colmed
natural bioinnovation

A.3 EXTRACCIÓN DE COLÁGENO

A3.1 Establecimiento de una metodología práctica y optimizada.

Cofinanciado por la Unión Europea
MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN
Fondos Europeos
GOBIERNO DE ESPAÑA
VICEPRESIDENCIA TERCERA DEL GOBIERNO
MINISTERIO PARA LA TRANSICIÓN ECOLÓGICA Y EL RETO DEMOGRÁFICO
Fundación Biodiversidad
Pleamar
Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir
IMEDMAR
Institut de Ciències del Mar
EXCELENCIA SEVERO OCHOA
CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE COLÁGENO DE MEDUSAS

1.1 ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS: LIOFILIZACIÓN

1. **Secado primario:**
   - **Etapa 1:** de -40 grados, 0,1 mbar de presión cámara a 10 grados, 0,15 mbar presión cámara, 12 horas. Subida de temperatura de 2,5 grados/hora.
   - **Etapa 2:** de 10 grados, 0,15 mbar presión cámara a 30 grados, 0,18 mbar presión cámara,16 horas. Subida de temperatura de 1,25 grados/hora.

2. **Secado secundario:** 30 grados, 0,18 mbar presión cámara, 20 horas.

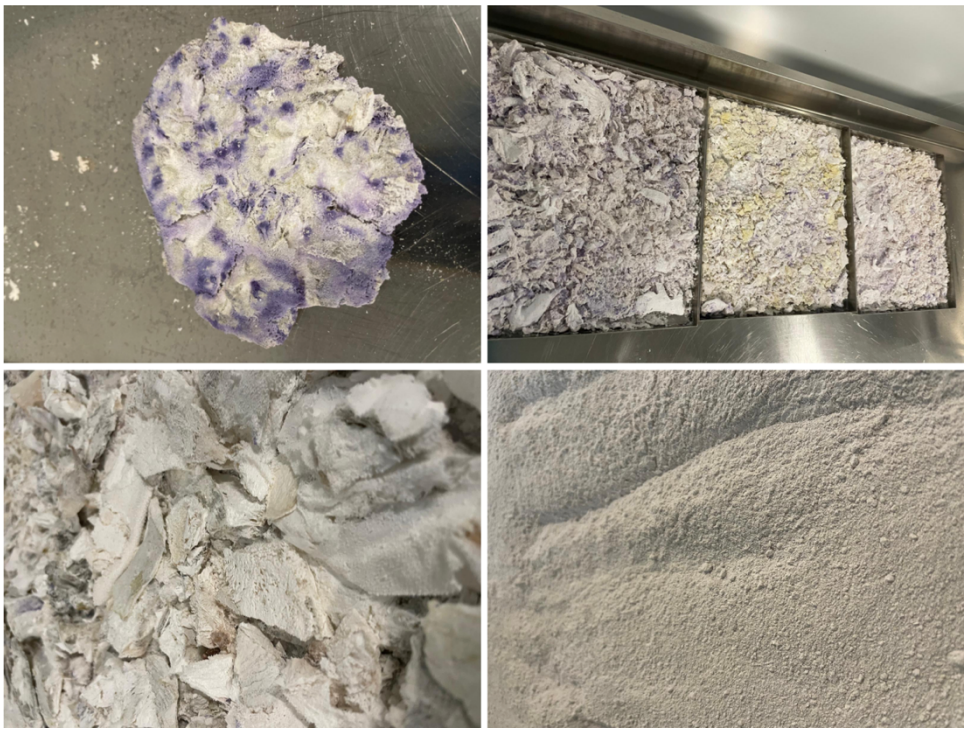

Figura 1. Proceso de liofilización de medusas.

Almacenamiento:

1. Envasa las muestras en atmosfera de nitrógeno y almacénalas a temperatura ambiente.

2.2 EXTRACCIÓN DE COLÁGENO

2.2.1 PRETRATAMIENTO

Soluciones a 4°C:

1. Solución de NaOH al 0.1 M

Eliminación de proteínas no-colagenasas:

1. Mezcla el polvo de medusa liofilizada con la solución de NaOH 0.1 M en una proporción de 1:50 (p/v) (Figura 2) y mantén la mezcla en agitación constante utilizando un agitador magnético a 4 °C durante 24 horas. Tapa los vasos de precipitado con papel de aluminio.

   NOTA: Ratio de pretratamiento 1:50(p/v): Por ejemplo, 1 g de polvo de medusa liofilizada por cada 50 ml de solución de NaOH.

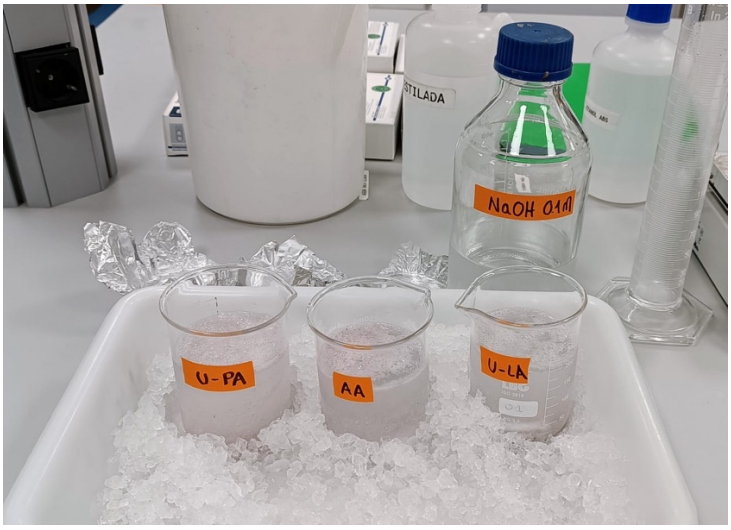

Figura 2. Mezcla de polvo de medusa liofilizada con la solución de NaOH 0.1 M.

2. **Cambio de medio:** Renueva la solución de NaOH dos veces durante el pretratamiento.

   - Transfiere la mezcla de los vasos de precipitado a tubos de centrifuga y centrifuga a 4 °C y 10.000 rpm durante 10 minutos (Figura 3).
   - Una vez completada la centrifugación, elimina cuidadosamente el sobrenadante y resuspende el pellet en una nueva solución de NaOH 0.1 M manteniendo la proporción inicial 1:50 (p/v) con la ayuda del Vortex.

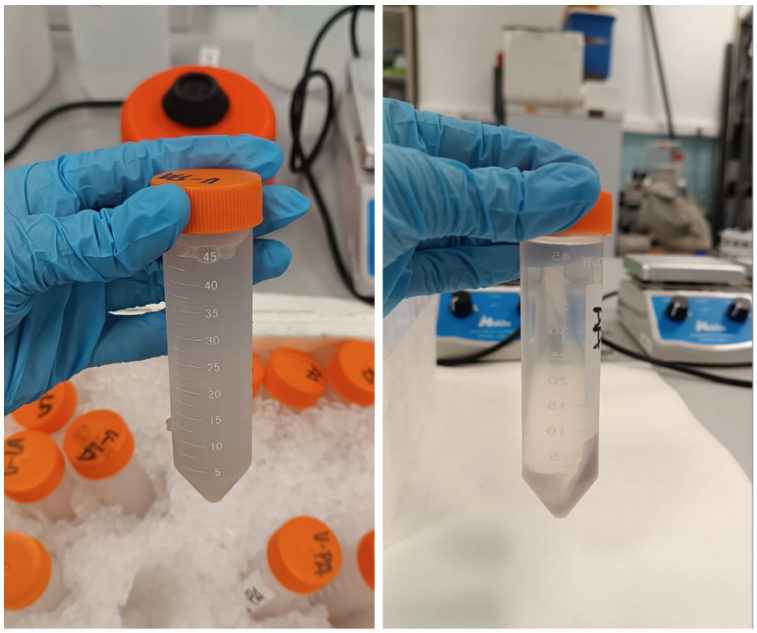

Figura 3. Antes y después del pretratamiento tras la centrifugación.

- Tras la última renovación del NaOH, elimina el sobrenadante y realiza un lavado de la muestra con agua destilada a 4°C. Centrifuga nuevamente para retirar el sobrenadante (agua destilada) antes de empezar el proceso de extracción de colágeno.

2.2.2 EXTRACCIÓN

Soluciones a 4°C:

1. Solución de ácido acético 0.5 M

Extracción del colágeno:

1. Mezcla el polvo de medusa liofilizada pretratado anteriormente con el ácido acético 0.5 M en un ratio de extracción 1:30 (p/v) en un vaso de precipitado y mantén la mezcla en agitación constante a 4 °C durante 72 horas. Tapa los vasos de precipitado con papel de aluminio (Figura 4).
2. Tras las 72h de extracción, centrifuga nuevamente para recuperar el sobrenadante y descartar las partículas no solubles (5000 rpm durante 1h).

NOTA: Ratio de extracción 1:30 (p/v): Por ejemplo, para 1 g de medusa liofilizada y pretratada se necesita 30 ml de ácido acético 0.5 M.

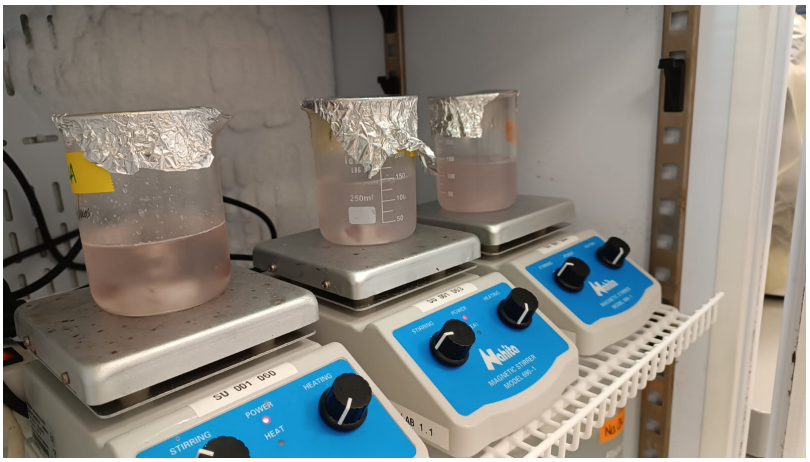

Figura 4. Extracción de colágeno.

Precipitación del colágeno:

1. Añade NaCl a una concentración 1 M: Pesa la sal en un recipiente y añade a la muestra poco a poco con una agitación constante a 4ºC.
2. Deja precipitar el colágeno sin agitación durante 24h a 4ºC.
3. Reparte la muestra en falcón de 50 ml para centrifugar a 5.000 rpm durante 1 hora a 4ºC y obtener el colágeno en el precipitado (pellet).
4. Resuspende el colágeno precipitado en ácido acético 0.5 M

Purificación del colágeno (diálisis):

1. Introduce la muestra en la membrana de diálisis.
2. Dializa usando 3L o 5L de **0.1M** de ácido acético en un vaso de precipitado en agitación a 4ºC un día, **0.05M** el segundo día, y **0.025M** el tercer día. Tiempo total de la diálisis= 72h.
3. **Cambio de medio durante las 72h de diálisis:** cambia la solución de diálisis cada 4 o 5h (3 cambios por día) durante toda la diálisis a la concentración que toque.
4. Mide la conductividad de la solución. El proceso de diálisis termina cuando la conductividad de la solución es igual la de la solución de ácido acético 0.025M.

2.2.3 ALMACENAMIENTO

1. Liofiliza el precipitado y almacena el colágeno en el congelador a -20ºC.

2. CARACTERIZACIÓN DEL COLÁGENO EXTRAÍDO

2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Se realizó un análisis por SDS-PAGE para comprobar el perfil electroforético del colágeno extraído de *R. pulmo* y compararlo con un colágeno tipo I comercial de rata utilizado como referencia (Figura 5).

El extracto de colágeno de *R. pulmo* presentó un patrón de bandas compatible con un colágeno fibrilar. Se observaron dos bandas principales correspondientes a las cadenas α1 y α2, con pesos moleculares aproximados de 150 y 160 kDa, respectivamente, así como una banda β en torno a 260 kDa.

El colágeno de referencia mostró igualmente las bandas α1 y α2 esperadas, con pesos moleculares aproximados de 129 y 139 kDa, y una banda β alrededor de 260 kDa.

La comparación entre ambas muestras indica que el colágeno extraído conserva un perfil molecular compatible con una estructura colagénica íntegra. La ausencia de bandas marcadas de bajo peso molecular sugiere que no se produjo una degradación significativa durante las etapas de pretratamiento, extracción, precipitación y purificación.

Adicionalmente, en la muestra de *R. pulmo* se detectó una banda en la zona de 90–100 kDa que no aparece en el control comercial. Esta señal puede asociarse a componentes proteicos propios de la especie o a fracciones asociadas al colágeno presentes en el extracto.

Se observó también una menor intensidad de las bandas en la muestra de *R. pulmo* respecto al control. Este comportamiento es compatible con una solubilización parcial del extracto durante la preparación de la muestra para el análisis, lo que podría haber afectado a la cantidad de proteína efectivamente cargada y a su migración en el gel, sin comprometer la interpretación global del perfil colagénico.

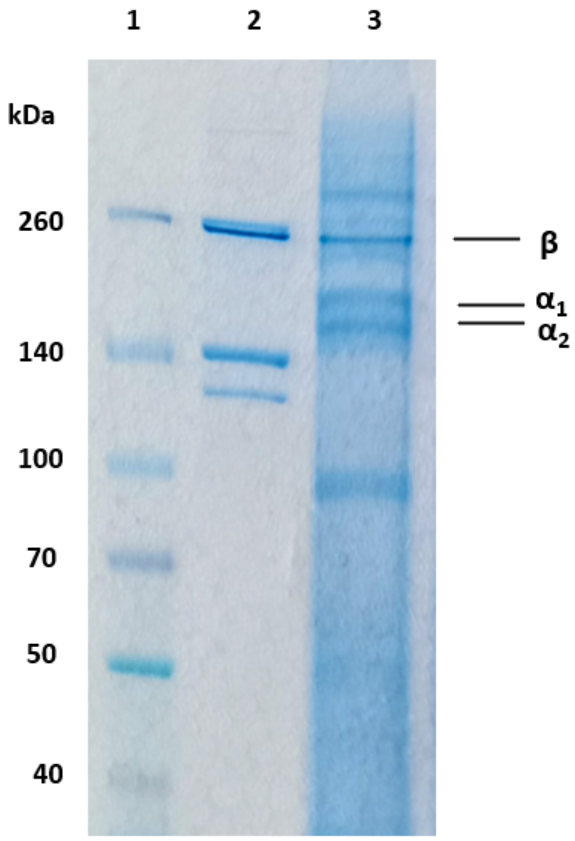

Figura 5. Análisis SDS-PAGE (1) Marcadores de peso molecular. (2) Colágeno tipo I de cola de rata (3) Colágeno de *Rhizotoma pulmo*.

2.2. Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Las muestras de colágeno se analizaron mediante FTIR-ATR tras su liofilización, utilizando un espectrómetro Agilent Cary 630 FTIR, en el rango de 4000–650 cm^{-1}, con una resolución de 4 cm^{-1} y 32 barridos por muestra.

El espectro obtenido (Figura 6) mostró las bandas características del colágeno, correspondientes a las amidas A, B, I, II y III. Se identificaron los siguientes máximos de absorción:

- Amida A: 3278 cm^{-1}
- Amida B: 2918 cm^{-1}
- Amida I: 1644 cm^{-1}
- Amida II: 1551 cm^{-1}
- Amida III: 1234 cm^{-1}

La presencia de estas señales confirma la naturaleza colagénica del material extraído. En particular, las bandas de amida I, II y III son indicativas de la estructura peptídica característica del colágeno, mientras que la conservación

del patrón general del espectro indica que la estructura secundaria de la proteína se mantiene tras el proceso de extracción y purificación.

En conjunto, los resultados de FTIR confirman que el material obtenido corresponde a colágeno y que no presenta evidencias de desnaturalización estructural significativa.

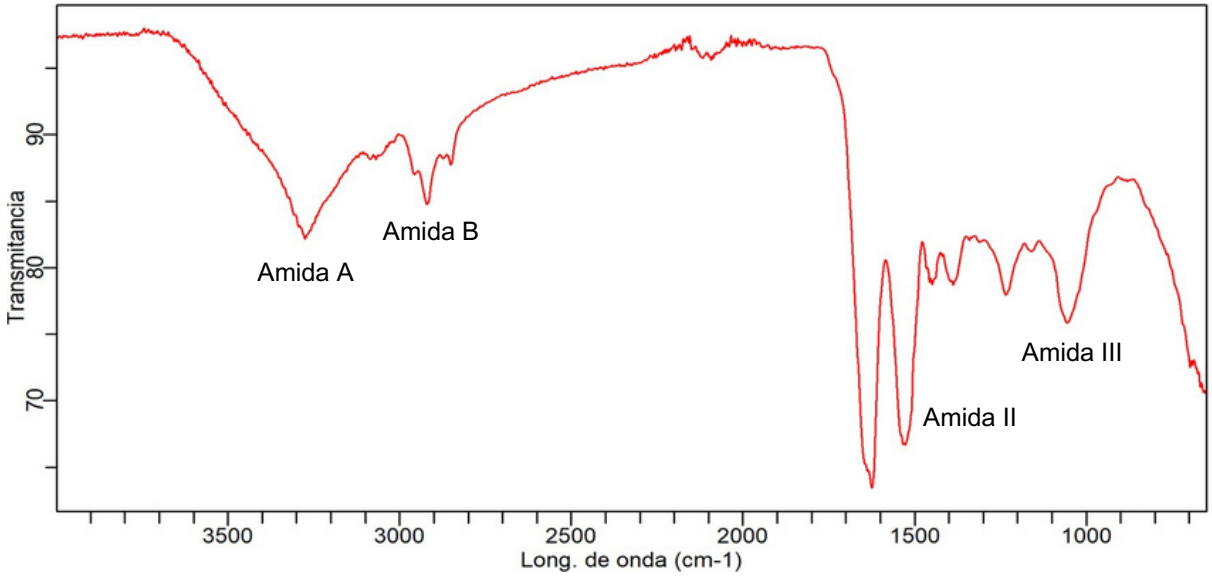

Figura 6. Espectro FTIR del colágeno extraído de *Rhizostoma pulmo.*

2.3. Difracción de rayos X (XRD)

El colágeno liofilizado se caracterizó mediante difracción de rayos X utilizando un difractómetro Bruker D8 Advance Twin–Twin, con radiación Cu Kα (λ = 1,5406 Å). Los patrones de difracción se registraron en un rango de 2θ de 5–40°, con un paso de 0,02° y un tiempo de conteo de 1 s por paso.

El difractograma obtenido mostró dos picos principales localizados en 2θ = 8,6° y 19,4° (Figura 7). A partir de estos valores se calcularon distancias interplanares de 10,27 Å y 4,57 Å, respectivamente.

El pico situado en 8,6° se asocia al espaciamiento intermolecular característico de la triple hélice del colágeno. El pico situado en 19,4° corresponde a la organización estructural interna de las cadenas polipeptídicas. Ambos valores son compatibles con la disposición estructural típica del colágeno en estado nativo.

Por tanto, el análisis por XRD confirma que el colágeno extraído mantiene su organización molecular característica y que la estructura helicoidal no se ha visto alterada de forma relevante durante el proceso de extracción.

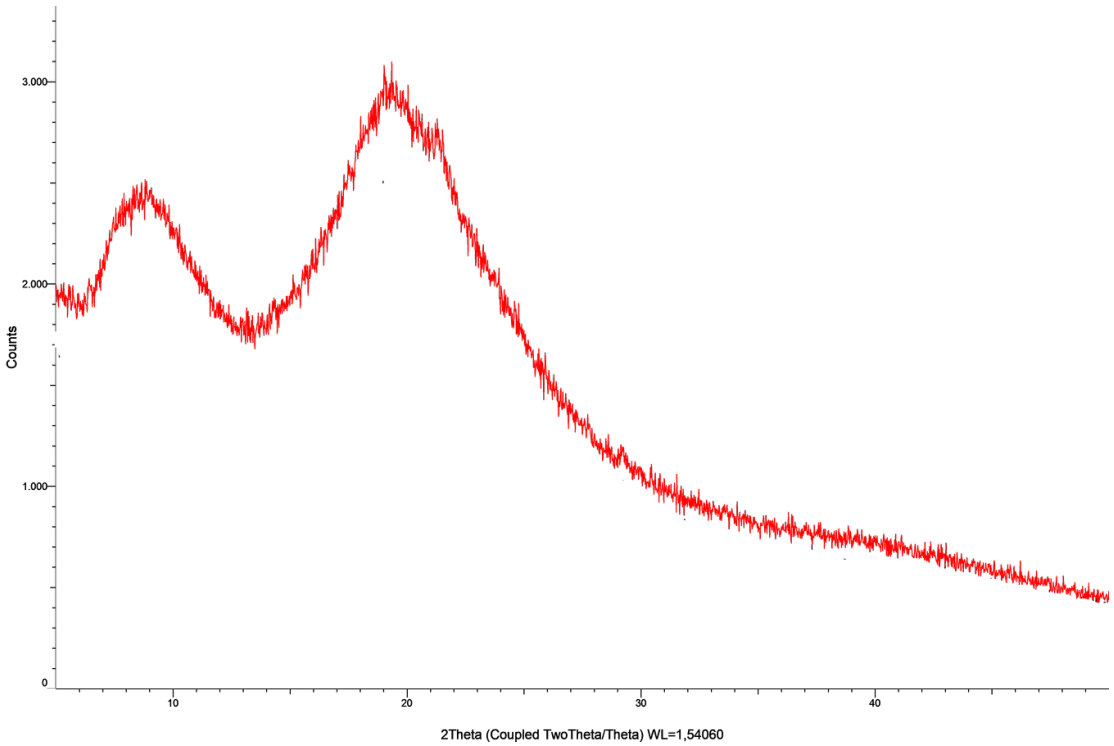

Figura 3. Difractograma de rayos X (DRX) del colágeno de *Rhizostoma pulmo*.

3. CONCLUSIÓN

El protocolo de extracción aplicado a muestras de medusa permitió obtener colágeno con características estructurales y moleculares compatibles con un colágeno de buena calidad.

Los resultados de SDS-PAGE mostraron un perfil proteico típico de colágeno fibrilar y sin indicios de degradación significativa. El análisis FTIR confirmó la presencia de las bandas funcionales características del colágeno y la conservación de su estructura secundaria. Por su parte, el análisis XRD evidenció la preservación de la organización molecular propia de la triple hélice.

En conjunto, la caracterización realizada permite validar el protocolo de extracción, ya que el colágeno obtenido presenta una calidad adecuada y mantiene las características estructurales esperadas para este tipo de biomolécula.

Cofinanciado por la Unión Europea
MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN
Fondos Europeos
GOBIERNO DE ESPAÑA
VICEPRESIDENCIA TERCERA DEL GOBIERNO
MINISTERIO PARA LA TRANSICIÓN ECOLÓGICA Y EL RETO DEMOGRÁFICO
Fundación Biodiversidad
Pleamar
Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir
IMEDMAR
Institut de Ciències del Mar
EXCELENCIA SEVERO OCHOA
CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS