES, Section: X115, ene. de 2021. dirección: <https://magazine.x115.it/es/x115/sintesis-de-colageno/>.
- [35] M. Van Der Rest y R. Garrone, «Collagen family of proteins,» en, *The FASEB Journal*, vol. 5, n.º 13, págs. 2814-2823, 1991, ISSN: 1530-6860. DOI: 10.1096/fasebj.5.13.1916105.
- [36] B. Brodsky y J. A. Ramshaw, «The collagen triple-helix structure,» en, *Matrix Biology*, vol. 15, n.º 8-9, págs. 545-554, mar. de 1997, ISSN: 0945053X. DOI: 10.1016/S0945-053X(97)90030-5.
- [37] H. Jawad y R. Brown, «Mesoscale Engineering of Collagen as a Functional Biomaterial,» en, en *Comprehensive Biotechnology*, Elsevier, 2011, págs. 37-49, ISBN: 978-0-08-088504-9. DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00356-1.
- [38] J. Bella, «Collagen structure: new tricks from a very old dog,» en, *Biochemical Journal*, vol. 473, n.º 8, págs. 1001-1025, abr. de 2016, ISSN: 0264-6021, 1470-8728. DOI: 10.1042/BJ20151169.
- [39] *Nuevos hallazgos sobre la evolución molecular del colágeno*. dirección: <https://www.agenciasinc.es/Noticias/Nuevos-hallazgos-sobre-la-evolucion-molecular-del-colageno>.

- [40] L. E. Bretscher, C. L. Jenkins, K. M. Taylor, M. L. DeRider y R. T. Raines, «Conformational Stability of Collagen Relies on a Stereoelectronic Effect,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, n.º 4, págs. 777-778, ene. de 2001, Publisher: American Chemical Society, ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja005542v.
- [41] C. Knupp y J. Squire, «Molecular Packing in Network-Forming Collagens,» *The Scientific World JOURNAL*, vol. 3, págs. 558-577, jun. de 2003. DOI: 10.1100/tsw.2003.40.
- [42] A. J. Herrera Batista, H. J. Ruiz Candina y M. T. Zumeta Dubé, «La súper familia de las colágenas,» *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 36, n.º 2, págs. 260-270, jun. de 2017, Publisher: 1999, Editorial Ciencias Médicas, ISSN: 0864-0300.
- [43] K. Gelse, E. Pöschl y T. Aigner, «Collagens—Structure, function, and biosynthesis,» *Advanced drug delivery reviews*, vol. 55, págs. 1531-46, dic. de 2003. DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.002.
- [44] C. M. Kielty y M. E. Grant, «The Collagen Family: Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix,» en, en *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*, P. M. Royce y B. Steinmann, eds., Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., mayo de 2002, págs. 159-221, ISBN: 978-0-471-25185-9 978-0-471-22192-0. DOI: 10.1002/0471221929.ch2.
- [45] K. Henriksen y M. Karsdal, «Type I collagen,» en, en *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*, Elsevier, 2019, págs. 1-12, ISBN: 978-0-12-817068-7. DOI: 10.1016/B978-0-12-817068-7.00001-X.
- [46] R. Naomi, P. M. Ridzuan y H. Bahari, «Current Insights into Collagen Type I,» *Polymers*, vol. 13, n.º 16, pág. 2642, ago. de 2021, ISSN: 2073-4360. DOI: 10.3390/polym13162642.
- [47] J. Myllyharju y K. I. Kivirikko, «Collagens and collagen-related diseases,» en, *Annals of Medicine*, vol. 33, n.º 1, págs. 7-21, ene. de 2001, ISSN: 0785-3890, 1365-2060. DOI: 10.3109/07853890109002055.
- [48] M. Yamauchi y M. Sricholpech, «Lysine post-translational modifications of collagen,» en, *Essays in Biochemistry*, vol. 52, I. Scott, ed., págs. 113-133, mayo de 2012, ISSN: 0071-1365, 1744-1358. DOI: 10.1042/bse0520113.
- [49] B. Lecoq y C. Marcelli, «Interpretación de las pruebas de laboratorio corrientes en las enfermedades óseas,» es, *EMC - Tratado de Medicina*, vol. 11, n.º 2, págs. 1-7, ene. de 2007, ISSN: 1636-5410. DOI: 10.1016/S1636-5410(07)70647-5.
- [50] M. SCHMIDT, A. FONTOURA, A. Vidal et al., «Characterization of hydrolysates of collagen from mechanically separated chicken meat residue,» *Food Science and Technology*, vol. 40, mar. de 2020. DOI: 10.1590/fst.14819.
- [51] P. Suurs, H. van den Brand, W. F. Daamen y S. Barbut, «Properties of different poultry skins sources in relation to co-extruded sausage casings,» en, *Food Hydrocolloids*, vol. 125, pág. 107434, abr. de 2022, ISSN: 0268-005X. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.107434. (visitado 06-05-2022).
- [52] S. Noorzai, C. J. R. Verbeek, M. C. Lay y J. Swan, «Collagen Extraction from Various Waste Bovine Hide Sources,» en, *Waste and Biomass Valorization*, vol. 11, n.º 11, págs. 5687-5698, nov. de 2020, ISSN: 1877-2641, 1877-265X. DOI: 10.1007/s12649-019-00843-2.

- [53] M. H. Santos, R. M. Silva, V. C. Dumont, J. S. Neves, H. S. Mansur y L. G. D. Heneine, «Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications,» eng, *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, vol. 33, n.º 2, págs. 790-800, mar. de 2013, ISSN: 1873-0191. DOI: 10.1016/j.msec.2012.11.003.
- [54] M. J. Woo, «Preparation of Biomaterials Using Fish Collagen and Seaweed Alginate to Promote in-vivo Cell Growth and Proliferation Activity,» Tesis de mtría., UTAR, 2019.
- [55] K. S. Silvipriya, K. Kumar, A. Bhat, B. Kumar, A. John y P. Lakshmanan, «Collagen: Animal Sources and Biomedical Application,» 2015. DOI: 10.7324/JAPS.2015.50322.
- [56] A. Badnjevic, P. Škrbić y L. Pokvić, «Recent Advances and Implications in Collagen Delivery,» en,
- [57] I. F. Gorlov, E. I. Titov, G. V. Semenov et al., «Collagen from porcine skin: a method of extraction and structural properties,» en, *International Journal of Food Properties*, vol. 21, n.º 1, págs. 1031-1042, ene. de 2018, Publisher: Taylor & Francis Group, ISSN: 1094-2912, 1532-2386. DOI: 10.1080/10942912.2018.1466324.
- [58] K.-H. Jung, Y.-C. Choi, J.-Y. Chun, S.-G. Min y G.-P. Hong, «Effects of Concentration and Reaction Time of Trypsin, Pepsin, and Chymotrypsin on the Hydrolysis Efficiency of Porcine Placenta,» eng, *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, vol. 34, n.º 2, págs. 151-157, 2014, ISSN: 1225-8563. DOI: 10.5851/kosfa.2014.34.2.151.
- [59] D. Cortial, J. Gouttenoire, C. F. Rousseau et al., «Activation by IL-1 of bovine articular chondrocytes in culture within a 3D collagen-based scaffold. An in vitro model to address the effect of compounds with therapeutic potential in osteoarthritis,» eng, *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 14, n.º 7, págs. 631-640, jul. de 2006, ISSN: 1063-4584. DOI: 10.1016/j.joca.2006.01.008.
- [60] T. Ahuja, V. Dhakray, M. Mittal, P. Khanna, B. Yadav y M. Jain, «Role Of Collagen In The Periodontal Ligament - A Review,» *The Internet Journal of Microbiology*, vol. 10, n.º 1, ene. de 2012, Publisher: Internet Scientific Publications.
- [61] D. Coppola, M. Oliviero, G. A. Vitale et al., «Marine Collagen from Alternative and Sustainable Sources: Extraction, Processing and Applications,» en, *Marine Drugs*, vol. 18, n.º 4, pág. 214, abr. de 2020, Number: 4 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md18040214.
- [62] A. Gnanamani, M. Shanmugavel, P. Ghosh y R. Radhakrishnan, «Poultry spent wastes: an emerging trend in collagen mining,» vol. 6, págs. 26-35, jul. de 2020. DOI: 10.15406/atroa.2020.06.00113.
- [63] P. Mokrejš, R. Gál, D. Janáčová, M. Plšková y M. Zacharová, «Chicken Paws By-products as an Alternative Source of Proteins,» en, *Oriental Journal of Chemistry*, vol. 33, n.º 5, págs. 2209-2216, oct. de 2017, ISSN: 0970020X, 22315039. DOI: 10.13005/ojc/330508.
- [64] M. M. Schmidt, R. C. P. Dornelles, R. O. Mello et al., «Collagen extraction process,» English, *International Food Research Journal*, vol. 23, n.º 3, págs. 913-922, 2016, Publisher: Faculty of Food Science and Technology, ISSN: 1985-4668.

- [65] J. Wu, L. Kong, J. Zhang y W. Chen, «Extraction and Properties of Acid-Soluble Collagen and Pepsin-Soluble Collagen from Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Scales: Prerequisite Information for Fishery Processing Waste Reuse,» en, *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 28, n.º 4, págs. 2923-2930, abr. de 2019, ISSN: 1230-1485, 2083-5906. DOI: 10.15244/pjoes/93742.
- [66] R. Naomi, P. M. Ridzuan y H. Bahari, «Current Insights into Collagen Type I,» *Polymers*, vol. 13, n.º 16, pág. 2642, ago. de 2021, ISSN: 2073-4360. DOI: 10.3390/polym13162642.
- [67] A. Owczarzy, R. Kurasiński, K. Kulig, W. Rogóż, A. Szkudlarek y M. Maciążek-Jurczyk, «Collagen - structure, properties and application,» inglés, *Engineering of Biomaterials*, vol. 2020, n.º 156, págs. 17-23, Publisher: Polish Society for Biomaterials, ISSN: 1429-7248. DOI: 10.34821/eng.biomat.156.2020.17-23.
- [68] H. Yang y Z. Shu, «The extraction of collagen protein from pigskin,» en, pág. 5, 2014.
- [69] H.-W. Kim, I.-J. Yeo, K.-E. Hwang et al., «Isolation and Characterization of Pepsin-soluble Collagens from Bones, Skins, and Tendons in Duck Feet,» *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, vol. 36, n.º 5, págs. 665-670, oct. de 2016, ISSN: 1225-8563. DOI: 10.5851/kosfa.2016.36.5.665.
- [70] P. Hashim, M. S. M. Ridzwan y J. Bakar, «Isolation and Characterization of Collagen from Chicken Feet,» en, *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*, vol. 8, n.º 3, págs. 250-254, feb. de 2014.
- [71] T. Muthukumar, G. Sreekumar, T. P. Sastry y M. Chamundeeswari, «Collagen as a Potential Biomaterial in Biomedical Applications,» en, *REVIEWS ON ADVANCED MATERIALS SCIENCE*, vol. 53, n.º 1, págs. 29-39, ene. de 2018, Publisher: De Gruyter Open Access, ISSN: 1605-8127. DOI: 10.1515/rams-2018-0002.
- [72] C. Dong e Y. Lv, «Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives,» *Polymers*, vol. 8, n.º 2, pág. 42, feb. de 2016, ISSN: 2073-4360. DOI: 10.3390/polym8020042.
- [73] I. V. Yannas, D. S. Tzeranis, B. A. Harley y P. T. C. So, «Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization,» *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 368, n.º 1917, págs. 2123-2139, abr. de 2010, Publisher: Royal Society. DOI: 10.1098/rsta.2010.0015.
- [74] A. Sionkowska, S. Skrzyński, K. Śmiechowski y A. Kołodziejczak, «The review of versatile application of collagen: Versatile Application of Collagen,» en, *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 28, n.º 1, págs. 4-9, ene. de 2017, ISSN: 10427147. DOI: 10.1002/pat.3842.
- [75] G. Albu, I. Titorencu y M. V. Ghica, «Collagen-Based Drug Delivery Systems for Tissue Engineering,» en nov. de 2011, ISBN: 978-953-307-661-4. DOI: 10.5772/22981.
- [76] S. Winias, D. S. Ernawati, M. D. Ariani y R. P. Rahayu, «Scaffold combination of chitosan and collagen synthesized from chicken feet induces osteoblast and osteoprotegerin expression in bone healing process of mice,» en, *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, vol. 50, n.º 2, págs. 86-90, jun. de 2017, Number: 2, ISSN: 2442-9740. DOI: 10.20473/j.djmkkg.v50.i2.p86-90.

- [77] A. Pratiwi, A. Yuliati y M. D. Ariani, «Vascular endothelial growth factor expression after induced by chicken shank collagen scaffold in bone regeneration,» *Journal of International Dental and Medical Research*, vol. 10, págs. 333-337, ene. de 2017.
- [78] M. S. Rahman, M. M. Rana, L.-S. Spitzhorn et al., «Fabrication of biocompatible porous scaffolds based on hydroxyapatite/collagen/chitosan composite for restoration of defected maxillofacial mandible bone,» *Progress in Biomaterials*, vol. 8, págs. 137-154, mayo de 2019, ISSN: 2194-0509. DOI: 10.1007/s40204-019-0113-x.
- [79] L. Ma, «Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering,» en, *Biomaterials*, vol. 24, n.º 26, págs. 4833-4841, Publisher: ELSEVIER, ISSN: 0142-9612. DOI: 10.1016/s0142-9612(03)00374-0.
- [80] I. Jaswir, A. Hammed, H. Salleh y Salleh, «Nano-structural analysis of fish collagen extracts for new process development,» *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, dic. de 2011. DOI: 10.5897/AJB11.2764.
- [81] X. Lin, Y. Chen, H. Jin et al., «Collagen Extracted from Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) Skin by Isoelectric Precipitation: Physicochemical Properties, Proliferation, and Migration Activities,» *Marine Drugs*, vol. 17, n.º 5, págs. 261, mayo de 2019, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md17050261.
- [82] C. Zhou, Y. Li, X. Yu et al., «Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen,» en, *LWT*, vol. 74, págs. 145-153, dic. de 2016, ISSN: 0023-6438. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.07.024.
- [83] M. Sancho-Tello, L. Milián, M. Mata Roig, J. J. Martín de Llano y C. Carda, «Chapter 18 - Cartilage Regeneration and Tissue Engineering,» en, en *Advances in Biomechanics and Tissue Regeneration*, M. H. Doweidar, ed., Academic Press, ene. de 2019, págs. 361-378, ISBN: 978-0-12-816390-0. DOI: 10.1016/B978-0-12-816390-0.00018-2.
- [84] X. Zhang, Y. Yang, J. Yao, Z. Shao y X. Chen, «Strong Collagen Hydrogels by Oxidized Dextran Modification,» *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, vol. 2, n.º 5, págs. 1318-1324, mayo de 2014, Publisher: American Chemical Society. DOI: 10.1021/sc500154t.
- [85] C.-y. Gao, D.-y. Wang y J.-c. Shen, «Fabrication of porous collagen/chitosan scaffolds with controlling microstructure for dermal equivalent,» *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 14, págs. 373-379, jun. de 2003. DOI: 10.1002/pat.342.
- [86] E. B. Gamal S., E.-S. El-Sayed M., A. M. Abdel y G. Noha M, «Preparation and Characterization of Poly Vinyl Alcohol /Gelatin Blends,» en,
- [87] D. Dhakal, P. Koomsap, A. Lamichhane, M. B. Sadiq y A. K. Anal, «Optimization of collagen extraction from chicken feet by papain hydrolysis and synthesis of chicken feet collagen based biopolymeric fibres,» en, *Food Bioscience*, vol. 23, págs. 23-30, jun. de 2018, ISSN: 22124292. DOI: 10.1016/j.fbio.2018.03.003.
- [88] M. Butnaru, A. M. Lucaci, B. P. Cosman y L. Verestiuc, «Hydrogels Based on Collagen and Dextran for Bioartificial Tissues,» en, en *4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering*, I. Tiginyanu, V. Sontea y S. Railean, eds., ép. IFMBE Proceedings, Cham: Springer International Publishing, 2020, págs. 385-389, ISBN: 978-3-030-31866-6. DOI: 10.1007/978-3-030-31866-6_71.

- [89] N. Beztsinna, M. Solé, N. Taib e I. Bestel, «Bioengineered riboflavin in nanotechnology,» en, *Biomaterials*, vol. 80, págs. 121-133, feb. de 2016, ISSN: 0142-9612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.050. (visitado 22-05-2022).
- [90] L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. Van Luyn, P. B. Van Wachem, P. Nieuwenhuis y J. Feijen, «Crosslinking of dermal sheep collagen using hexamethylene diisocyanate,» en, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 6, n.º 7, págs. 429-434, jul. de 1995, ISSN: 1573-4838. DOI: 10.1007/BF00120286.
- [91] P.-P. Georgeta, F. Anton, M. M. Minodora et al., *New collagen-dextran-zinc oxide composites for wound dressing | Journal of Nanomaterials*. dirección: <https://dl.acm.org/doi/abs/10.1155/2016/5805034>.