

## MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF TYPE I COLLAGEN FIBERS IN FOSSIL SAMPLES FROM THE BREAL DE OROCUAL, EDO. MONAGAS, VENEZUELA.

A. C. Herrera Németh<sup>a,e\*</sup>, E. Cañizales<sup>b</sup>, J. Torre<sup>c</sup>, C. Rosales<sup>c</sup>, J. Castillo<sup>c</sup>, A. Briceño<sup>d</sup>, G. González<sup>e,f\*</sup>.

<sup>a</sup>Dpto. de Química, Área de Tecnología, UNEFM. Santa Ana de Coro, Falcón, Venezuela.

<sup>b</sup>Laboratorio de Caracterización Estructural y Magnética de Materiales, Centro de Ingeniería de Materiales y Nanotecnología, IVIC. Altos de Pipe, Miranda, Venezuela.

<sup>c</sup>Laboratorio de Espectroscopía Láser, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, UCV. Caracas, Venezuela.

<sup>d</sup>Laboratorio de Síntesis y Caracterización de Nuevos Materiales, Centro de Química “Dr. Gabriel Chuchani”, IVIC. Altos de Pipe, Miranda, Venezuela.

<sup>e</sup>Laboratorio de Síntesis y Tratamiento de Materiales, Centro de Ingeniería de Materiales y Nanotecnología, IVIC. Altos de Pipe, Miranda, Venezuela.

<sup>f</sup>School of Physical Sciences and Nanotechnology, Yachay Tech University, Urcuqui, Ecuador.

\*Corresponding author, E-mail: [alexandrachn@gmail.com](mailto:alexandrachn@gmail.com), [gemagonz@gmail.com](mailto:gemagonz@gmail.com)

Received: 15-07-2024

Accepted: 12-09-2024

Published: 27-03-2025

### ABSTRACT

The objective of this study was the chemical and morphological characterization of type I collagen fibers in a cortical bone sample of the humerus bone of a mammal belonging to the extinct genus *Toxodon*, whose fossil was extracted from “Breal de Orocuál”, in Monagas state, Venezuela. The fossil bone samples measuring 1 cm long x 1 cm wide x 0.5 cm deep, were cut in half with a silicon carbide disc and subsequently polished with sandpaper. A preliminary analysis by FT-IR spectroscopy reveals the characteristic absorption bands corresponding to collagen protein. Morphological analysis was carried out by scanning electron microscopy. At the microstructural level, osteons with corresponding Havers, duct, lamellae and lacunae were observed, all of which are characteristic elements of the anatomical and structural unity of cortical bone. Collagen fibers were also observed. The final verification of the presence of the fibers was carried out at a sub-micrometer scale using Atomic Force Microscopy. The periodic spacing between bands, characteristic of this type of organic structures, was identified, thus revealing their existence and state of preservation.

**Keywords:** fossil, fibers, collagen, morphology, micro-analysis.

### CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE FIBRAS DE COLÁGENO TIPO I EN MUESTRAS FÓSILES, PROVENIENTES DEL BREAL DE OROCUAL, EDO. MONAGAS, VENEZUELA.

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar químicamente y morfológicamente la existencia de fibras de colágeno tipo I en hueso húmero de un mamífero extinto del género *Toxodon*, cuyo fósil fue extraído del Breal de Orocuál, en el estado Monagas, Venezuela. Las muestras fósiles, de aproximadamente 1 cm de largo x 1 cm de ancho x 0,5 cm de profundidad, fueron cortadas por la mitad con un disco de carburo de silicio y posteriormente desbastadas con lija. Un análisis preliminar por espectroscopía FT-IR revela las bandas características de la proteína del colágeno. El análisis morfológico se llevó a cabo por Microscopía Electrónica de Barrido. A nivel microestructural, se observaron osteonas con sus canales de Havers, lamelas y lagunas, todos ellos elementos característicos de la unidad anatómica y estructural del hueso cortical. También se observaron fibras de colágeno. La verificación final de la presencia de las fibras, se realizaron a escala submicrométrica mediante Microscopía de Fuerza Atómica. Se identificó el espaciado periódico entre bandas, característico en este tipo de estructuras orgánicas, revelando así la existencia y el estado de preservación de las mismas.

**Palabras claves:** fósil, fibrillas, colágeno, morfología, microanálisis.

## INTRODUCCIÓN

Estudios paleontológicos han demostrado que fósiles extraídos de pozos de brea se encuentran en buen estado de preservación, debido al efecto protector de algunos hidrocarburos del petróleo [1]. Esta capa protectora reduce o minimiza los procesos de diagénesis que normalmente alteran tanto la fase orgánica (principalmente proteína de colágeno) como la inorgánica (minerales de hidroxiapatita) del tejido óseo, cuando éstos han estado expuestos al entorno [1, 2]. Venezuela posee dos grandes yacimientos prehistóricos de megafauna, uno de ellos ubicado en el Mene de Inciarte del estado Zulia y otro ubicado en el Breal de Orocuál del estado Monagas [3]. En la década de los 60 del siglo XX fue posible obtener, mediante microscopía electrónica de transmisión, imágenes de fibrillas de colágeno tipo I conservadas en este tipo de fósiles, provenientes de Rancho La Brea en California, Estados Unidos [4], uno de los yacimientos de megafauna usado como referencia para este tipo de fósiles [3]. Dada su preservación por efecto del petróleo, el colágeno tipo I proveniente del tejido óseo extraído de pozos de brea es usado para determinar la edad de los especímenes por datación isotópica, para hacer estudios de paleodietas y paleoecología [5, 6]. En este contexto, como parte de nuestro interés en el estudio paleontológico de fósiles encontrados en estos ambientes, en esta contribución se muestran los resultados de la caracterización química y morfológica de las fibras de colágeno tipo I en muestras fósiles provenientes de yacimientos de brea venezolanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras fósiles de aproximadamente 1 cm de alto, por 1 cm de ancho, por 1 cm de profundidad, fueron obtenidas usando un dremel en una pieza de hueso húmero correspondiente a una especie de *Toxodonte*, colectada en el Breal de Orocuál, Edo. Monagas, Venezuela. Seguidamente, fueron analizadas mediante Infrarrojo por Transformada de Fourier para detectar la

presencia de los grupos funcionales Amida I y Amida III, característicos en la proteína de colágeno tipo I. A continuación, las superficies de las muestras a observar fueron desbastadas usando un papel de lija de grano 1500 y fueron analizadas tanto morfológicamente como por microanálisis elemental semi-cuantitativo usando microscopía electrónica de barrido con EDX acoplado.

### *Análisis por Infrarrojo:*

Fueron identificadas las siguientes señales en las muestras fósiles:

$\nu_3$ - $\nu_4$ PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (470 cm<sup>-1</sup>),  $\nu_4$ PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (564 cm<sup>-1</sup>),  $\nu_4$ PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (603 cm<sup>-1</sup>),  $\nu_2$ CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (872, cm<sup>-1</sup>),  $\nu_1$ PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (962 cm<sup>-1</sup>),  $\nu_3$ PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (1035 cm<sup>-1</sup>), HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1093 cm<sup>-1</sup>), C-N y N-H (1093 cm<sup>-1</sup>),  $\nu_3$ CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> y CH<sub>2</sub> (1418 cm<sup>-1</sup>), CH<sub>2</sub> (1498 cm<sup>-1</sup>), N-H y C-N (1549 cm<sup>-1</sup>),  $\nu$ C=O y C-N (1632 cm<sup>-1</sup>),  $\nu$ C=O (1714 cm<sup>-1</sup>),  $\nu_s$ CH<sub>2</sub> (2856 cm<sup>-1</sup>),  $\nu_s$ CH<sub>3</sub> (2870 cm<sup>-1</sup>),  $\nu_{as}$ CH<sub>2</sub> (2925 cm<sup>-1</sup>),  $\nu_{as}$ CH<sub>3</sub> (2954 cm<sup>-1</sup>), O-H y N-H (3435 cm<sup>-1</sup>).

Estas señales fueron detectadas en las muestras usando un equipo FT-IR Perkin Elmer Spectrum 100, número de scans igual a 8, disco de KBr, rango de 4000-450 cm<sup>-1</sup> y con una relación 200 mg de KBr: 0.8 mg muestra. Los datos fueron analizados usando el software Spectragryph 1.2.16.1.

### *Análisis en la microestructura del tejido cortical:*

El análisis morfológico fue llevado a cabo con un microscopio electrónico de bajo vacío VEGA-TESCAN, y el microanálisis elemental fue realizado con un microscopio electrónico de emisión de campo FEI-Inspect 50 con EDX acoplado.

### *Análisis en la submicroestructura del tejido cortical:*

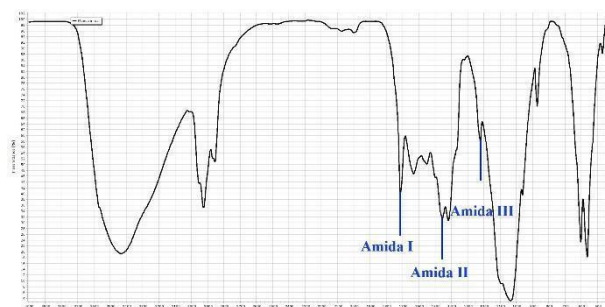
Para confirmar la presencia de las fibrillas de colágeno, las muestras fueron parcialmente desmineralizadas usando HCl diluido, siguiendo la metodología usada por Pang y colaboradores [8] con algunas modificaciones, y fue caracterizada usando un microscopio de fuerza atómica

(AFM) Bruker, con la finalidad de determinar el espaciado periódico entre bandas típico de la proteína de colágeno tipo I en hueso cortical. Las imágenes obtenidas por AFM fueron procesadas usando el software NanoScope Analysis 1.5. siguiendo la metodología usada por Su y colaboradores [9] con modificaciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis de Infrarrojo:

El estudio de los grupos funcionales de las muestras fósiles mediante la técnica de FTIR permitió identificar 18 bandas características correspondientes a la fase orgánica (proteína de colágeno tipo I), a la fase inorgánica, y a ambas clasificaciones debido a que sus señales se superponen (Fig. 1). Los resultados obtenidos fueron similares a lo reportado en varios estudios en donde se analiza material fósil y hueso cortical moderno usando FTIR [7, 10-17].



**Fig. 1.** Espectro infrarrojo correspondiente a una muestra de hueso húmero proveniente de una especie de toxodonte.

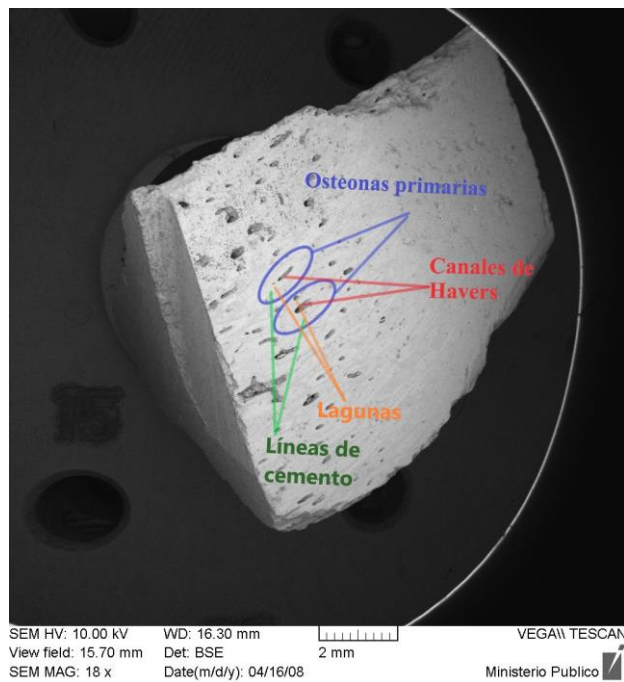
La señal en  $470\text{ cm}^{-1}$ , ocurre por vibraciones del enlace del grupo fosfato [10]. Las señales en  $564\text{ cm}^{-1}$ ,  $603\text{ cm}^{-1}$ , ocurren por vibraciones del enlace del grupo fosfato en mayor proporción y en menor proporción por vibraciones de enlace de las Amidas IV-VII [11, 12]. El modo vibracional del enlace a  $872\text{ cm}^{-1}$  es el de flexión del grupo carbonato, característico de la apatita B [11, 12].  $962$  y  $1035\text{ cm}^{-1}$  son las señales que produce el modo vibracional por estiramiento simétrico y asimétrico del grupo fosfato, respectivamente [10, 12-14]. La señal en  $1093$  es

producida probablemente por el fosfato ácido, un anión frecuentemente sustituido en la red cristalina de la hidroxiapatita [11]. Las vibraciones por estiramiento de enlaces C-N en la Amida III son mayoritariamente responsables de generar una señal en  $1222\text{ cm}^{-1}$ , aunque también las vibraciones por flexión del enlace N-H en menor proporción [7, 10-13, 15, 16]. En  $1446\text{ cm}^{-1}$  la señal se origina por vibración de estiramiento asimétrico del grupo carbonato en mayor proporción (características de la apatita tipo A), y por vibración de flexión de enlaces en el grupo metileno del colágeno en menor proporción [14]. En  $1498\text{ cm}^{-1}$  la señal es producida por la vibración de flexión tipo tijereta en el enlace del grupo metileno de la prolina, uno de los aminoácidos que conforman las cadenas polipeptídicas del colágeno tipo I [7, 13]. La señal en  $1549\text{ cm}^{-1}$  se genera por vibraciones de flexión del enlace N-H en mayor proporción, y por vibración del estiramiento del enlace C-N en menor proporción en la Amida II [7, 12, 15, 16]. La contribución mayoritaria por vibración de estiramiento del enlace C=O y una menor contribución por vibración de estiramiento del enlace C-N en la Amida I, genera la señal  $1632\text{ cm}^{-1}$  [15, 16]. La vibración del grupo carbonilo de los residuos de aminoácidos asparagina y/o glicina del colágeno tipo I, generan una señal en  $1714\text{ cm}^{-1}$  [12]. Las vibraciones por estiramiento simétrico del grupo metileno del colágeno, produce una señal en  $2856\text{ cm}^{-1}$  y por estiramiento asimétrico produce una señal en  $2925$  [12]. Las vibraciones por estiramiento simétrico del grupo metilo del colágeno, produce una señal en  $2870\text{ cm}^{-1}$  y por estiramiento asimétrico produce una señal en  $2954\text{ cm}^{-1}$  [12]. No se observaron para las Amidas A y B señales definidas. Es posible que estas señales estén superpuestas con las vibraciones generadas por el grupo -OH presente tanto en la hidroxiapatita como en el agua de coordinación, lo cual concuerda con lo obtenido por Monasterio-Guillot y col. en muestras fósiles de mamuts analizadas por FT-IR [17], por Nessleri y col. tanto en muestras de hueso cortical de ciervo moderno como en muestras de hueso cortical

arqueológico de época protobizantina [16] y por Palander y col. en muestras de hueso mandibular humano moderno [18].

#### *Análisis en la microestructura del tejido cortical:*

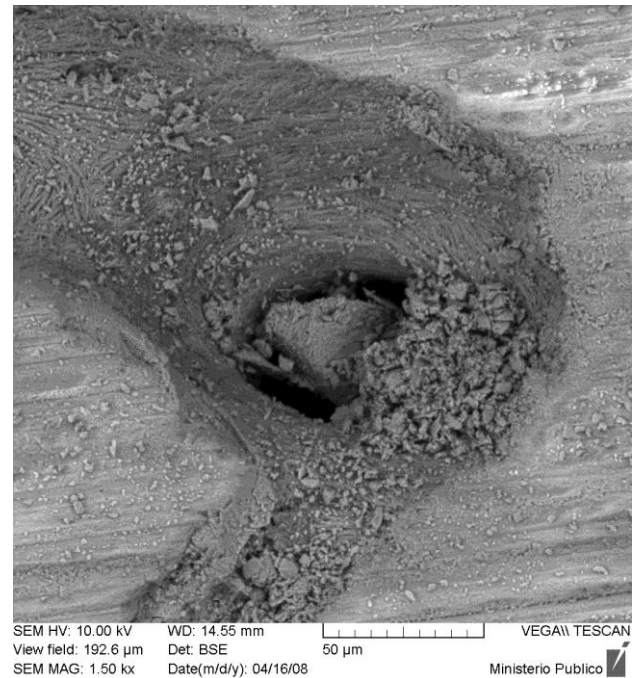
En las muestras evaluadas se observaron elementos característicos de la microestructura del tejido cortical, como osteonas primarias, canales de Havers, líneas de cemento y lagunas [19], como puede evidenciarse en la Fig. 2.



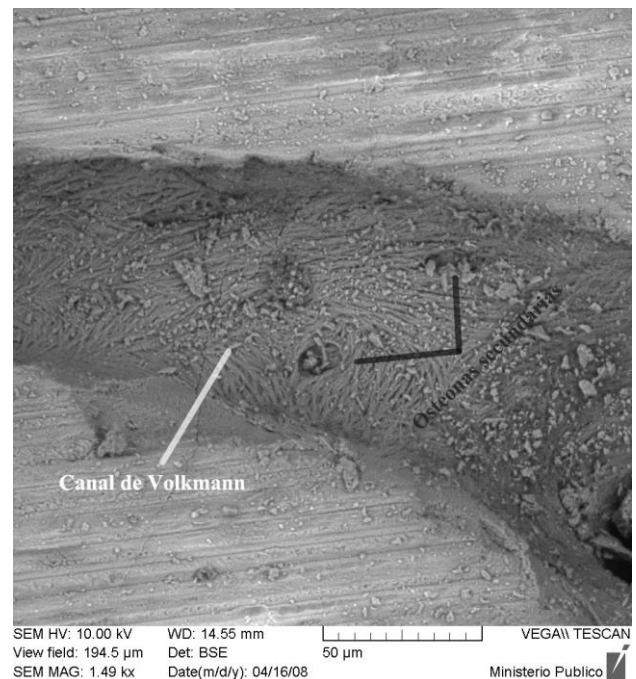
**Fig. 2.** Muestra de hueso húmero proveniente de una especie de toxodonte, observada por microscopía electrónica de barrido.

En la Fig. 3 se puede apreciar una osteona primaria con más detalle, y su correspondiente canal de Havers. Pueden observarse además lo que parecen ser algunas osteonas secundarias en el interior de un posible canal de Volkmann en la Fig. 4.

En la Fig. 5 pueden observarse fibras de colágeno tipo I con posibles terrones de material inorgánico (hidroxiapatita) alrededor de osteonas secundarias.

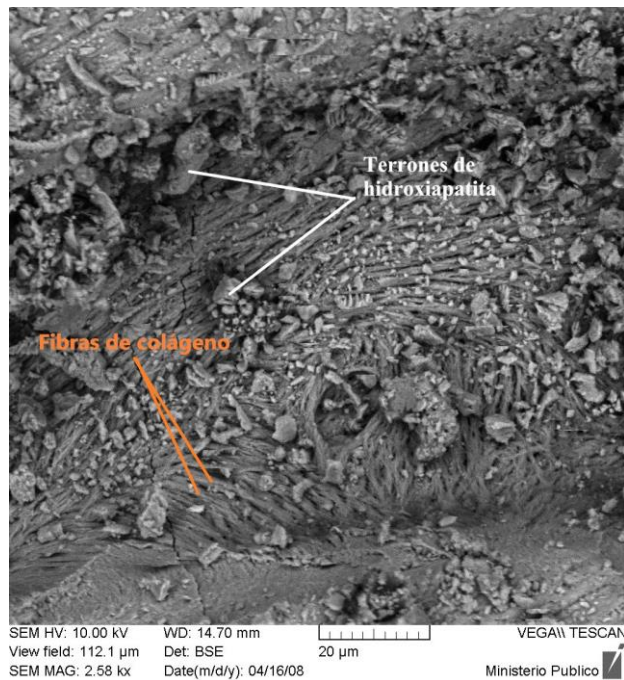


**Fig. 3.** Osteona primaria



**Fig. 4.** Osteonas secundarias

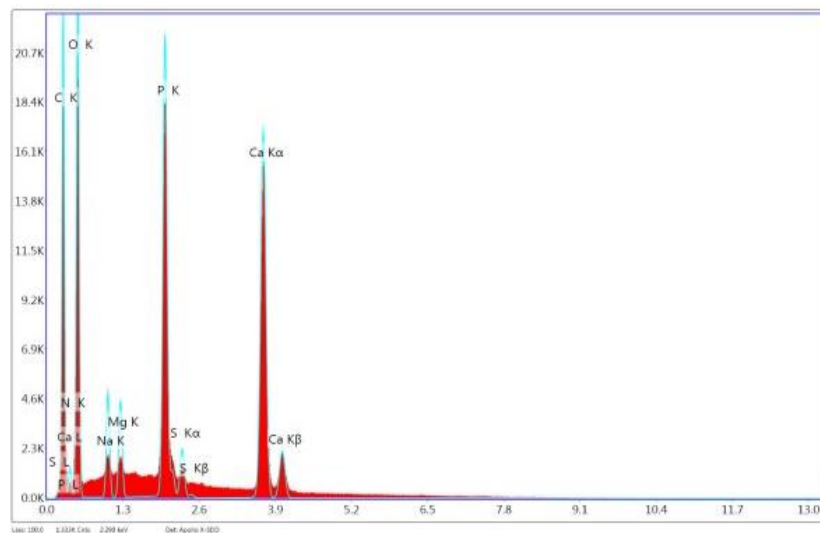




**Fig. 5.** Detalle de las fibras de colágeno y el componente mineral desprendido en forma de terrones.

Además, se detectaron en una de las muestras los elementos principales mediante microanálisis por microscopía electrónica de barrido (Fig. 6). En la Tabla 1 se enlistan los elementos encontrados con sus porcentajes en átomos y en peso correspondientes. El oxígeno resultó ser el elemento mayoritario. Este elemento está presente

en compuestos carbonados de la brea, en la hidroxiapatita (fase mineral del hueso) y en menor proporción en el colágeno (fase orgánica del hueso), con lo cual es esperable un alto porcentaje del mismo en las muestras. Igualmente, los elementos calcio y fósforo, forman parte de la fase mineral de hidroxiapatita en el tejido cortical, lo cual explica su presencia en el material fósil. Nótese la presencia de elementos como el magnesio y el sodio, lo cual puede ser un indicador de que probablemente se han iniciado procesos diagenéticos como la recrystalización por intercambio iónico de la matriz de hidroxiapatita, a través de filtraciones de agua en las piezas fósiles [19]. Como elemento minoritario se encuentra el azufre, muy probablemente debido a que se encuentra formando parte de la brea. La presencia de azufre en crudos de petróleo varía según el lugar de origen y se ha reportado entre 0,5% y 7% [20]. Por otra parte, dos elementos directamente relacionados con la presencia de colágeno son el carbono y el nitrógeno [21, 22]. Puede observarse en la Tabla 1 que se encontraron porcentajes en peso de los elementos carbono y colágeno. Coltrain y colaboradores reportaron resultados similares (mayor al 13% para el carbono y al 4,5% para el nitrógeno) en muestras fósiles extraídas de pozos de brea, de Rancho La Brea, en California – Estados Unidos [23].



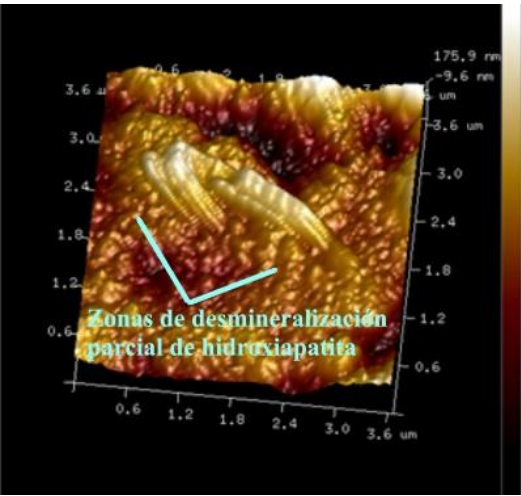
**Fig. 6.** Microanálisis semicuantitativo de una sección de hueso húmero proveniente de una especie de toxodonte, realizado con el detector EDX.

**Tabla 1.** Elementos encontrados mediante EDX

| Elemento | Porcentaje en peso (%) | Porcentaje atómico (%) |
|----------|------------------------|------------------------|
| C        | 34,87                  | 45,77                  |
| N        | 6,46                   | 7,27                   |
| O        | 36,84                  | 36,30                  |
| Na       | 2,84                   | 1,95                   |
| Mg       | 1,55                   | 1,00                   |
| P        | 6,73                   | 3,42                   |
| S        | 0,74                   | 0,36                   |
| Ca       | 9,96                   | 3,92                   |

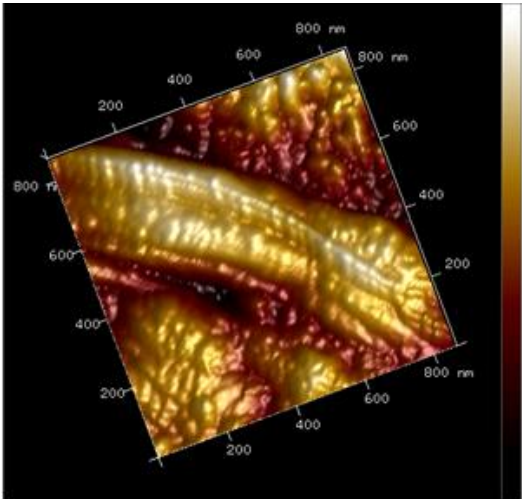
*Análisis en la submicroestructura del tejido cortical:*

En la Fig. 7 puede observarse una fibrilla de colágeno tipo I, caracterizada por microscopía de fuerza atómica en modo tapping. Se puede apreciar también en la imagen las bandas periódicas características de este tipo de proteínas. Alrededor de la fibrilla se observan zonas de la desmineralización parcial de la hidroxiapatita. En la Fig. 8 se observa una imagen tridimensional con el detalle de las bandas características. En la imagen se pueden identificar zonas más claras y otras más oscuras, que corresponden a una mayor y menor altura, respectivamente.

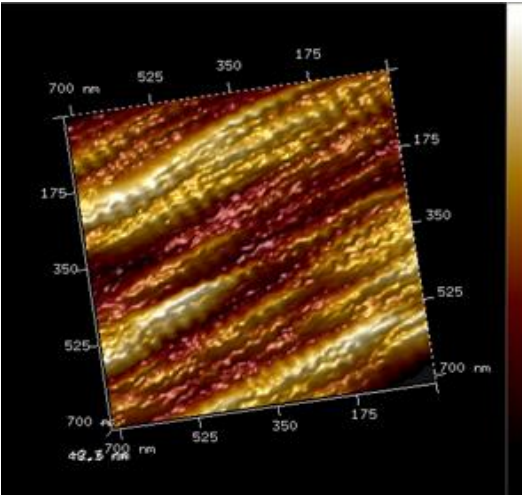


**Fig. 7.** Imagen de una fibrilla de colágeno tipo I, proveniente de hueso húmero de una especie de toxodonte.

En la Fig. 9 se puede observar con más detalle en una menor superficie las bandas características de la proteína.

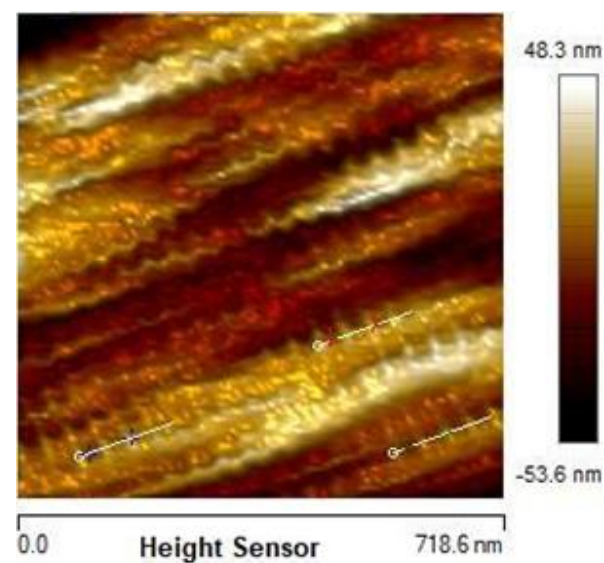


**Fig. 8.** Vista 3D de colágeno prehistórico caracterizado por microscopía de fuerza atómica (modo tapping), en una superficie de 800 nm x 800 nm.

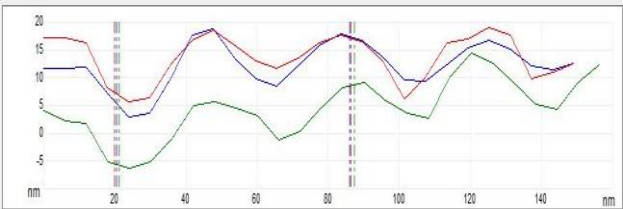


**Fig. 9.** Vista 3D de colágeno prehistórico caracterizado por microscopía de fuerza atómica (modo tapping), en una superficie de 700 nm x 700 nm.

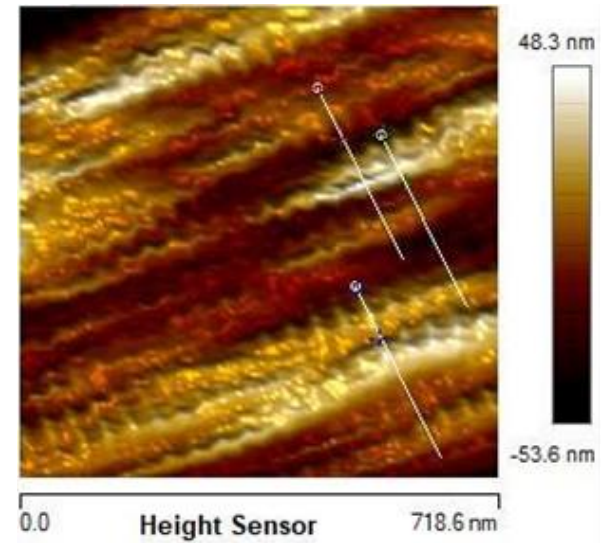
A partir de la imagen de la Fig. 9 se realizaron mediciones de secciones longitudinales (Fig. 10) para determinar la distancia periódica entre las bandas del colágeno tipo I (Fig. 11), y mediciones de secciones transversales (Fig. 12) para determinar el diámetro de las fibrillas (Fig. 13).



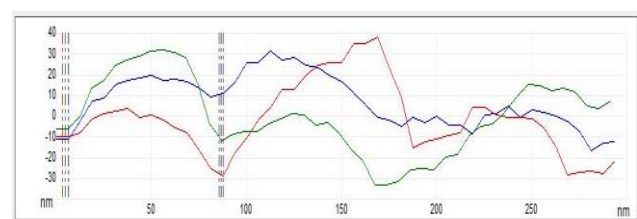
**Fig. 10.** Secciones longitudinales de colágeno prehistórico caracterizadas por microscopía de fuerza atómica (modo tapping).



**Fig. 11.** Medición de los espacios entre bandas característicos de la proteína de colágeno tipo I realizadas en tres fibrillas diferentes.



**Fig. 12.** Secciones transversales de colágeno prehistórico caracterizadas por microscopía de fuerza atómica (modo tapping).



**Fig. 13.** Medición del diámetro de tres fibrillas de colágeno tipo I.

El espaciado periódico entre bandas resultó en promedio 67 nm aproximadamente (Tabla 2), concordando con lo reportado por Su y col. para el espaciado característico de esta proteína [9].

El diámetro de las fibrillas resultó en promedio 86 nm aproximadamente (Tabla 3), lo cual es consistente con lo reportado por Khattignavong y col. para diámetros de fibrillas en este tipo de proteína [24].

**Tabla 2.** Cuantificación en nanómetros del espacio periódico entre bandas, medidas en tres fibrillas de colágeno tipo I, con base en las curvas de la Fig. 11.

| Medición        | Distancia periódica entre bandas | Ángulo de medición |
|-----------------|----------------------------------|--------------------|
| 1 (curva azul)  | 66 nm                            | 19,9 °             |
| 2 (curva roja)  | 66 nm                            | 19,9 °             |
| 3 (curva verde) | 67 nm                            | 20,2 °             |

**Tabla 3.** Cuantificación en nanómetros del diámetro de tres fibrillas de colágeno tipo I con base en las curvas de la Fig. 13.

| Medición        | Diámetro de las fibrillas | Ángulo de medición |
|-----------------|---------------------------|--------------------|
| 1 (curva azul)  | 82 nm                     | 64,0 °             |
| 2 (curva roja)  | 88 nm                     | 64,0 °             |
| 3 (curva verde) | 87 nm                     | 64,0 °             |

**CONCLUSIONES**

La combinación de técnicas espectroscópicas con diferentes tipos de Microscopías permitió la caracterización inequívoca de la presencia de fibras preservadas de colágeno tipo I en las muestras del fósil

pertenecientes a un mamífero extinto del género *Toxodon*, cuyo fósil fue extraído del Breal de Orocuá. Estos resultados abren la posibilidad de ahondar en investigaciones sobre datación, paleodietas y paleoecología en fósiles de megafauna hallados en territorio venezolano.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Ascanio Rincón y al Lic. Omar Sumoza, del Laboratorio de Paleontología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, por habernos suministrado las muestras fósiles necesarias para este estudio. Así mismo, agradecen a la Lic. Damarys Soto, a la T.S.U. Iraima Vásquez y al T.S.U. Rafael Tovar, del Laboratorio de Caracterización Estructural y Magnética de Materiales, adscrito al Centro de Ingeniería de Materiales y Nanotecnología del IVIC, por la colaboración técnica en el estudio de FT-IR y en la preparación de las muestras tanto para el microanálisis mediante EDX como para la obtención de imágenes por Microscopía de Fuerza Atómica. Igualmente, agradecen al Ing. Douglas Sojo Grimán, de la Unidad Especializada adscrita al Ministerio Público de la República Bolivariana de Venezuela, por la colaboración técnica en los estudios de Microscopía Electrónica de Barrido.

**CONFLICTO DE INTERESES:** Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

[1] Sholts S.B., Hlusko L.J., Carlson J.P., Wärmländer. (2021) "Differential taphonomic effects of petroleum seeps and karstic sinkholes on ancient dire wolf teeth: Hydrocarbon impregnation preserves fossils for chemical and histological analysis" *BiorRxiv* 01.04.425345.

[2] Mychajliw A.M., Mohammed R.S., Rice K.A., Farrell A.B., Rincón A.D., McAfee R., McDonald H.G., Lindsey E.L. (2020) "The biogeography of "breas": Contextualizing the taphonomy, ecology, and diversity of

Trinidad's asphaltic fossil record" *Quat. Sci. Rev.*, 232:106-179.

[3] Solórzano A., Rincón A.D., Gregory McDonald H. (2015). "A New Mammal Assemblage from the Late Pleistocene El Breal de Orocuá, Northeast of Venezuela." *Science series* 42:125-150.

[4] Wyckoff R.G., Doberenz A.R. (1965). "The electron microscopy of Rancho La Brea bone" *Geology* 53: 230-232.

[5] Fox N.S., Southon J.R., Howard C.M., Takeuchi G.T., Cerling T.E., Potze S., Farrell A.B., Lindsey E.L., Blois J.L. (2023) "Millennial-scale drivers of small mammal isotopic niche dynamics in southern California" *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 612 111378.

[6] DeSantis L.R.G., Crites J.M., Feranec R.S., Harris J.M., Takeuchi G.T., Cerling T.E. (2019) "Causes and Consequences of Pleistocene Megafaunal Extinctions as Revealed from Rancho La Brea Mammals". *Current Biology*, 29 2488-2495.

[7] Vitale P., Tasca J., Bax M., Flores A., Politis G. y Valenzuela L. (2019). "Análisis mediante FTIR de la conservación del colágeno y la posible contaminación en muestras óseas del cuaternario pampeano" *An arq etnol.*, 74: 169-189.

[8] Buss D.J., Kröger R., McKee M.D., Reznikov N. (2022) "Hierarchical organization of bone in three dimensions: A twist of twists" *J. Struct. Biol.*: X, 6: 100057.

[9] Su H-N., Ran L-Y., Chen Z-H., Qin Q-L., Mei Shi, Song X-Y., Chen X-L., Zhang Y-Z. y Xie B-B. (2014). "The ultrastructure of type I collagen at nanoscale: large or small D-spacing distribution?" *Nanoscale*, 6:8134–8139.

[10] Nessler E., Boyatzis S.C., Boukos N. y Panagiaris G. (2020) "Optimizing the biomimetic synthesis of hydroxyapatite for the consolidation of bone using diammonium phosphate, simulated body fluid, and gelatin" *SN Appl. Sci.*, 2:1892.



- [11] Figueiredo M.M., Gamelas J.A.F. y Martins A.G. (2012) "Characterization of Bone and Bone-Based Graft Materials Using FTIR Spectroscopy". *Infrared Spectroscopy - Life and Biomedical Sciences, InTech*, Cap. 18: 315-338.
- [12] Lee Y-C., Chiang C-C., Huang P-Y., Chung C-Y., Huang T.D., Wang C-C., Chen C-I., Chang R-S., Liao C-H. y Reiz R.R. (2017) "Evidence of preserved collagen in an Early Jurassic sauropodomorph dinosaur revealed by synchrotron FTIR microspectroscopy". *Nat. Commun.*, 8(14220): 1-8.
- [13] Butler D.H. y Shahack-Gross. (2017) "Formation of Biphasic Hydroxylapatite-Beta Magnesium Tricalcium Phosphate in Heat Treated Salmonid Vertebrae". *Sci. Rep.*, 7(3610): 1-11.
- [14] Thomas B., McIntosh D., Fildes T., Smith L., Hargrave F., Islam M., Thompson T., Layfield R., Scott D., Shaw B., Burrell C. L., Gonzalez S. y Taylor S. (2017) "Second-harmonic generation imaging of collagen in ancient bone" *Bone Reports*, 7: 137-144.
- [15] Martínez Cortizas A. y López-Costas O. (2020) "Linking structural and compositional changes in archaeological human bone collagen: an FTIR-ATR approach" *Sci Rep*, 10:17888.
- [16] Müller A., Raum K., Hesse B., Castillo-Michel H., Cotte M. (2015) "Impact of chemical composition on microscale elastic properties of cortical bone - A site-matched FTIR-SAM study" *Spectroscopy*, 21: 91-103.
- [17] Monasterio-Guillot L., Crespo-López L., Rodríguez Navarro A.B. y Álvarez-Lloret P. (2022) "Comparative Study of the Mineralogy and Chemistry Properties of Elephant Bones: Implications during Diagenesis Processes" *Minerals*, 12(11): 1384.
- [18] Anni Palander A., Fauch L., Turunen M.J., Dekker H., Schulten E.A.J.M., Koistinen A., Bravenboer N. y Kullaa A. (2022) "Molecular Quantity Variations in Human-Mandibular-Bone Osteoid" *Calcif Tissue Int*, 111:547-558.
- [19] Senter P.J. (2022). "Cells and soft tissues in fossil bone: A review of preservation mechanisms, with corrections of misconceptions" *Palaeontol. Electron*, 25: 1-52.
- [20] Green J.B., Yu S.K-T., Pearson C.D., Reynolds J.W. "Analysis of sulphur compound types in asphalt" (1993). *Energy & fuels*, 7: 119-126.
- [21] Van Klinken, G.J. (1999) "Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements". *J. Archaeol. Sci.*, 26: 687-695.
- [22] Harbeck, M. & Grupe, G. (2009) "Experimental chemical degradation compared to natural diagenetic alteration of collagen: Implications for collagen quality indicators for stable isotope analysis". *Archaeol. Anthropol. Sci.*, 1: 43-57.
- [23] Coltrain J., Harris J., Cerling, T., Ehleringer J., Dearing M.D., Ward J., Allen J. (2004) "Rancho La Brea stable isotope biogeochemistry and its implications for the palaeoecology of late Pleistocene, coastal southern California". *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*, 205:199-219.
- [24] Khattignavong E., Neshatian M., Vaez M., Guillermin A., Tauer J.T., Odlyha M., Mittal N., Komarova S.V., Zahouani H. y Bozec L. (2023) "Development of a facile method to compute collagen network pathological anisotropy using AFM imaging". *Sci Rep*, 13: 20173.