

Caracterización de proteínas de flores de *Geranium* (geranio) y evaluación de la capacidad antiinflamatoria y antioxidante

Characterization of *Geranium* (geranium) flower proteins and evaluation of anti-inflammatory and antioxidant capacity

Rubén Vilcacundo^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-7430-1047>

Edwin Tapia¹ <https://orcid.org/0000-0001-6213-9495>

Mayra Paredes¹ <https://orcid.org/0000-0001-9320-9177>

Elena Beltrán² <https://orcid.org/0000-0001-61465301>

¹ Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, Laboratorio de Alimentos Funcionales, Ambato Ecuador.

²Universidad Politécnica Salesiana, Sede Quito. Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, Grupo de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas a los Recursos Biológicos, Quito Ecuador.

* Autor para la correspondencia: rubenevolution@yahoo.com

RESUMEN

Introducción: Las flores comestibles como el *Geranium* poseen un alto contenido de compuestos biológicamente activos como los fenoles y proteínas que tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. Por muchos años, los extractos de flores tienen un alto interés en la industria alimentaria y farmacéutica para la fabricación de productos nutraceuticos y farmacológicos.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue caracterizar las proteínas de flores de geranio usando SDS-PAGE y evaluar su capacidad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro*.

Métodos: Las proteínas de geranio fueron obtenidas usando el método de

precipitación isoeléctrica y analizadas por la técnica de SDS-PAGE. La simulación gastrointestinal in vitro se la realizó en tres fases: oral, gástrica y duodenal. La actividad antiinflamatoria se evaluó usando el método de potencial de estabilización de la membrana y la actividad antioxidante por el método ABTS.

Resultados: El contenido de proteína en el concentrado fue de 18 %, el gel de poliacrilamida indica la presencia de bandas de proteína que comprenden pesos moleculares entre 60 kDa a 5 kDa. Las proteínas aisladas de geranio son susceptibles a la digestión gastrointestinal. En la evaluación de la actividad antiinflamatoria, el concentrado de proteína presentó 38,41 % de protección y en la actividad antioxidante 4897,42 umol TE/ g muestra.

Conclusiones: Las proteínas de geranio presentan alta actividad antiinflamatoria y antioxidante pudiendo ser usados como ingrediente funcional en la elaboración de productos alimenticios, nutracéuticos y farmacéuticos.

Palabras clave: Geranium; proteínas; digestibilidad; actividad antiinflamatoria; actividad antioxidante.

ABSTRACT

Introduction: Edible flowers such as Geranium have a high content of biologically active compounds such as phenols and proteins that have antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties. For many years, flower extracts have been of great interest in the food and pharmaceutical industry for the manufacture of nutraceutical and pharmacological products.

Objective: The objective of this study was to characterize geranium flower proteins using SDS-PAGE and to evaluate their anti-inflammatory and antioxidant capacity in vitro.

Methods: Geranium proteins were obtained using the isoelectric precipitation method and analyzed by the SDS-PAGE technique. In vitro gastrointestinal simulation was performed in three phases: oral, gastric and duodenal. Anti-inflammatory activity was evaluated using the membrane stabilization potential

method and antioxidant activity by the ABTS method.

Results: The protein content in the concentrate was 18%, the polyacrylamide gel indicates the presence of protein bands that comprise molecular weights between 60 kDa and 5 kDa. Isolated geranium proteins are susceptible to gastrointestinal digestion. In the evaluation of the anti-inflammatory activity, the protein concentrate presented 38.41% protection and in the antioxidant activity 4897.42 umol TE/g sample.

Conclusions: Geranium proteins have high anti-inflammatory and antioxidant activity and can be used as a functional ingredient in the production of food, nutraceutical and pharmaceutical products.

Keywords: Geranium; proteins; digestibility; anti-inflammatory activity; antioxidant activity.

Recibido: 31/01/2022

Aceptado: 27/08/2024

Introducción

Las plantas de la familia Geraniaceae son cultivadas en climas subtropicales y templados, constituyen alrededor de 750 especies y la mayoría son originarios de Europa y África. Se conoce que una diversidad de especies de esta planta contiene compuestos que tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. Se estima que el número de fitoquímicos responsables de estas actividades biológicas identificados en plantas, frutas y verduras es mayor a 5000, pero los beneficios para la salud de estos y otros fitoquímicos en los alimentos están poco estudiados.⁽¹⁻³⁾

Las flores comestibles podrían considerarse alimentos funcionales debido a su contenido de compuestos biológicamente activos como los fenoles y proteínas que se encuentra en las flores y son en su mayoría responsables del color ⁽⁴⁾. El interés de las antocianinas se ha intensificado debido a sus propiedades

farmacológicas y terapéuticas, estudios recientes han demostrados efectos inhibitorios contra algunas enfermedades como el cáncer. Además, estos compuestos antioxidantes son usados en la industria alimentaria para preservar alimentos que sufran procesos de oxidación lipídica.⁽⁵⁻⁶⁾

Géneros de *Pelargonium* y *Geranium* de la familia Geraniaceae y se ha utilizado en la medicina popular en muchos países debido a su actividad antiinflamatoria.⁽⁷⁾

Recientemente, Choi et al investigaron los mecanismos responsables de la actividad antiinflamatoria especialmente en el aceite de geranio como el citronelol y geraniol.⁽⁸⁾

Geranium en su mayoría son conocidas como plantas ornamentales; sin embargo, también se utiliza en la fabricación de medicamentos por sus propiedades medicinales. La literatura incluye estudios que utilizan varios flavonoides en extractos extraídos del geranio como quercetina 3-O-glucósido, quercetina 3-O-pentosa, kaempferol 3-O-glucósido, kaempferol 3,7-di-O-glucósido, mirisetina 3-O-glucósido-ramnósido y quercetina 3-O-ramnósido-glucósido.^(2,9)

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las proteínas de flores de geranio usando SDS-PAGE y evaluar su capacidad antiinflamatoria y antioxidante durante la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Métodos

Obtención de la materia prima

Las flores orgánicas comestibles de geranio se adquirieron en la empresa Florestibles. Ec, ubicada en la ciudad de Quito, Ecuador. Aproximadamente 1000 g de flores fueron liofilizadas y luego pulverizadas en un molino marca Retsch, modelo Cyclone Twister. Estas fueron conservadas en fundas ziploc a temperatura de refrigeración.

Obtención del aislado de proteína de flor de geranio

La extracción de las proteínas de geranio se realizó siguiendo la metodología descrita por Lara con modificaciones. El polvo de geranio fue suspendido en agua

destilada en una relación 1:10 (p/v), la suspensión fue agitada durante 30 min y ajustada el pH a 8.0 utilizando NaOH 2N. La mezcla fue centrifugada a 5000 RPM durante 30 min a temperatura de 5 °C. El sobrenadante obtenido fue acidificado a pH de 3.0 con HCl 2N, nuevamente se centrifugó la solución a 5000 RPM POR 30 min. Finalmente, el precipitado obtenido fue congelado a -80 °C y liofilizado en un equipo marca CHRIST.⁽¹⁰⁾

Determinación del contenido de proteína de los aislados de geranio

El contenido de proteína de los aislados de geranio se determinó mediante la metodología de Dumas usando un equipo marca ELEMENTAR. El porcentaje de proteína de los aislados de geranio se calculó mediante la ecuación % proteína = 6.25 x % N, donde 6.25 es el factor de conversión y N el porcentaje de nitrógeno determinado por el equipo.⁽¹¹⁾

Simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal de la proteína de flor de geranio

La simulación de la digestibilidad gastrointestinal *in vitro* fue realizada mediante el método propuesto por Vilcacundo et al con modificaciones. Para la fase oral se disolvieron 5 g de muestra con 5 ml de SSF que contenía enzima α -amilasa en una concentración de 75 U/ml, ajustado a pH 7.0, la reacción se llevó durante 2 min. En la fase gástrica se utilizó la muestra ensayada en la fase oral, se añadió SGF más enzima pepsina de origen porcino en una concentración de 2000 U/ml, la relación de la mezcla de la digestión final fue 1:1 (v/v), el digerido gástrico fue ajustado a pH 2.0 e incubado a 37 °C durante 120 min. El hidrolizado gástrico obtenido fue combinado con SIF y mezclado con solución de enzima pancreatina (100 U/ml) y bilis 10 mM, la mezcla fue llevada a 37 °C durante 2 horas, la reacción se desactivó mediante tratamiento térmico (80 °C por 15 min).⁽¹²⁾ Los hidrolizados obtenidos fueron liofilizados y conservados a -20 °C.

Caracterización de las proteínas de geranio por la técnica SDS-PAGE

Las proteínas de geranio fueron sometidas a un campo eléctrico de 200 V durante 30 min en presencia de un buffer Tris-HCl empleando un equipo marca Bio Rad,

los geles obtenidos se tiñeron con azul de Coomassie durante 12 horas, luego estos fueron desteñidos con solución de metanol y ácido acético. Como estándar de referencia se utilizó una mezcla de proteínas de pesos moleculares conocidos (2 a 250 kDa).⁽¹³⁾ Finalmente, los geles fueron fotografiados mediante el quipo fotodocumentador marca Analytik Jena y analizados con el software Vision Work.

Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los aislados proteicos de geranio

Se mezclaron en proporción 1:1 la solución ALSEVER con la sangre extraída de humanos que no utilizaron ningún AINE durante quince días antes de la recogida de sangre. La mezcla fue centrifugada a 4000 RPM por 30 min. El sedimento celular se lavó con solución salina al 9 % para obtener una suspensión de sangre final del 10 %. La mezcla de la reacción contenía 1,0 ml de tampón fosfato, 1,0 ml de extracto de muestra, 0,5 ml de suspensión de sangre (10 %) y 2,0 ml de solución salina al 3,6 %. Las muestras fueron incubadas durante 30 min a 37 °C y después centrifugadas a 10000 RPM por 10 min. El contenido de hemoglobina del sobrenadante se midió a una longitud de onda de 560 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de protección % PP, se utilizó como estándar diclofenaco sódico.⁽¹⁴⁾

$$\% PP = 100 - \frac{Abs\ muestra}{Abs\ control} * 100$$

Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los aislados proteicos de geranio por el método ABTS

Obtención de los extractos

Se pesaron 300 mg de muestra y se diluyeron con 5 ml de solución extractora de metanol al 70 % y ácido fórmico al 0,1 %. La mezcla fue agitada durante 10 min y luego ultrasonificada por 10 min. La muestra se centrifugó a 5000 RPM, 5 °C durante 15 min, el sobrenadante obtenido se colocó en un balón de aforo de 25

mL. Al precipitado obtenido se le añadió 5 ml de solución extractora y se repitió el proceso 4 veces. Finalmente, se aforó a 25 ml la solución final y se almacenó a temperatura de refrigeración para su posterior análisis.

Método ABTS (2,2-azinobis, 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)

Se preparó la solución de trabajo ABTS mediante la mezcla de buffer fosfato salino, ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2,45 mM. Se mezclaron 200 ul de extracto de muestra con 3800 ul de solución de trabajo ABTS. La muestra fue agitada y mantenida en reposo durante 45 min en un lugar oscuro. La absorbancia de las muestras fueron medidas a una longitud de onda de 734 nm, empleando un espectrofotómetro NANODROP UV-Vis marca Thermo Scientific. Se usó como blanco el buffer fosfato salino ⁽¹¹⁾. La curva estándar de Trolox fue lineal entre 0 uM/ml a 600 uM/ml. Los resultados se expresaron como umol TE/g muestra.

Resultados

El contenido de proteína determinado por el método Dumas en flor de geranio fue de 13,20 % mientras que el concentrado proteico obtenido por el método de extracción por su punto isoeléctrico presentó un contenido de proteína de 18 %, valores que indican un alto valor nutricional para las flores orgánicas comestibles de geranio.

Las proteínas de geranio fueron analizadas por la técnica molecular SDS-PAGE, En la figura 1 se observa la presencia de bandas de proteína que comprenden pesos moleculares entre 60 kDa a 5 kDa correspondientes al concentrado proteico de geranio. Además, se puede observar que en la simulación de la digestión gastrointestinal las proteínas se hidrolizaron por completo, indicando una digestión total.

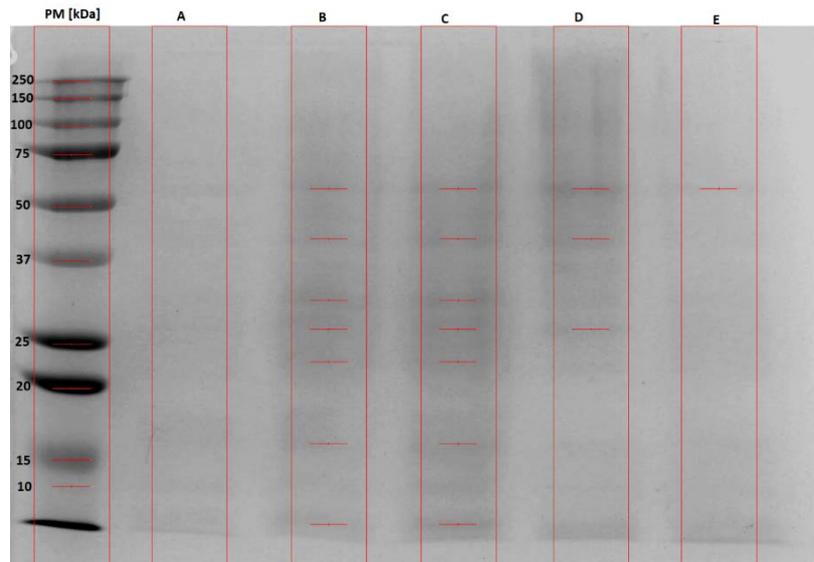


Fig. 1- Análisis de electroforesis SDS – PAGE de Flor liofilizada, Concentrado Proteico y Digestión gastrointestinal. A: Flor liofilizada; B: Concentrado Proteico; C: Tiempo 0; D: Digestión gástrica 120 min; E: Digestión duodenal 120 min.

En la tabla 1 se observan los valores de la actividad antiinflamatoria expresados en el porcentaje de protección de los concentrados e hidrolizados proteico de geranio obtenidos mediante la aplicación del método del potencial de estabilización de la membrana.

Tabla 1- Actividad antiinflamatoria *in vitro* de los concentrados e hidrolizados proteicos de flor de geranio.

Tratamientos	% Protección
Flor	0,00
Concentrado proteico	38,41 ± 0,5 ^b
Hidrolizado gástrico	31,27 ± 0,5 ^c
Hidrolizado duodenal	0,00
Diclofenaco	93,03 ± 0,03 ^a

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones ± la desviación estándar. Letras diferentes indican para cada tratamiento diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los porcentajes de protección de actividad antiinflamatoria de las muestras analizadas.

En la tabla 2 se observan los valores de la actividad antioxidante obtenidos por el método ABTS, expresados en μmol de trolox contenidos por gramo de concentrado e hidrolizado proteico de geranio.

Tabla 2- Actividad antioxidante *in vitro* por el método ABTS de los concentrados e hidrolizados proteicos de flor de geranio.

Tratamientos	$\mu\text{mol TE/ g muestra}$
Flor	$3157,27 \pm 23,26^b$
Concentrado proteico	$4897,42 \pm 189,86^a$
Hidrolizado gástrico	$4069,70 \pm 40,33^{a,b}$
Hidrolizado duodenal	$3816,21 \pm 48,41^{a,b}$

Los valores presentados en la tabla representan la media de 3 mediciones \pm la desviación estándar. Letras diferentes indican para cada tratamiento diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos para actividad antioxidante de las muestras analizadas.

Discusión

Las flores aportan importantes elementos nutricionales para la salud. Algunas flores son ricas en proteínas, grasas, almidones, aminoácidos, vitaminas, antioxidantes y varios elementos minerales que son indispensables para el cuerpo humano. En esta investigación se determinó un alto contenido de proteína en la flor de geranio (13,20 %) y su concentrado proteico (18 %). Por otra parte, siete bandas con pesos moleculares de 57 kDa, 42 kDa, 31 kDa, 27 kDa, 23 kDa, 16 kDa y 5 kDa fueron observadas en el gel de poliacrilamida. En estudio realizado por Madakadze et al, identificaron y caracterizaron las proteínas de geranio común, encontrando proteínas del grupo de las glubulinas como 11S y albúminas de bajo peso molecular.⁽¹⁵⁾

El método del potencial de estabilización de la membrana permitió determinar la actividad antiinflamatoria de la flor, concentrado e hidrolizados de proteína de geranio. El concentrado de proteína presentó 38,41 % de protección mientras que

el digerido gástrico 31,27 %, demostrando que las proteínas aisladas, así como los péptidos liberados durante el proceso de hidrólisis son los responsables de la actividad antiinflamatoria del geranio. Sánchez en su estudio realizado acerca de la evaluación de la actividad cicatrizante *in vitro* del geranio, determinó un alto poder antiinflamatorio de las hojas y flores, indicando a los constituyentes flavónicos como los responsables de esta actividad ⁽¹⁶⁾. Sin embargo, estudios anteriores han demostrados que el geranio tiene potente acción antiinflamatoria, corta las hemorragias, desinfecta y cicatriza.⁽¹⁷⁾

La actividad antioxidante evaluada por el método ABTS en las distintas muestras permitieron establecer diferencia estadísticamente significativa entre los valores encontrados en el concentrado e hidrolizado proteico, con relación a la flor liofilizada de geranio. El concentrado proteico presentó un alto valor de actividad antioxidante 4897,42 umol TE/ g muestra, así como también el digerido gástrico presentó un valor de 4069,70 umol TE/ g muestra y el digerido duodenal 3816,21 umol TE/g muestra. Investigaciones realizadas han informado que la presencia de compuestos polifenólicos en las flores de geranio como las antocianinas acompañadas por los flavonoides glicósidos del kaempferol y luteolina como compuestos mayoritarios ejercen efectos terapéuticos relacionados con su actividad antioxidante.^(4,9)

Como conclusión de este estudio se puede destacar que las proteínas aisladas de geranio son susceptibles a la digestión gastrointestinal. En la evaluación de la actividad antiinflamatoria, el concentrado de proteína presentó 38,41 % de protección y en la actividad antioxidante 4897,42 umol TE/ g muestra. Los extractos de proteína de geranio pueden ser empleados como ingrediente funcional en la elaboración de productos alimenticios, nutracéuticos y farmacéuticos.

Referencias bibliográficas

1. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 2004; 134:3479–3485.
2. Boukhris M, Simmonds M, Sayadi S, Bouaziz M. Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, *Pelargonium graveolens*. *Phytother Res.* 2012; 1-8
3. Narnoliya L, Jadaun J, Singh P. Chapter 12: The Phytochemical Composition, Biological Effects and Biotechnological Approaches to the Production of High-Value Essential Oil from Geranium. *J Essent Oil Res.* 2019; 327-252
4. Lara E, Osorio P, Jimenez A, Bautista S. Contenido nutricional, propiedades funcionales y conservación de flores comestibles. *ALAN.* 2013; 63(3):1-9
5. Piñuel L, Vilcacundo E, Boeri P, Barrio DA, Morales D, Pinto A, Morán R, Samaniego I, Carrillo W. Extraction of protein concentrate from red bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation. *J Appl Pharm.* 2019; 9:1-14
6. Vilcacundo R, Barrio D, Carpio C, García-Ruiz A, Rúaless J, Hernández-Ledesma B, Carrillo W. Digestibility of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) protein concentrate and its potencial to inhibit lipid peroxidation in the Zebrafish larvae model. *Plant Foods for HumNutr.* 2017; 72:294-300
7. Giongo J, Almeida R, Sagrillo M, Vianna R, Duarte M, Rech V, Soares L, Cruz B, Tatsch E, Moresco R, Gomes P, Steppe M. Anti-inflammatory effect of geranium nanoemulsion macrophages induced with soluble protein of *Candida albicans*. *Microbial Pathogenesis.* 2017; 1-30.
8. Choi HJ, Park MJ, Lee JY, Jeong S, Lee S, Kim KH, Joo M, Jeong HS, Kim JE, Ha KT. The inhibitory effects of *Geranium thunbergii* on interferon and LPS-induced inflammatory responses are mediated by Nrf2 activation. *J Mol Med.* 2015; 35:1237–45.
9. Mahabadi A, Mirzakhani A, Azizi A, Chavoshi S, Khaghani Sh. Extracts of *Pelargonium hortorum*: A natural and efficient fluid for fast and eco-friendly

biosynthesis of CeO₂ nanoparticles for antioxidant and photocatalytic applications. Inorg Chem. Commun. 2021; 127:1-7

10. Lara D, Vilcacundo E, Carrillo C, Carpio C, Silva M, Álvarez M, Carrillo W. Obtention of protein concentrate and polyphenols from Macadamia (*Macadamia integrifolia*) with aqueous extraction method. Asian J Pharm Clin Res. 2017; 10(2):138-142

11. Vilcacundo E, García A, Vilcacundo M, Morán R, Samaniego I, Carrillo W. Antioxidant Purple Corn protein concentrate from germinated Andean Purple Corn Seeds. Agronomy. 2020; 10(1282):1-16

12. Vilcacundo R, Miralles B, Carrillo W, Hernández-Ledesma B. In vitro chemopreventive properties of peptides released from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein under simulated gastrointestinal digestion. Int. Food Res. J. 2018; 105:403-411

13. Carrillo W, Lucio A, Gaibor J, Morales D, Vásquez G. Isolation of Antibacterial Hydrolysates from Hen Egg White Lysozyme and Identification of Antibacterial Peptides. J Med Food. 2018; 1:11

14. Bouhlali E, Sellam K, Bammou M, Alem C, Filali-Zehzouti Y. In vitro Antioxidant and anti-inflammatory properties of selected Moroccan medicinal plants. J Appl Pharm Sci. 2016; 6(5):156-162.

15. Madakadze RM, Krochko JE, Senaratna T. Identification and Characterization of Storage Proteins in Zygotic and Somatic Embryos of Geranium (*Pelargonium xhortorum*). Am Soc Hortic Sci. 2000; 125(4):525–529.

Sánchez A. Evaluación de la actividad cicatrizante in vitro del geranio (*Pelargonium x domesticum* L.H. Bailey) mediante inhibición de hialuronidasa. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2015.

16. Acosta M. Vademécum de las plantas medicinales del Ecuador. 2º ed. Quito-Ecuador: EC.Abya-Ayala.1992.

Conflicto de intereses

Los autores expresan que no existe conflicto de intereses

Contribución de los autores

Desarrollo de la fase experimental, interpretación de resultados y redacción del artículo científico: Rubén Vilcacundo.

Desarrollo de la fase experimental e interpretación de resultados y redacción del artículo científico: Edwin Tapia.

Interpretación de los resultados y revisión del artículo científico: Mayra Paredes.

Desarrollo de la fase experimental e interpretación de resultados: Elena Beltrán.