



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Mecanismo molecular de citotoxicidad de la quercetina, su efecto contra fitopatógenos *in vitro* y su aplicación en un recubrimiento comestible activo”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA
M.C. ANDRÉS CARRILLO GARMENDIA

DIRIGIDO POR
Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

CO-DIRIGIDO POR
Dr. LUIS ALBERTO MADRIGAL PÉREZ
SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO,
NOVIEMBRE DE 2024.

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

 **Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.

 **NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).

 **SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

“Mecanismo molecular de citotoxicidad de la quercetina, su efecto contra fitopatógenos in vitro y su aplicación en un recubrimiento comestible activo”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:
M. C. Andrés Carrillo Garmendia

Dirigido por:
Dr. Carlos Regalado González

Co-dirigido por:
Dr. Luis Alberto Madrigal Pérez

Dr. Carlos Regalado González

_____ Firma

Presidente

Dr. Luis Alberto Madrigal Pérez

_____ Firma

Secretario

Dr. Juan Carlos González

_____ Firma

Hernández Vocal

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez

_____ Firma

Suplente

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

_____ Firma

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro, Enero 2025, México

Dedicatoria

A mis padres (Maricela y Andrés), mi hermanito (Ángel)
y mis abuelos (Macario, Eleazar, Leonila y Ángel).

Agradecimientos

A toda mi familia de manera especial a mis padres (Andrés y Maricela), hermanito (Ángel) y abuelos (Macario, Eleazar, Leonila y Ángel) por su apoyo incondicional en todo momento.

Al Dr. Carlos Regalado González por la orientación y el apoyo brindado para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Luis Alberto Madrigal Pérez por la confianza y el constante apoyo en mi desarrollo académico.

Igualmente, a todos los miembros de mi comité el Dr. Juan Carlos González Hernández, el Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez y la Dra. Sofía María Arvizú Medrano, por sus aportaciones para el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio de manera especial a Alexis, Jessica, Dra. Monserrat, Dr. Ángel por su apoyo y amistad.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Morelia, al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo por las facilidades para realizar la experimentación.

Al consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo económico brindado durante todo el desarrollo de este proyecto.

Índice general

Contenido	Página
Índice de Figuras	IV
Índice de Tablas.....	V
Resumen.....	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Incremento de la población mundial ¿Incrementar la producción de alimentos o disminuir las pérdidas?	4
2.2 Hongos deterioradores de frutas y hortalizas en fresco	5
2.2.2 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	6
2.3 Fungicidas en el control de hongos fitopatógenos.....	6
2.4 La mitocondria como blanco molecular de los fungicidas	7
2.5 Recubrimientos comestibles para alimentos en fresco	8
2.5.1 Quitosano	9
2.5.2 Almidón oxidado.....	10
2.6 Consumo seguro de quercetina.....	12
2.7 La quercetina como mecanismo de defensa en plantas	14
2.8 Correlación entre la estructura de la quercetina y su influencia sobre la fosforilación oxidativa	15
2.9 Efecto de la quercetina sobre la fosforilación oxidativa	18
2.10 Relevancia de la respiración mitocondrial y potencial de membrana durante la suplementación de quercetina	19
3. HIPÓTESIS	22

4. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos específicos	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Estrategia experimental	24
5.2 Cepas	24
5.3 Medios de cultivo.....	25
5.4 Mecanismo molecular de la quercetina.....	25
5.4.1 Crecimiento celular	26
5.4.2 Crecimiento celular en fase fermentativa y respiratoria	26
5.4.3 Respiración mitocondrial	27
5.4.4 Relación ADP/ATP.....	28
5.4.5 Determinación de especies reactivas de oxígeno	28
5.4.6 Determinación de anión superóxido.....	29
5.4.7 Determinación de la actividad de los complejos.....	30
5.4.7.1 Aislamiento de mitocondrias	30
5.4.7.1 Determinación de la actividad de los complejos	32
5.4.7.2 Complejo II (succinato-succinato-2,6-dicloroindofenol sódico oxidorreductasa).....	32
5.4.7.3 Segmento complejo II-III (succinato-citocromo c oxidoreductasa).32	32
5.4.7.4 Complejo IV (citocromo c oxidasa).....	33
5.4.8 Potencial de membrana mitocondrial	33
5.4.9 Análisis de la morfología celular por microscopía de fuerza atómica	34
5.5 Formulación y evaluación del efecto antifúngico del recubrimiento comestible adicionado con quercetina	35
5.5.1 Formulación del recubrimiento comestible.....	35
5.5.2 Capacidad antifúngica de la solución filmogénica	35

5.6 Análisis estadístico.....	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1 Efecto de la suplementación de quercetina sobre el metabolismo respiratorio de <i>S. cerevisiae</i>	37
6.2 Influencia de la quercetina sobre la generación de ATP en <i>S. cerevisiae</i> ...	50
6.3 Influencia de la capacidad redox de la quercetina sobre la generación de especies reactivas de oxígeno en <i>S. cerevisiae</i>	52
6.4 Efecto de la quercetina sobre la membrana celular en <i>S. cerevisiae</i>	58
6.5 Efecto antifúngico del recubrimiento comestible.....	59
7. CONCLUSIONES	62
8. BIBLIOGRAFÍA.....	63

Índice de Figuras

Figura	Página
1. Oxidación del almidón.....	12
2. Concentración de quercetina en productos alimenticios.	13
3. Vía biosintética de la quercetina.....	15
4. Estructura química de la quercetina.	17
5. Oxidación de la quercetina y formación de radicales libres de semiquinonas	18
6. Hipótesis de la influencia de la quercetina sobre la fosforilación oxidativa	21
7. La suplementación de quercetina afecta negativamente el crecimiento exponencial de <i>S. cerevisiae</i> dependiente de la concentración de glucosa	39
8. Efecto de la quercetina dependiente de la concentración de glucosa y del consumo de oxígeno.....	40
9. Efecto de la quercetina sobre el crecimiento respiro-fermentativo de <i>S. cerevisiae</i>	42
10. Efecto de la quercetina sobre el crecimiento respiratorio de <i>S. cerevisiae</i>	44
11. Efecto de la quercetina sobre la respiración mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i>	47
12. Influencia de la quercetina sobre la actividad de los complejos de la cadena respiratoria de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
13. La suplementación de quercetina reduce los niveles de ATP en <i>S. cerevisiae</i>	51
14. La suplementación de quercetina potencializa la generación de anión superóxido en <i>S. cerevisiae</i>	53
15. La suplementación de quercetina influye de manera negativa sobre la generación de peróxido de hidrogeno en <i>S. cerevisiae</i>	55
16. La morfología de <i>S. cerevisiae</i> no es afectada por la suplementación de quercetina..	59
17. La quercetina no afecta la esporulación de <i>C. gloesporoides</i>	60

Índice de Tablas

Tabla	Página
1. Características y alimentos que afectan <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	6
2. Blancos moleculares mitocondriales de grupos de fungicidas y estimación del riesgo de adquirir resistencia por parte de los hongos.....	7

Resumen

El crecimiento constante de la población mundial ha provocado un incremento en la demanda de alimentos en fresco, que se pierden por contaminación con hongos, entre otras causas, mientras que los recubrimientos activos pueden extender la vida útil de dichos alimentos. La quercetina presenta un potente efecto bacteriostático y antifúngico, asociado a su influencia sobre la mitocondria. El objetivo de este trabajo fue elucidar el mecanismo molecular de citotoxicidad de la quercetina, para potenciar y dirigir su efecto antifúngico en un recubrimiento comestible para alimentos en fresco. Se estudió el mecanismo de acción de la quercetina en el modelo de estudio *Saccharomyces cerevisiae*, evaluando la viabilidad celular, respiración mitocondrial, potencial de membrana, relación ADP/ATP y generación de especies reactivas de oxígeno. Finalmente, se formuló un recubrimiento a base de quitosano y almidón oxidado adicionado con quercetina y se evaluó su efecto antifúngico frente *Colletotrichum gloeosporioides*. La quercetina redujo el crecimiento de *S. cerevisiae*, donde el factor de cambio del crecimiento específico por la quercetina suplementada y la concentración de glucosa tuvieron una correlación positiva (0.1 μ M quercetina, $r= 0.907$; 10 μ M quercetina, $r= 0.927$). La suplementación de quercetina redujo la actividad del complejo IV en 66.98 % (0.1 μ M de quercetina) y 79.97 % (100 μ M de quercetina), relativo al control. Además, el potencial de membrana mitocondrial disminuyó (cociente de fluorescencia roja/verde) de 3.58 ± 0.56 (control) a 1.90 ± 0.60 y 1.44 ± 0.23 con la suplementación de 0.1 μ M y 100 μ M de quercetina, respectivamente. También ocasionó la acumulación de anión superóxido (unidades de fluorescencia relativas) de 1.04 ± 0.66 (control) a 4.56 ± 1.74 (0.1 μ M de quercetina) y 7.97 ± 0.72 (100 μ M de quercetina). Se concluye que la suplementación de quercetina disminuyó el crecimiento celular, reduciendo la respiración mitocondrial, la actividad de los complejos II y III, la generación de ATP y aumentando la generación de anión superóxido; sugiriendo como sitio de acción a la fosa de ubiquinonas y/o citocromo c. El recubrimiento comestible [quitosano 1%, almidón oxidado 4%] suplementado con quercetina (40-200 μ M), no presentó un efecto antifúngico contra *C. gloeosporioides*, sugiriendo un mecanismo de resistencia.

Palabras clave: Quercetina, *S. cerevisiae*, potencial de membrana, respiración mitocondrial, recubrimientos activos

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Andrés Carrillo Garmendia

1. INTRODUCCIÓN

La población mundial ha presentado un crecimiento constante a lo largo de los años, ocasionando un incremento en la demanda de alimentos destinados al consumo humano, generando la necesidad de aumentar la producción mundial de alimentos de manera significativa. Sin embargo, las estrategias no deben estar dirigidas solo en acrecentar la producción, teniendo en cuenta que se deben abordar problemáticas como el desperdicio y deterioro de los alimentos en fresco. Entre los principales productos afectados durante la cadena de producción (destacando post-cosecha) se encuentran las frutas y hortalizas, las cuales, son dañadas de manera significativa por hongos fitopatógenos, que promueven el deterioro y disminuyen la vida útil de estos alimentos.

Existe una amplia variedad de hongos fitopatógenos que afectan a los alimentos, entre los que podemos encontrar a los géneros de *Colletotrichum*, relacionados con pérdidas significativas en frutas y hortalizas en fresco. Una de las principales herramientas para el control de fitopatógenos es el uso de fungicidas químicos. Sin embargo, su alta demanda ha generado un uso excesivo causando una serie de problemáticas como afectaciones a la salud y medio ambiente. Además, se ha descrito que algunos hongos tienden a generar resistencia a dichos fungicidas, por el uso excesivo. Una alternativa viable es dirigir las investigaciones a tecnologías amigables con el ambiente, no tóxicas y que permitan de manera eficiente disminuir la pérdida de alimentos en fresco.

Por lo tanto, en los últimos años, se han desarrollado una serie de tecnologías enfocadas a la conservación de alimentos en fresco, entre las que destacan los recubrimientos comestibles. Se ha reportado que su aplicación extiende la vida útil de los alimentos en fresco, no son tóxicos, no afectan al ambiente y presentan una alta compatibilidad con otros compuestos, permitiendo que sus formulaciones

integren componentes activos (p. ej. componentes con propiedades antifúngicas y/o antioxidantes). Las formulaciones de los recubrimientos son variadas; entre sus principales componentes encontramos al quitosano y el almidón oxidado que, por sus características permiten la formación de recubrimientos con propiedades mecánicas deseables. Además, presentan la versatilidad de ser compatibles con diversos componentes, favoreciendo la integración de compuestos activos con propiedades de interés (efecto antimicrobiano o antioxidante) como la quercetina, favoreciendo su aplicación en alimentos en fresco.

La quercetina es un flavonol con propiedades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas y neuroprotectoras; diversas evidencias sugieren que su principal blanco molecular es la mitocondria. Por lo tanto, es necesario comprender aspectos moleculares específicos del mecanismo molecular de la quercetina, para su potencial adición en la formulación de recubrimientos como compuesto antifúngico en alimentos en fresco. Cabe destacar que una variedad de fungicidas centra su mecanismo de acción en la mitocondria, sugiriendo que compuestos naturales como la quercetina con efecto citotóxico relacionado con la mitocondria podrían ser una opción viable en el control de estos fitopatógenos en alimentos en fresco.

La quercetina es descrita como uno de los polifenoles más abundantes en la dieta, debido a que se encuentra en una amplia variedad de alimentos como eneldo, manzana, cebolla. Este flavonol ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, debido a sus efectos benéficos sobre la salud eclipsando una parte fundamental, su origen (Zhang et al., 2017; Batiha et al., 2020). La quercetina es sintetizada por una amplia variedad de plantas como mecanismo de defensa en respuesta al estrés, presentando propiedades antimicrobianas entre las que destaca su capacidad antifúngica (Sato & Mukai, 2020).

Con base en estas evidencias el objetivo del presente trabajo consistió en elucidar aspectos moleculares específicos del mecanismo de acción de la quercetina sobre

la mitocondria, así como sus concentraciones fungicidas, para poder potenciar y dirigir su efecto contra fitopatógenos en materiales de recubrimiento comestible para alimentos en fresco. Se formuló además un recubrimiento a base de quitosano y almidón oxidado adicionado con quercetina como compuesto antifúngico, que permite el control de fitopatógenos característicos de los alimentos en fresco (como frutas y hortalizas). Con la finalidad de una futura aplicación en alimentos que permita mantener su calidad y extender su vida útil, para reducir las pérdidas y desperdicios.

2. ANTECEDENTES

2.1 Incremento de la población mundial ¿Incrementar la producción de alimentos o disminuir las pérdidas?

El constante crecimiento de la población mundial genera una serie de retos para la industria alimentaria, destacando la sustentabilidad alimentaria. Se pronostica que para el año 2050 la población aumente a 9.7 miles de millones aproximadamente (Nations, 2011). Lo cual, se reflejaría en un incremento en la demanda mundial de alimentos destinados al consumo humano, pronosticando que la producción de alimentos deberá incrementarse entre un 70% y un 119% para satisfacer las necesidades de la población (Berners-Lee et al., 2018; Davies et al., 2021). Sin embargo, los esfuerzos no deben centrarse solo en estrategias que permitan incrementar la producción mundial de alimentos, dejando de lado problemáticas actuales que permitirían aprovechar al máximo la producción disponible, como la disminución de la pérdida y desperdicio de alimentos.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) ha reportado que una tercera parte de los alimentos producidos (1.3 mil millones de toneladas aproximadamente) para el consumo humano se pierden o desperdician cada año durante la cadena de suministro (Vilariño et al., 2017). Se estima que las pérdidas y desperdicios de alimentos se distribuyen de la siguiente manera: un 22% de los cereales son desperdiciados, un 24% de los productos del mar, un 33% de las raíces y tubérculos y un 39% de las frutas y hortalizas. Cabe destacar que la disminución en el desperdicio y la pérdida de alimentos se considera como un factor clave para mantener la seguridad alimentaria. Por lo anterior, se ha sugerido que si se redujera la pérdida y desperdicio de alimentos a la mitad se podría alimentar a mil millones de personas (Kummu et al., 2012).

La merma de frutas y hortalizas en fresco que se presenta en países en desarrollo exhibe un aspecto clave a abordar. Se estima que en estos países durante el procesamiento de los alimentos se pierde entre el 14 y 20% de frutas y hortalizas, en comparación con los países desarrollados que reportan pérdidas menores del 2% (FAO, 2011). Estos datos evidencian la necesidad de mejorar las tecnologías destinadas para mantener la integridad de alimentos durante su procesamiento en países en desarrollo, con la finalidad de conservar la calidad de los alimentos y de esta manera reducir las pérdidas y desperdicios.

2.2 Hongos deterioradores de frutas y hortalizas en fresco

La calidad de los productos hortofrutícolas está relacionada con sus atributos como la apariencia, textura, sabor, aspectos nutrimentales y de seguridad. Por la parte nutricional, estos productos son una buena fuente de vitaminas, minerales y fibra dietética, destacando que su consumo en fresco satisface las necesidades de la población. Sin embargo, estos alimentos en fresco se deterioran rápidamente perdiendo su calidad y vida útil (Nunes, 2012; Mahajan et al., 2017).

Los hongos fitopatógenos son considerados como una de las principales problemáticas que afectan la integridad de los cultivos destinados para el consumo humano, con pérdidas del 20% en su rendimiento y un 10% adicional posterior a la cosecha (Fisher, et al., 2018). Además, se ha descrito que los hongos fitopatógenos afectan la calidad de frutas y hortalizas; principalmente en las etapas de poscosecha, distribución y consumo, generando pérdidas del 25% en países desarrollados y de hasta un 50% en países en desarrollo (Nunes, 2012; Aguirre-Güitrón et al., 2019). Entre los principales hongos que afectan frutas y hortalizas, tanto previo como posterior a la cosecha, se encuentran varias especies que pertenecen a los géneros *Colletotrichum* (Tabla 1) (Nunes, 2012; Mendoza et al., 2013; Sudheeran et al., 2021).

2.2.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

En el género *Colletotrichum* se encuentra *C. gloeosporioides* que ha sido reportado como uno de los principales patógenos a nivel mundial, clasificado como el octavo hongo fitopatógeno a nivel mundial. Se ha sugerido que tiene la capacidad de infectar a más de mil especies de plantas, y se ha descrito como unos los principales patógenos que causan la antracnosis (pudrición de la fruta) (Phoulivong et al., 2010; Khodadadi et al., 2020).

Tabla 1. Características y alimentos que afecta *Colletotrichum gloeosporioides*.

Hongo	Características		Frutos y hortalizas que afectan	Referencias
	Morfológicas	Fisiológicas		
<i>C. gloeosporioides</i>	Conidios hialinos: ovoides ligeramente curvados, rosa o salmón. Acérvulos cerosos.	Temperatura óptima entre 21 a 28 °C.	Papaya, mango, aguacate, pitaya, manzana.	Khodadadi et al., 2020

2.3 Fungicidas en el control de hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos son uno de los principales factores que influyen sobre las pérdidas de alimentos en fresco, incluyendo a las frutas y hortalizas. Las enfermedades causadas por hongos son una problemática que se ha presentado desde hace años, afectando la seguridad alimentaria y causando pérdidas económicas significativas (Fisher et al., 2013; Peng et al., 2021). Por lo cual, su control ha sido clave para mantener la seguridad alimentaria y reducir las afectaciones económicas; siendo los fungicidas químicos la principal herramienta en el control y tratamiento de las enfermedades causadas por estos fitopatógenos. Los fungicidas presentan diversos mecanismos de acción, destacando los que causan una disfunción mitocondrial (Davies et al., 2021).

2.4 La mitocondria como blanco molecular de los fungicidas

La mitocondria es la principal fuente de energía (mediante la síntesis de adenosín trifosfato, ATP) de una amplia variedad de microorganismos, y los hongos no son la excepción. Por lo cual, la mitocondria es considerada como un blanco potencial de los compuestos antifúngicos, teniendo como objetivo generar una disfunción mitocondrial que posteriormente induzca la muerte celular (Yonghua Li et al., 2017). La disfunción mitocondrial es descrita como cualquier anomalía o alteración en las funciones mitocondriales, como la generación de ATP por la fosforilación oxidativa, la respiración mitocondrial, el potencial de membrana, la generación y desintoxicación de especies reactivas de oxígeno, entre otras (Brand & Nicholls, 2011). Por lo tanto, los fungicidas dirigidos a la mitocondria presentan diversos blancos moleculares específicos como los complejos (I, II y III) de la cadena transportadora de electrones; otros son descritos como desacopladores e inhibidores de la fosforilación oxidativa y/o de la ATPasa (Tabla 2) (Lushchak et al., 2018; Peng et al., 2020; FRAC, 2021; Silva et al., 2023).

Tabla 2. Blancos moleculares mitocondriales de grupos de fungicidas y estimación del riesgo de adquirir resistencia por parte de los hongos (adaptada de FRAC, 2021).

Blanco molecular	Nombre del grupo	Resistencia*
Complejo I	Pirimidín aminas Pirazol-MET1 Quinazolina	Resistencia desconocida
Complejo II	Inhibidores de succinato deshidrogenasa (SDHI, por sus siglas en inglés)	Resistencia reportada en varias especies de hongos. Requiere manejo de resistencia. *Riesgo medio a alto
Complejo III	Fungicidas Qol (inhibidor externo de quinonas)	Resistencia reportada en varias especies de hongos. *Riesgo alto
	Fungicidas Qol (inhibidor externo de quinonas)	Resistencia desconocida *Riesgo alto

	Fungicidas Qil (inhibidor interno de quinonas)	*Riesgo de resistencia desconocido pero se sugiere de medio a alto. Manejo de la resistencia requerido.
Inhibidores de la fosforilación oxidativa (ATPasa)	Compuestos organoestánnicos	Se han reportado casos de resistencia. *Riesgo medio a bajo.
Transporte de ATP (propuesto)	Tiofeno-carboxamidas	Resistencia reportada. *Riesgo bajo.

*El riesgo hace referencia a la probabilidad de que el hongo adquiera resistencia al grupo de fungicidas.

A pesar de que los fungicidas han sido una alternativa eficiente en la prevención y control de enfermedades causadas por los hongos fitopatógenos en alimentos, su uso excesivo ha generado nuevas problemáticas como la generación de resistencia en algunos hongos. Además, se ha descrito que los residuos químicos de los fungicidas están relacionados con problemas a la salud y al ambiente (Davies et al., 2021). Esto genera la necesidad de implementar el uso de tecnologías alternativas, que no generen residuos tóxicos, que permitan reducir las pérdidas de los alimentos en fresco, entre las que destacan los recubrimientos comestibles.

2.5 Recubrimientos comestibles para alimentos en fresco

En las últimas décadas han surgido tecnologías potenciales que permiten prolongar la vida útil y calidad de los alimentos en fresco posterior a la cosecha, como los recubrimientos comestibles. Se le denomina recubrimiento comestible a un material de cobertura que es aplicado a los alimentos, como barrera eficaz a la transmisión de gases, con la finalidad de mejorar la apariencia y resolver problemas de migración de humedad, aroma, así como la difusión de oxígeno y dióxido de carbono; prolongando la vida útil y calidad de los alimentos en fresco. Estos recubrimientos, por lo general, son aplicados a los alimentos de forma directa, en estado líquido, por inmersión, aspersión o cepillado (Aguirre-Joya et al., 2018; Matloob et al., 2023).

Los recubrimientos comestibles son una tecnología que presenta una serie de beneficios, como mitigar la pérdida de alimentos en fresco, no presentan efectos negativos sobre la salud y el medio ambiente (Patil et al., 2023). Además, los recubrimientos presentan versatilidad para incorporar una variedad de compuestos bioactivos a sus formulaciones (con propiedades antimicrobianas o antioxidantes) que les permiten innovar y mejorar constantemente su funcionalidad (Díaz-Montes & Castro-Muñoz, 2021; Priya et al., 2023).

Las formulaciones de los recubrimientos son diversas; pero de manera general, su composición incluye (por lo general) un biopolímero que tenga la capacidad de formar un recubrimiento como el quitosano y el almidón, y un agente plastificante como el glicerol (Firdous et al., 2023; Patil et al., 2023). Puede incorporarse un compuesto activo con propiedades antioxidantes, antimicrobianas o funcionales, como la quercetina. Por lo tanto, la incorporación de la quercetina a la formulación de un recubrimiento comestible es una alternativa viable para aumentar la vida útil y calidad de los alimentos en fresco (Yousuf et al., 2017; Punia Bangar et al., 2021; Du et al., 2023).

2.5.1 Quitosano

El quitosano ha sido uno de los principales polímeros empleados en la formulación de recubrimientos, debido a sus propiedades. Este es un polímero natural derivado de la desacetilación de la quitina, compuesto por unidades de β - (1-4) -2-acetamido-D-glucosa y β (1-4)-2-amino-D-glucosa. Se caracteriza por ser el segundo polímero más abundante en la naturaleza y se encuentra principalmente en los exoesqueletos de los crustáceos, como los camarones (Escamilla-García et al., 2018; Jiménez-Gómez & Cecilia, 2020).

El quitosano presenta una serie de propiedades biológicas, tales como: capacidad antimicrobiana, es biodegradable, no es tóxico, es biocompatible y presenta excelentes atributos para la formación de películas (Jiang et al., 2023). Estas

propiedades han potencializado el empleo del quitosano en las formulaciones de recubrimientos para diversos productos alimentarios, como frutas y hortalizas; donde se reporta una reducción en la respiración, al regular la permeabilidad de gases como dióxido de carbono y oxígeno (Zhang et al, 2018; Armghan-Khalid et al., 2022; Jiang et al., 2023). El quitosano se ha empleado como base de recubrimientos alimenticios adicionados con biopolímeros (almidón), elementos activos como compuestos fenólicos (catequina, queracetina, luteolina, ácidos siríngicos, proantocianidinas), extractos (de té verde y negro, cáscara de piñón, soja negra), con la finalidad de conferirles propiedades biológicas (antimicrobianas, antioxidantes) y fisicoquímica (flexibilidad, resistencia) de interés reportando resultados favorables en la conservación de los alimentos en fresco (Bi et al., 2019; Wang et al., 2019; Yang et al., 2019; Zhang et al., 2020; Sutharsan et al., 2022; Pech-Cohuo et al., 2022; Sun et al., 2024)

2.5.2 Almidón oxidado

El almidón es un polisacárido constituido generalmente por dos polímeros distintos de glucosa: amilosa que es un polímero de glucosa de cadena lineal unido por enlaces $\alpha(1-4)$ y amilopectina que presenta cadena ramificada con enlaces $\alpha(1-6)$ (Tetlow & Bertoft, 2020). Este polisacárido se ha utilizado ampliamente en la elaboración de recubrimientos biodegradables, con la finalidad de sustituir parcialmente a los plásticos, debido a que es una materia prima altamente disponible y renovable (Perera et al., 2023). Sin embargo, las propiedades mecánicas del almidón como elongación, flexibilidad y tracción no son las óptimas. Por lo cual, es necesario realizar modificaciones genéticas o químicas al almidón para mejorar sus propiedades mecánicas (Dhall, 2016). Una de las modificaciones químicas más empleadas es la oxidación de almidón, ésta consiste en la oxidación de los grupos hidroxilo primarios o secundarios de las unidades de glucosa con formación de grupos aldehídos o carboxilos. Los grupos hidroxilo blanco son los

unidos al C-2, C-3 y C-6, para ser transformados en grupos carbonilo y/o carboxilo por la oxidación (Figura 1) (Lewicka et al., 2015; Compart et al., 2023).

El almidón oxidado presenta mejores propiedades mecánicas para la formación de películas, presentando mejor solubilidad y menor viscosidad en comparación con el almidón nativo (Lewicka et al., 2015; Cahyana et al., 2023). El almidón oxidado se ha empleado en conjunto con el quitosano en la formulación de un recubrimiento para su aplicación en papaya, reportándose que el recubrimiento comestible presentó un efecto positivo en la vida útil de la papaya almacenada a temperatura ambiente. La papaya sin recubrimiento alcanzó la maduración final a los 5 días; mientras que, en las papayas con el recubrimiento la vida útil se prolongó hasta los 15 días. Además, se observó una disminución de la población microbiana en las papayas con el recubrimiento en comparación con las papayas sin recubrimiento (Escamilla-García et al., 2018). Un conjugado de quercetina, quitosano y aldehído de almidón fue empleado para la formulación de un recubrimiento, los resultados mostraron que se mantenían características de apariencia similares en comparación con el control, presentando un 100% de inhibición frente a *E. coli* y *S. aurus* (Sun et al., 2024). De manera similar se empleó quercetina, quitosano y almidón Ramon en la formulación de una biopelícula activa, reportado un porcentaje de inhibición del 41% y 44% para *S. aureu* y *S. typhimurium*, respectivamente (Pech-Cohuo et al., 2022).

Por lo anterior, representa una opción viable la formulación de un recubrimiento a base de quitosano/almidón oxidado suplementado con un compuesto activo con propiedades antifúngicas. Destacando a la quercetina como compuesto activo, debido a que es sintetizada por las plantas de forma natural como un mecanismo de defensa, exhibiendo propiedades antifúngicas y presenta efectos benéficos a la salud, lo cual sugiere una implementación segura dependiente de la concentración.

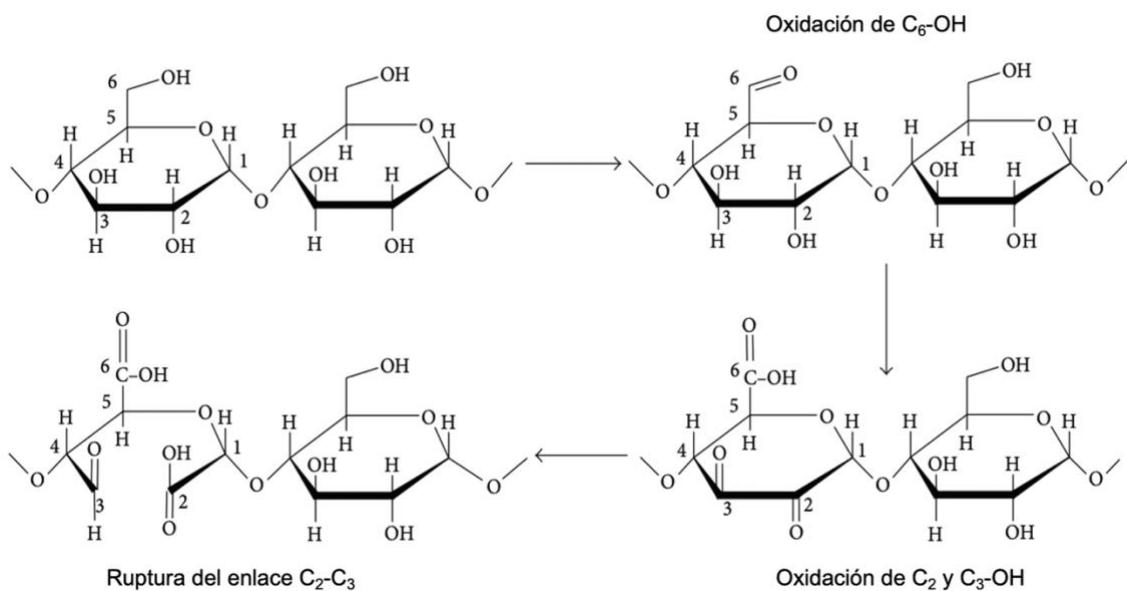


Figura 1. Oxidación del almidón. Representación de la oxidación del almidón en orden de oxidación de los grupos hidroxilo (Soto et al., 2014).

2.6 Consumo seguro de quercetina

La quercetina es un flavonol, miembro de la familia de los flavonoides, y es uno de los polifenoles más comunes en la dieta. La podemos encontrar en una gran variedad de plantas alimenticias entre las que destacan el eneldo (*Anethum graveolens*), las alcachofras (*Capparis spinosa*), las cebollas (*Allium cepa*), las manzanas (*Malus domestica*), las uvas (*Vitis vinifera*), espárragos (*Asparagus officinalis*), brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*), té negro (*Camellia sinensis*); por su alto contenido de quercetina (Figura 2) (Zhang et al., 2017; Sato & Mukai, 2020; Aghababaei, et al., 2023; Rarinca et al., 2023).

Desde los años 70 la quercetina atrajo la atención de la industria alimentaria para su aplicación como aditivo en los alimentos (como colorante alimentario), aunque la limitada información sobre su toxicidad impidió su uso en esta industria. Fue hasta el año 2004 donde se estableció que el uso de la quercetina en el área alimentaria es seguro, en concentraciones de 10 a 125 mg/porción. Con base en éstas

condiciones se estimó, que una persona con una dieta alta en quercetina, estaría consumiendo un máximo de 226 mg de quercetina/día (Harwood et al., 2007).

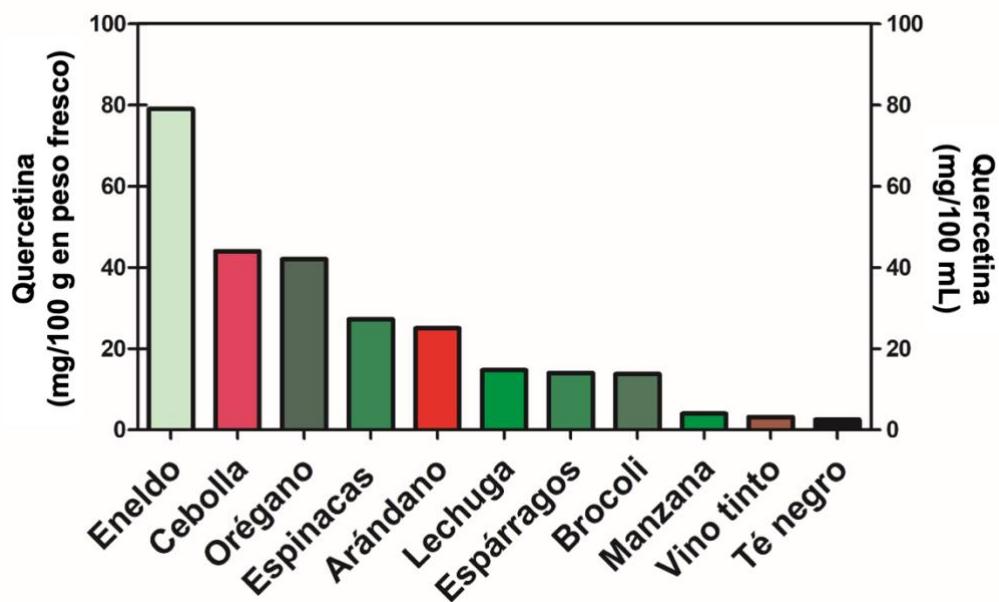


Figura 2. Concentración de quercetina en productos alimenticios. Las concentraciones de quercetina se determinaron por HPLC (adaptado de USDA, 2014).

Posteriormente, en 2010 los suplementos de quercetina fueron incorporados a la lista de Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS, por sus siglas en Inglés) de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en Inglés); sugiriendo un uso seguro en alimentos y bebidas en concentraciones de hasta 500 mg/porción (Dabeeek & Ventura Marra, 2019; de Barros et al., 2022). Los amplios beneficios de la quercetina incluyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, cardioprotectoras, entre otras (Overman et al., 2011; Hung et al., 2015; Sato & Mukai, 2020; Azeem et al., 2022; Qi et al., 2022; Michala & Pritsa, 2022). Por esta razón, se ha potenciado su comercialización como suplemento dietético con dosis sugeridas de 1000 mg (individual) y de 1200 a 2400 mg por día (combinada) (Andres et al., 2017). El creciente incremento del consumo de quercetina como suplemento, su denominación GRAS y el establecimiento de

concentraciones de consumo recomendadas como seguras, sugiere que su implementación como compuesto antifúngico en un recubrimiento para alimentos destinados al consumo humano es viable.

2.7 La quercetina como mecanismo de defensa en plantas

La quercetina es producida por una amplia variedad de plantas como un mecanismo de defensa ante patógenos. Este flavonol es sintetizado en las plantas a partir de la fenilalanina (por la vía del Shikimato) utilizando la vía alterna fenilpropanoide (Figura 3), fungiendo como un mecanismo de defensa en respuesta al estrés y patógenos (Flamini et al., 2013; Singh et al., 2021). Destacando así que la quercetina actúa como un compuesto citotóxico para contrarrestar las infecciones ocasionadas por una variedad de patógenos, presentando actividad antimicrobiana (Nguyen & Bhattacharya, 2022). Específicamente, se ha descrito que la quercetina presenta una potente capacidad antibacteriana frente a *Salmonella enterica*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, y antifúngica frente a *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*. Sin embargo, las evidencias del efecto antifúngico de la quercetina son limitadas en comparación con los estudios centrados en su capacidad antibacteriana (Wang et al., 2018; Batiha et al., 2020; Nguyen & Bhattacharya, 2022). Ademas, se presentan resultados controversiales, por una parte se ha observado actividad antifúngica frente a hongos como *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*; pero de manera contraria se ha reportado que en hongos como *Clostridium neospora* se observa que la quercetina no exhibe un efecto antifúngico (Al Aboody et al., 2020; Yang et al., 2020; Nguyen & Bhattacharya, 2022). Algunas evidencias, han reportado que la quercetina presenta actividad antifúngica sobre otros hongos relacionados con el deterioro de alimentos en fresco. En experimentos *in vitro* se reportó una inhibición significativa en el crecimiento de *P. expansum* con la suplementación de 0.25 mg/mL y la capacidad de inhibición aumentó al incrementar la concentración de quercetina a 0.5 y 1 mg/mL.

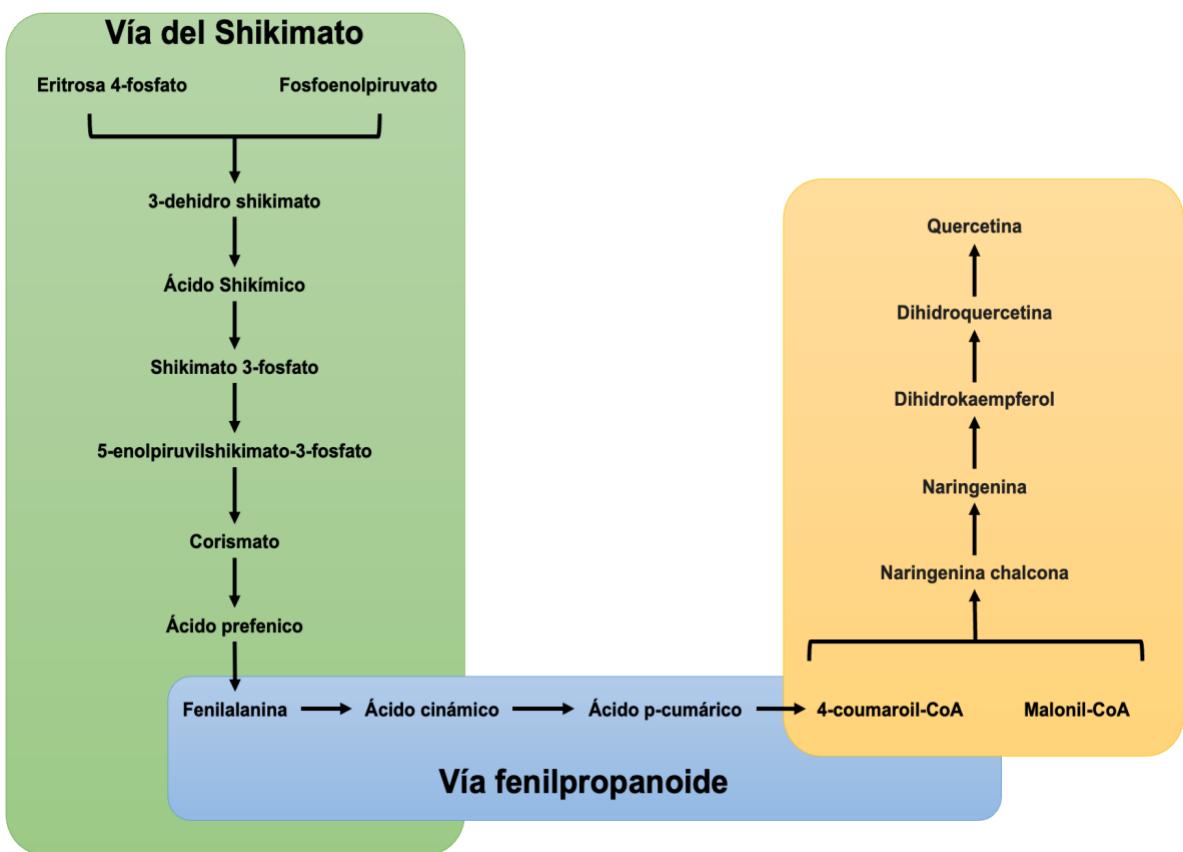


Figura 3. Vía biosintética de la quercetina. Síntesis de fenilalanina por la vía de Shikimato a partir de eritrosa 4-fosfato y fosfoenolpiruvato. Posteriormente la fenilalanina funge como precursor para la síntesis de 4-cumaroil-CoA por la vía fenilpropanoide; el 4-cumaroil-CoA se conjuga con 3 moléculas de malonil-CoA para la síntesis de quercetina.

(Zhang et al., 2017). Recientemente se demostró que los mangos expuestos al sol presentan una mayor respuesta ante patógenos como *C. gloeosporioides*. Sugiriendo que la mayor respuesta está relacionada con una mayor concentración de flavonoides y antocianinas, destacando que los principales compuestos identificados en los mangos expuestos al sol, fueron glucósidos de derivados de quercetina y kaempferol (Kumar Sudheeran et al., 2021). Cabe destacar que se han descrito diversos mecanismos antifúngicos de la quercetina destacando la alteración de la membrana, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y funciones mitocondriales (Aboody et al., 2020; Nguyen & Bhattacharya, 2022). En *C. albicans* y *C. tropicalis* se reportó que la suplementación de quercetina inducía apoptosis

atribuida a una disfunción mitocondrial (producción de ROS y despolarización de la membrana) (da Silva et al., 2014; Kwun et al., 2020). Estos datos sugieren un espectro significativo de la actividad antifúngica de la quercetina y dicho efecto puede estar relacionada con la mitocondria, por lo cual, es necesario profundizar en su mecanismo molecular de acción.

2.8 Correlación entre la estructura de la quercetina y su influencia sobre la fosforilación oxidativa

La quercetina es una molécula compuesta por tres anillos aromáticos (A, B y C) y cinco grupos hidroxilo (Figura 4); esta molécula presenta una baja solubilidad (0.06 mg/mL) en agua, exhibiendo una naturaleza hidrofóbica (Cook & Samman, 1996; Materska, 2008; Ozgen et al., 2016).

Cabe destacar que la estructura química de la quercetina es una parte fundamental para la comprensión de su mecanismo de acción. Por lo cual se sugiere que la hidrofobicidad de este polifenol podría favorecer la interacción entre la quercetina y las membranas celulares modificando su permeabilidad (Kreczmer et al., 2021; Dini & Grumetto, 2022). La influencia de la quercetina sobre la membrana puede estar relacionada con la interacción que se presenta entre los grupos hidroxilo de la quercetina y la cabeza polar de los lípidos que componen las membranas celulares; en consecuencia, la membrana celular podría presentar alteraciones que afecten su fluidez (Pawlakowska-Pawłęga et al., 2007; Sanver et al., 2020; Meleleo et al., 2023). Además, se han descrito modificaciones intracelulares relacionadas con la actividad de la quercetina, como la fluidez de la membrana mitocondrial, lo cual podría estar relacionado con la internalización de la quercetina hacia la mitocondria (Veiko et al., 2020; Gayibov et al., 2021).

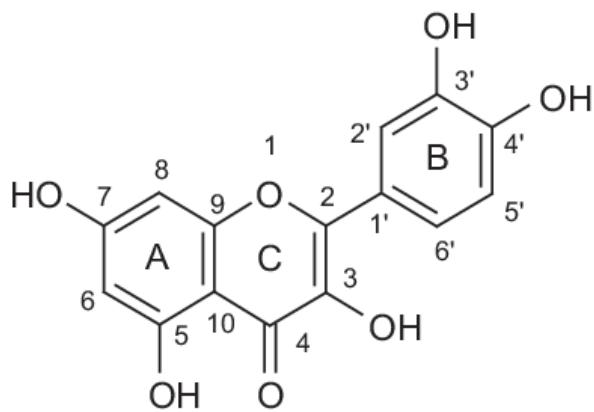


Figura 4. Estructura química de la quercetina (Zheng & Chow, 2009).

Una vez que la quercetina es internalizada en la mitocondria, se sugiere que el secuestro de electrones podría estar relacionado con la capacidad que presentan algunos polifenoles de recibir electrones. Se ha descrito que el resveratrol compite con el oxígeno por electrones que son filtrados por el complejo III de la cadena transportadora de electrones (Pshenichnyuk & Komolov, 2015; Olivares-Marin et al., 2019), o podría estar relacionado con la formación de semiquinonas. La actividad antioxidante de la quercetina se asocia a su oxidación, pero también se ha descrito que puede auto-oxidarse generando radicales libres como las semiquinonas, que presentan propiedades tóxicas (Figura 5). Existe controversia acerca de la citotoxicidad de las semiquinonas, pero la evidencia ha establecido que estas facilitan el transporte de electrones durante la fotosíntesis y respiración celular, por lo cual, se ha sugerido que podrían estar relacionada con el secuestro de electrones, debido a sus radicales libres ocasionando un transporte deficiente de electrones e inhibiendo la fosforilación oxidativa (Fuentes et al., 2017; Chakarawet et al., 2020; Singh et al., 2021). De esta manera, la suplementación con quercetina puede estar fungiendo como un agente citotóxico causando la inhibición de la fosforilación oxidativa (Bayliak et al., 2016; Qiu et al., 2018).

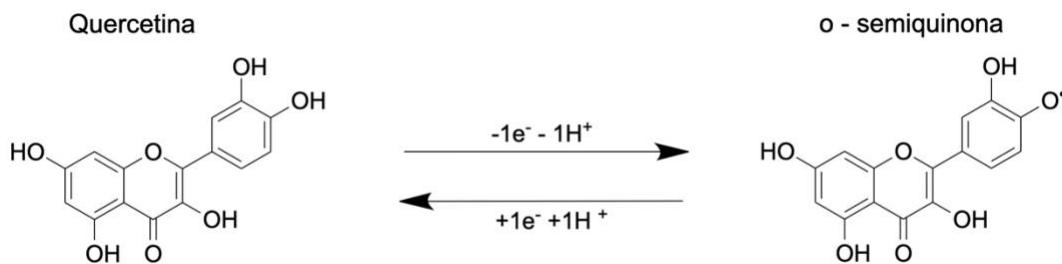


Figura 5. Oxidación de la quercetina y formación de radicales libres de semiquinonas (Zhou & Sadik, 2008).

2.9 Efecto de la quercetina sobre la fosforilación oxidativa

La hipótesis de que la fosforilación oxidativa podría ser el blanco principal de la quercetina (Hawley et al., 2010), sugiere que el mecanismo de acción de la quercetina podría estar dado por una disfunción mitocondrial. Esto se puede atribuir a la inhibición de la fosforilación oxidativa, debido al secuestro o inhibición del flujo de electrones en la cadena transportadora de electrones (CTE) (Figura 6). Fortaleciendo esta idea se ha reportado que empleando mitocondrias aisladas de corteza renal de ratas, se observó que la suplementación con quercetina (50 μ M) aumentó el consumo de oxígeno, inhibió la fosforilación oxidativa y disminuyó el potencial de membrana mitocondrial (Ortega y García, 2009). Asimismo, se observó que en mitocondrias aisladas de células del hígado de ratas la suplementación con quercetina (20 y 60 μ g/mg de proteína) inhibió el transporte de electrones a través de la CTE; específicamente a partir de la succinato deshidrogenasa (complejo II) (Yusupova et al., 2019). Mientras que en larvas de pez cebra (*Danio rerio*), la suplementación con quercetina (1 y 10 μ g/L) disminuyó el consumo de oxígeno (Zhang et al., 2017). Por su parte empleando las cepas MRSA (por sus siglas del inglés Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* y MRSE (por sus siglas del inglés Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis*) la suplementación de 100 μ M de quercetina inhibió un 40% (MRSA) y 80% (MRSE) la síntesis de ATP en comparación con el control (Ravera et al 2023). De manera similar utilizando líneas

celulares de glioblastoma humano (A172 y LBC3) la suplementación con quercetina (50, 100, 150, 200 y 400 μ M/L) causó una reducción en la síntesis de ATP dependiente de la dosis y del tiempo (24 h y 48 h) (Kusaczuk et al., 2022). En general, estos datos respaldan la hipótesis propuesta de que la quercetina induce una disfunción mitocondrial y sugieren que dicha disfunción es causada por la inhibición de la fosforilación oxidativa. Lo anterior conlleva a una serie de eventos como: a) una limitación en la formación de ATP; b) un aumento en la relación ADP/ATP; c) una disminución en la relación NADH/NAD⁺ y d) un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno.

Con base en las evidencias descritas, dos aspectos relevantes del efecto de la quercetina sobre la fosforilación oxidativa son la respiración mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial.

2.10 Relevancia de la respiración mitocondrial y potencial de membrana durante la suplementación de quercetina

Siguiendo la hipótesis de que la quercetina influye sobre la fosforilación oxidativa mediante el secuestro de electrones o mediante la inhibición del flujo de electrones a través de la CTE, se sugiere que tanto la respiración mitocondrial como el potencial de membrana son alterados. Esto, debido a que el secuestro de electrones o la limitación en la transferencia de electrones a través de los complejos, induciría un menor bombeo de protones de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal; generando una disfunción en el potencial de membrana y alterando el consumo de oxígeno. Además, la limitación en la concentración de protones en el espacio intermembranal, podría desencadenar una limitada actividad de la F₁F₀-ATPasa, debido a que no están disponibles los protones necesarios para la síntesis de ATP. En conjunto estas alteraciones ocasionadas por la suplementación de quercetina sobre la mitocondria podrían estar relacionadas con su efecto antimicrobiano (Zhang et al., 2017; Vissenaeckens et al., 2021).

A pesar de que la quercetina ha sido ampliamente estudiada aún se desconocen aspectos moleculares específicos de su mecanismo de acción. Por lo tanto, la comprensión de estos aspectos moleculares permitiría optimizar la dosis adecuada de empleo y mejorar la forma de aplicación. Además, se ha reportado que un recubrimiento a base de quitosano adicionado con quercetina presenta actividad antimicrobiana (Souza et al., 2015). De manera similar para la formulación de películas multifuncionales se adicionaron nanopartículas de quitosano y quercetina reportando un incremento en las propiedades antimicrobianas de las películas funcionales (Tavassoli et al., 2021). Sugiriendo que la formulación de un recubrimiento a base de quitosano y quercetina sería una opción potencial para su aplicación en alimentos.

En conjunto estas evidencias sugieren que la formulación de un recubrimiento comestible a base de quitosano y almidón oxidado adicionado con quercetina, como compuesto activo (con capacidad antifúngica), es una alternativa potencial para reducir las pérdidas de alimentos en fresco, como frutas y hortalizas.

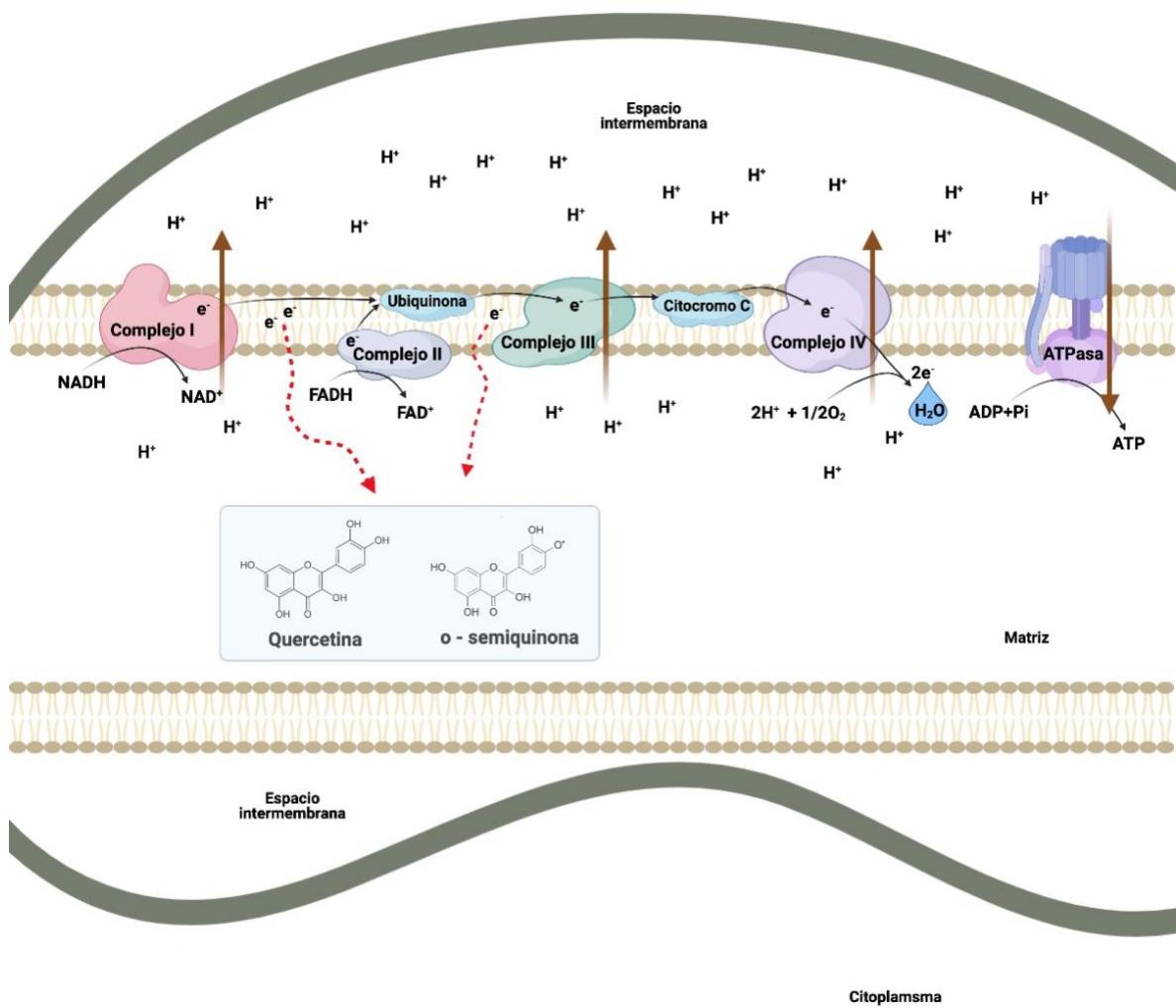


Figura 6. Hipótesis de la influencia de la quercetina sobre la fosforilación oxidativa. Sugerencia de mecanismo de acción molecular de la quercetina sobre la fosforilación oxidativa. Descripción en el texto, las flechas punteadas indican sugerencia.

3. HIPÓTESIS

El mecanismo molecular de citotoxicidad de la quercetina está dado por la disfunción mitocondrial ocasionada por la inhibición de la fosforilación oxidativa dependiente del secuestro de electrones en la cadena transportadora de electrones, ejerciendo de este modo su efecto antifúngico contra *Colletotrichum gloeosporioides*, mediante su aplicación en un recubrimiento comestible a base de biopolímeros con posible aplicación en alimentos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

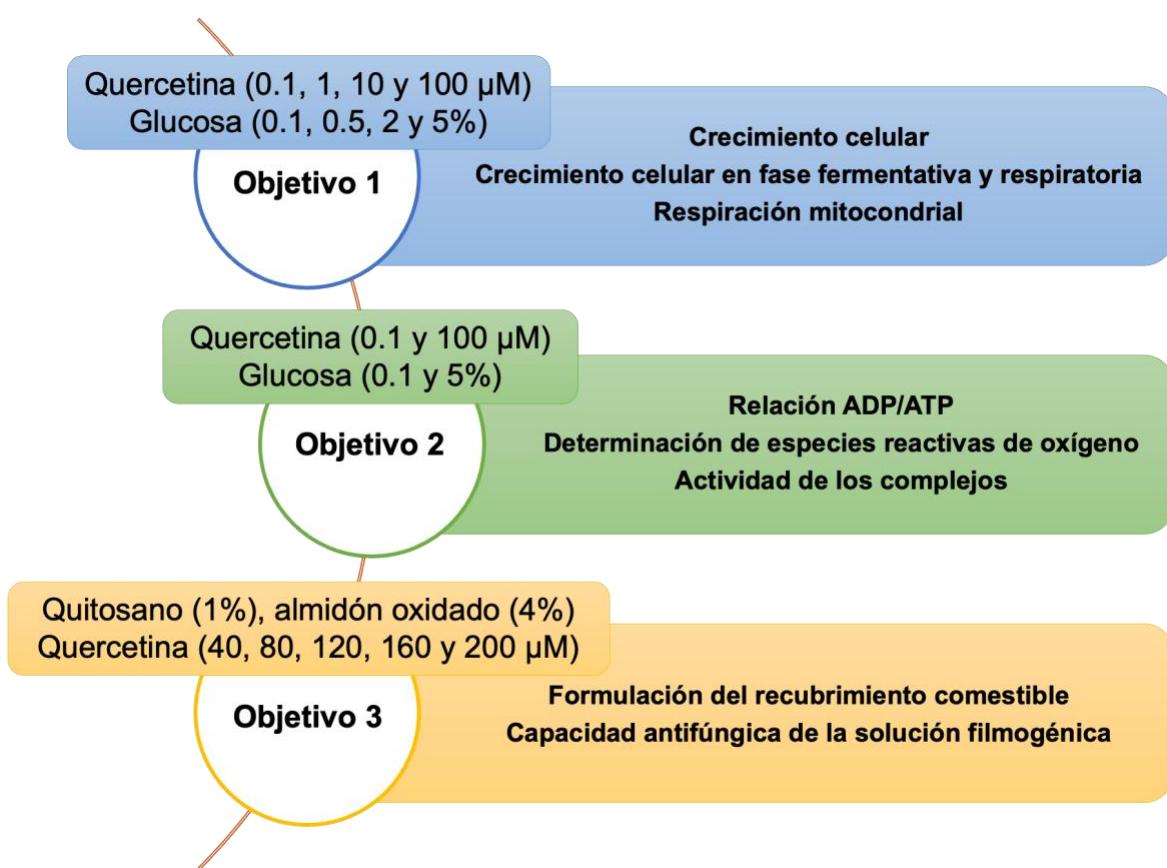
Evaluar el efecto citotóxico por la suplementación de quercetina sobre la inhibición de la fosforilación oxidativa usando como modelo de estudio a *Saccharomyces cerevisiae*, para su incorporación como compuesto antifúngico en la formulación y caracterización de un recubrimiento comestible dirigido a su posible uso en alimentos.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto citotóxico por la suplementación de quercetina dependiente del metabolismo respiratorio en diferentes concentraciones de glucosa empleando como modelo de estudio a *Saccharomyces cerevisiae*.
- Analizar la influencia de la suplementación de quercetina sobre la inhibición de la fosforilación oxidativa en diferentes concentraciones de glucosa empleando como modelo de estudio a *Saccharomyces cerevisiae*.
- Formular y evaluar las propiedades antifúngicas de un recubrimiento comestible activo a base de biopolímeros adicionado con quercetina como compuesto antifúngico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estrategia experimental



5.2 Cepas

Los experimentos para elucidar el mecanismo molecular de la quercetina se realizaron empleando como modelo de estudio a la levadura *S. cerevisiae* BY4742 (*Mat a*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *lys2Δ0*; *ura3Δ0*) adquirida en EUROSCARF (Frankfurt, Alemania), destacando que este modelo de estudio ha sido utilizado en la identificación y caracterización de compuestos antifúngicos (Tebbets et al., 2012;

Letsiou et al 2024) y en la evaluación de la actividad antifúngica relacionada con la disfunción mitocondrial (Haque et al., 2016; Scariot et al., 2020).

La cepa del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* ATCC 42374 (Cepario del Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Química, UAQ) se empleó en los ensayos *in vitro* para la determinación del efecto fungicida de la quercetina.

5.3 Medios de cultivo

La cepa BY4742 se activó tomando una alícuota de un vial que se conservó a -20 °C y se mantuvo en medio extracto de levadura, peptona y glucosa (YPD) preparado con 1% de extracto de levadura (BD Bioxon, Cuautitlán Izcalli, México), 2% de peptona de caseína (BD Bioxon) y 2% de glucosa (Meyer, CDMX, México). Para realizar la experimentación se empleó quercetina con pureza $\geq 95\%$, medio sintético completo (SC) preparado con 0.18% base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 1% mezcla *Drop-out* sin uracilo, 400 $\mu\text{g/mL}$ de uracilo, todos obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania), 0.5% sulfato de amonio (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.), 0.2% fosfato dipotásico (J.T. Baker), suplementado con diferentes concentraciones de glucosa y quercetina.

Por su parte *C. gloeosporioides* obtenida del cepario del laboratorio de Biotecnología del Posgrado de Alimentos de la Facultad de Química, se activó en medio agar papa-dextrosa (PDA) (Bioxon). Este medio contiene (p/v): 0.4% de infusión de papa, 2% de glucosa y 1.5% de agar bacteriológico. Para realizar la experimentación, se empleó caldo papa-dextrosa (PDC) (BD Difco, Franklin, NJ, EE.UU.), que contiene 0.4% (p/v): de almidón de papa y 2% (p/v) de glucosa. Para la determinación de la concentración mínima fungicida de la quercetina se creció el hongo en medio PDA.

5.4 Mecanismo molecular de la quercetina

5.4.1 Crecimiento celular

La viabilidad celular se determinó por medio de cinéticas de crecimiento. Se creció la cepa BY4742 en 3 mL de medio YPD suplementado con 2% de glucosa durante toda la noche con agitación constante a 30±2 °C. Posteriormente en una microplaca de 96 pozos, se colocaron 10 µL de la suspensión de células y 140 µL de medio SC suplementado con cinco niveles de quercetina (0.1, 1, 10, 100 y 1000 µM) en combinación con cinco concentraciones de glucosa (0.1, 0.5, 2, 5 y 10 %). La placa se incubó a 30±2 °C con agitación constante durante 24 h empleando el equipo lector de microplacas Multiskan Sky, (Thermoscientific, Waltham, MA, EE.UU.) y se realizaron lecturas de absorbancia a 600 nm cada hora. El porcentaje de viabilidad celular se calculó dividiendo la velocidad específica de crecimiento de las células suplementadas con quercetina entre la velocidad específica de crecimiento de las células no suplementadas (células control) y se multiplicó por cien. La velocidad específica de crecimiento se calculó utilizando la ecuación de crecimiento exponencial haciendo el ajuste con el programa GraphPad Prism (Ecuación 1):

$$\mu = \frac{\ln (X_f/X_0)}{t} \quad (1)$$

donde X_0 es la concentración de biomasa inicial (al tiempo 0 de la fase exponencial), X_f es la concentración de biomasa final (de la fase exponencial), μ es la velocidad específica de crecimiento y t es el tiempo (h) (Kwolek-Mirek & Zadrag-Tecza, 2014; Madrigal-Perez et al., 2016).

5.4.2 Crecimiento celular en fase fermentativa y respiratoria

Con la finalidad de evaluar el efecto de la quercetina sobre la respiración mitocondrial durante la fase fermentativa y respiratoria con base en el crecimiento celular, se creció la cepa BY4742 en 3 mL de medio YPD suplementado con 2% de glucosa durante toda la noche con agitación constante a 30±2 °C. Pasado el tiempo,

en una microplaca de 96 pozos se colocaron 10 μ L de la cepa activada y 140 μ L de medio SC suplementado con 5% de glucosa, antimicina A 20 μ g/mL (Merck) y quercetina (0.1, 1, 10 y 100 μ M). La placa se incubó a 30 \pm 2 °C con agitación constante durante 24 h empleando el equipo lector de microplacas Multiskan Sky, y se realizaron lecturas de absorbancia a 600 nm cada h. Las curvas de crecimiento de las células suplementadas con quercetina fueron comparadas con las curvas de crecimiento de las células suplementadas con antimicina A, que es un inhibidor de la respiración celular. De esta manera se evaluó el efecto de la quercetina sobre la respiración celular, tanto en la fase fermentativa como respiratoria (Madrigal-Perez et al., 2016).

5.4.3 Respiración mitocondrial

El consumo de oxígeno se determinó polarográficamente con un electrodo tipo Clark conectado a un monitor YSI 5300A (Biological Oxygen, Vernon Hills, IL, EE. UU.) y a una computadora para la adquisición de datos.

Las células de levadura (BY4742) se crecieron en 3 mL de medio YPD suplementado con 2% de glucosa, durante toda la noche en agitación constante a 30 \pm 2 °C. Una vez transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 600 nm (A_{600}) para determinar el volumen de inóculo necesario (A_{600} inicial \sim 0.1) para un matraz de 250 mL que contenía 50 mL de medio SC suplementado con 0.5, 2, y 5 % de glucosa (p/v) y quercetina (0.1 y 100 μ M); se incubó a 30 \pm 2 °C y 250 rpm. Las células en fase media logarítmica (A_{600} \sim 0.6), se centrifugaron a 4000 x g durante 5 min, posteriormente se realizaron tres lavados con agua desionizada. Las células se suspendieron en agua desionizada en una proporción de 1:1 (p:v), e inmediatamente se utilizaron para determinar la velocidad del consumo de oxígeno (Martinez-Ortiz et al., 2019).

En la cámara del polarógrafo se añadieron 5 mL del regulador de pH ácido 4-morfolinoetanosulfónico con trietanolamina 10 mM, pH 6.0 (Merck), 125 mg de células (peso húmedo), 60 μ L de glucosa 1 M; para evaluar la respiración mitocondrial basal. En seguida se agregaron 8.5 μ L de carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP; Merck) para evaluar la respiración máxima. Posteriormente, se adicionaron 50 μ L de antimicina A (AA; Merck). Por último, se le agregaron 20 μ L de 2-tenoiltrifluoroacetona (TTFA; Merck) para inhibir la respiración mitocondrial, las células se mantuvieron en agitación constante (Martinez-Ortiz et al., 2019).

5.4.4 Relación ADP/ATP

La evaluación de la relación ADP/ATP se determinó empleando el kit de ensayo para la relación ADP/ATP (Merck) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las células de levadura (BY4742) se crecieron en medio YPD suplementado con 2% de glucosa (p/v) durante toda la noche a 30 ± 2 °C, con agitación constante. Posteriormente, se medió la A_{600} para determinar el volumen de inóculo necesario para una A_{600} inicial ~ 0.1 de células, que se agregaron a un matraz de 25 mL. Este matraz contenía 5 mL de medio SC suplementado con 5%, 2%, 0.5% y 0.1% de glucosa (p/v) y quercetina (0.1 μ M y 100 μ M) y se incubaron a 30 ± 2 °C con agitación constante. Una vez que las células se encontraban en fase media exponencial ($A_{600} \sim 0.6$) fueron cosechadas a 5000 x g durante 5 min, posteriormente las células se lavaron dos veces con agua desionizada. En seguida, se transfirieron 10 μ L de células ($10^3 - 10^4$ células/mL) a un pozo de una microplaca blanca de 96 pozos y se siguieron las indicaciones del fabricante para la determinación de la relación de ADP/ATP. Los datos obtenidos se analizaron en el software GraphPad Prism.

5.4.5 Determinación de especies reactivas de oxígeno

La determinación de especies reactivas de oxígeno se llevó a cabo empleando diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA; Merck). La levadura

(BY4742) se creció en medio YPD suplementado con 2% de glucosa (p/v) durante toda la noche a 30±2 °C, con agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo se midió la A_{600} para determinar el volumen de inóculo necesario para una A_{600} inicial ~ 0.1 de células, que se agregaron a un matraz de 25 mL. El matraz contenía 5 mL de medio SC suplementado con 5%, 2%, 0.5% y 0.1% de glucosa (p/v) y quercetina (0.1 μ M y 100 μ M), y se incubó a 30±2 °C con agitación constante, hasta que las células se encontraron en fase media exponencial (A_{600} ~ 0.6). Posteriormente, se cosecharon 2×10^7 células a 3000 x g durante 3 min, se desechó el sobrenadante, pero conservando en el tubo 200 mL de medio. Las células se homogenizaron y se les adicionaron 4 μ L H₂DCFDA (5 mg/mL), para luego incubar durante 1 h a 28±2 °C, con agitación moderada. Pasado el tiempo, las células se recolectaron a 3000 x g durante 3 min y se lavaron 2 veces con 500 mL de solución salina de fosfatos (PBS, J.T. Baker). En seguida, las células se resuspendieron en 200 mL de PBS y se transfirieron 150 μ L de células suspendidas a un pozo de una microplaca negra de 96 pozos. Por último, se midió la fluorescencia empleando el lector de microplacas (Varioskan Flash) a una longitud de onda 484 ± 10 nm (excitación) y 518 ± 10 nm (emisión) (Sinha & Pick, 2021). Los datos obtenidos se analizaron en el software GraphPad Prism.

5.4.6 Determinación de anión superóxido

La determinación de anión superóxido se realizó empleando el indicador de superóxido mitocondrial (MitoSOX™ Red; Invitrogen, Eugenie, EE. UU.). Las células de levadura (BY4742) se crecieron en medio YPD suplementado con 2% de glucosa (p/v) durante toda la noche a 30 °C, con agitación constante. En seguida se midió la A_{600} para determinar el volumen de inóculo necesario para una A_{600} inicial ~ 0.1, el inóculo de células se colocó en un matraz de 25 mL que contenía 5 mL de medio SC suplementado con 5%, 2%, 0.5% y 0.1% de glucosa (p/v) y quercetina (0.1 μ M y 100 μ M). Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación constante, hasta su fase media exponencial (A_{600} ~ 0.6). En seguida, se cosecharon 2×10^7 células a 3000 x g durante 3 min y se lavaron dos veces con 1 mL de solución PBS.

Posteriormente, a la pastilla obtenida se le agregaron 250 mL de solución PBS que contenía MitoSOX Red a una concentración final de 5 μ M y se incubó durante 15 min a 37 °C. Pasado el tiempo las células se lavaron dos veces con 1 mL de solución PBS (protegiendo de la luz) y la pastilla fue diluida en 400 μ L de solución PBS, en seguida, se transfirieron 100 μ L a un pozo de una microplaca (negra de 96 pozos). Por último, se midió la fluorescencia empleando un lector de microplacas (Varioskan Flash) a una longitud de onda de 510 nm (excitación) y 580 nm (emisión). Los datos obtenidos se analizaron en el software GraphPad Prism.

5.4.7 Determinación de la actividad de los complejos

5.4.7.1 Aislamiento de mitocondrias

Para determinar la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones, las células de levadura (BY4742) se crecieron en 3 mL de medio YPD suplementado con 2 % de glucosa durante toda la noche a 30±2 °C con agitación constante. Posteriormente, se midió la A_{600} para determinar el volumen de inóculo necesario para A_{600} inicial ~ 0.1, que se agregó a un matraz de 4 L. Este matraz contenía 1 L de medio SC suplementado con 0.1% y 5% de glucosa (p/v) y se incubó a 30±2 °C con agitación continua, hasta que las células se encuentren en la fase media logarítmica (A_{600} ~ 0.6). Posteriormente, se cosecharon las células a 2500 x g durante 5 min a temperatura ambiente. En seguida se lavó el sedimento con agua bidestilada y se centrifugó a 2500 x g por 5 min, para luego determinar el peso húmedo de las células.

Las células lavadas se suspendieron en 20 ml del tampón 1 [0.1 M Tris-HCl 0.5 M (J.T. Baker); 2-mercaptoetanol pH 9.3 (Merck)] por gramo de peso seco y se incubaron durante 15 min a 30±2 °C, con agitación constante (70 rpm). Pasado el tiempo las células se centrifugaron a 1500 x g durante 5 min y se suspendieron en 50 mL del tampón 2 [0.01 M Tris-HCl (J.T. Baker); 0.5 M KCl pH 7.0 (Merck)]. A

continuación, las células se centrifugaron a 8000 rpm y la pastilla celular se suspendió en 40 ml de tampón 3 (Merck) (0.01 M citrato-fosfato, 1.35 M sorbitol, 1 mM EGTA pH 5.8). A la solución tampón 3 se le añadió 1 mg de *Lyticase* (Merck) (mezcla de enzimas que hidrolizan la pared celular de levaduras, originando células esféricas, o esferoplastos) de *Arthrobacter*, por mL de solución tampón 3. La mezcla se incubó a 30±2 °C con agitación constante de 60 a 90 min, monitoreando la formación de esferoplastos mediante la determinación de la absorbancia. La suspensión de esferoplastos se centrifugó a 1200 x g durante 10 min y se descartó el sobrenadante con precaución.

A partir de este punto las manipulaciones se realizaron a 4±2 °C. El sedimento de esferoplastos se lavó tres veces con 40 mL de tampón 4 (0.01 M Tris-maleato, 0.75 M sorbitol, 0.4 M manitol, 2 mM EGTA, 0.1% albumina de suero bovino, pH 6.8 (Merck) centrifugando a 1200 x g durante 10 min. A continuación, el sedimento final se suspendió en 80 ml de tampón 5 (Merck) (0.01 M Tris-maleato, 0.6 M manitol, 2 mM EGTA, 0.2% albumina de suero bovino, pH 6.8) y se homogenizó de manera manual evitando formación de espuma. La suspensión homogenizada se distribuyó en dos tubos de polipropileno de 50 mL y se ajustó el volumen de cada tubo a 40 mL con tampón 5, la suspensión se centrifugó a 800 x g durante 10 min (el sobrenadante se descartó cuidadosamente). Los gránulos se resuspendieron con un homogeneizador de tejido (Pyrex, Charleroi, PA, EE. UU.) y se recolectaron en dos tubos de polipropileno de 50 mL con tampón 5, para luego centrifugar a 800 x g durante 10 min.

Los sobrenadantes combinados se centrifugaron a 12000 x g durante 10 min y se descartaron los sobrenadantes, el precipitado se resuspendió en 15 mL de tampón 6 (Merck) (0.6M Manitol, 2mM EGTA, 10 mM Tris-maleico, pH 6.8). Los sedimentos mitocondriales se homogenizaron suavemente en un homogeneizador de tejido con un pequeño volumen de tampón 6. La suspensión se distribuyó en dos tubos de polipropileno de 50 mL, se ajustó el volumen de cada tubo a 40 mL con el mismo tampón y se centrifugaron a 800 x g durante 10 min. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó durante 10 min a 12000 x g y los sedimentos

mitocondriales se resuspendieron en un pequeño volumen de tampón 6 en dos tubos de polipropileno de 15 mL (Guérin et al., 1979). Las mitocondrias se utilizaron para la determinación de la actividad de los complejos y la concentración de cardiolipina.

5.4.7.1 Determinación de la actividad de los complejos

Con la finalidad de romper la membrana mitocondrial, los sedimentos mitocondriales se suspendieron en una solución fría (4 ± 2 °C) que contenía KCl 0.1 M (Merck), MgCl₂ 0.01 M (J.T. Baker), Tris-HCl 0.01 M a pH 7.5 (J.T. Baker) y un 1 mL de Triton X-100 al 10 % por cada 100 mL de solución. En seguida, a las mitocondrias permeabilizadas se les adicionó quercetina (0.1 y 100 µM) durante 30 min a 4 ± 2 °C.

5.4.7.2 Complejo II (succinato-2,6-dicloroindofenol sódico oxidorreductasa)

Para evaluar la actividad del complejo II se emplearon las mitocondrias permeabilizadas y suplementadas con quercetina. Se realizó una mezcla de reacción que contenía fosfato monopotásico (Merck) 50 mM a pH 7.6 (KH₂PO₄), 0.3 mg/ml de mitocondrias permeabilizadas, 80 µM de 2,6-dicloroindofenol sódico (DCIP, Merck), 1 mg antimicina A (Merck) y cianuro de potasio 0.75 mM (KCN; Merck) en un volumen final de 1 ml. Después de incubar durante 5 min con los inhibidores, se inició la reacción con succinato de sodio (Merck) 10 mM a pH 7.6. Los cambios de absorbancia se registraron en un espectrofotómetro UV/vis (Thermo Scientific), a 600 nm. La relación de reducción de DCIP se calculó a partir de la pendiente de la gráfica de absorbancia utilizando el coeficiente de extinción molar de 21 mM⁻¹ cm⁻¹ para DCIP.

5.4.7.3 Segmento complejo II-III (succinato citocromo c oxidorreductasa)

La reducción de citocromo c mediada por succinato sensible a antimicina A, se realizó usando una mezcla de reacción que contenía KH₂PO₄ 50 mM (pH 7.6),

mitocondrias permeabilizadas y suplementadas con quercetina 0.1 mg/mL, citocromo c (Merck) 1.5 mg y KCN 0.75 mM en un volumen final de 1 mL. Después de incubar durante 5 min con el inhibidor (KCN), se inició la reacción añadiendo succinato de sodio 10 mM (pH 7.6). La reacción se detuvo con la adición de 1 µg de antimicina A. Los cambios de absorbancia se registraron en el espectrofotómetro (Thermo Scientific) a 550 nm. La tasa de reducción del citocromo c se calculó a partir de las pendientes de las gráficas de absorbancia utilizando un coeficiente de extinción molar de $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el citocromo c. La reducción del citocromo c sensible a la antimicina A se calculó restando la actividad en presencia de antimicina A más el succinato a la actividad estimulada solo con succinato.

5.4.7.4 Complejo IV (citocromo c oxidasa)

Esta actividad se evaluó midiendo la oxidación del citocromo c reducido sensible a cianuro, en mitocondrias permeabilizadas y suplementadas con quercetina. La mezcla de reacción contenía KH_2PO_4 50 mM a pH 7.6, 0.1 mg/ml de mitocondrias y 1 µg de antimicina A en un volumen final de 1 mL. Después de incubar durante 5 min con antimicina A, la reacción se inició añadiendo 250 µg de citocromo c reducido con ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, Merck), la reacción se detuvo con la adición de KCN 0.75 mM. Los cambios de absorbancia se registraron en el espectrofotómetro (Thermo Scientific) a 550 nm. La reducción del citocromo c se calculó a partir de las pendientes de las gráficas de absorbancia utilizando un coeficiente de extinción molar de $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el citocromo c. La reducción del citocromo c sensible al cianuro, se calculó restando la actividad en presencia de cianuro más citocromo c a la actividad estimulada solo con citocromo c.

5.4.8 Potencial de membrana mitocondrial

La determinación del potencial de membrana mitocondrial se evaluó empleando el kit de potencial de membrana mitocondrial (Merck; MAK159). Se crecieron las células de levadura (BY4742) en 3 mL de medio YPD suplementado con 2% de

glucosa durante toda la noche a 30 °C con agitación constante. Posteriormente, se midió la A₆₀₀ para determinar el volumen de células necesario que se agregó para tener una A₆₀₀ inicial ~ 0.1 en un matraz de 250 mL que contenía 5 mL de medio SC suplementado con glucosa (0.5 % y 5 %) y quercetina (0.1 µM y 100 µM), incubados a 30±2 °C y 200 rpm en un agitador orbital (MaxQ™600, Thermo Scientific, Waltham MA, EE. UU). Las células en la fase media logarítmica (OD₆₀₀ ~ 0.5) se centrifugaron a 4000 x g durante 4 min, se lavaron las células y el sedimento se resuspendió en la solución de PBS. En una microplaca negra de 96 pocillos, se agregaron 50 µL de suspensión celular (3×10^6 células/pocillo) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Para el análisis de la relación de fluorescencia, se evaluó la intensidad de la fluorescencia roja (excitación a 490 nm/emisión a 525 nm) y la fluorescencia verde (excitación a 540/emisión a 590 nm).

5.4.9 Análisis de la morfología celular por microscopia de fuerza atómica

Se evalúo la influencia de la quercetina sobre la morfología celular de *S. cerevisiae* empleando microscopia de fuerza atómica basados en el análisis de rugosidad. Las células de levadura (BY4742) se crecieron en medio YPD suplementado con 2% de glucosa (p/v) durante toda la noche a 30±2 °C, con agitación constante. En seguida se midió la A₆₀₀ para determinar el volumen de inóculo necesario para una A₆₀₀ inicial ~ 0.1. Las células se colocaron en un matraz de 25 mL que contenía 5 mL de medio SC suplementado con 0.1% y 5% de glucosa (p/v) y quercetina (0.1 µM y 100 µM). Los cultivos se incubaron a 30±2 °C con agitación constante, hasta su fase media exponencial (A₆₀₀ ~ 0.6). En seguida, se colocaron 500 µL en 3 capas sobre un portaobjetos y se dejaron secar en un horno (Felisa, Guadalajara, México) a 40±3 °C. Posteriormente las muestras se analizaron en un microscopio de fuerza atómica (Park Systems NX10, Suwon, Korea) en modo no contacto, utilizando una exploración con frecuencia de resonancia de 286-362 kHz, velocidad de exploración de 1 Hz y una resolución de 256 x 256 píxeles (Escamilla et al., 2018).

5.5 Formulación y evaluación del efecto antifúngico del recubrimiento comestible adicionado con quercetina

5.5.1 Formulación del recubrimiento comestible

Se preparó una solución filmogénica de quitosano al 1% (p/v) (disuelto en ácido láctico 0.5% v/v; Merck) y se agitó continuamente a 80±2 °C durante 60 min. Paralelamente se preparó una suspensión de almidón oxidado al 4 % p/v Ingredion, San Juan del Río, Querétaro, MX) en agua destilada, se calentó a 90±2 °C por 20 min y se dejó enfriar en baño de hielo. Las preparaciones se mezclaron en proporción 4:1 (p/p) (almidón oxidado:quitosano) y se agitaron por 5 min a temperatura ambiente. En seguida, se añadieron diferentes concentraciones de quercetina (40, 80, 120, 160 y 200 µM) emulsificada con Tween 80 (20% v/v). Las nanoemulsiones se obtuvieron al utilizar un mezclador de alta velocidad (IKA T25-Ultra-Turrax, DE, EE.UU.), seguido de ultrasonido por 1.5 min a 20 kHz y 75% amplitud (VCX 500 Vibra-Cell, Newton, CT, EE.UU.). La suspensión filmogénica final se extendió sobre una caja Petri previamente nivelada; el volumen añadido fue de 120 µL por cm² y se dejó secar por 48 h a 45 °C y 60% de humedad relativa (Escamilla-García et al., 2018; 2019).

5.5.2 Capacidad antifúngica de la solución filmogénica

La actividad antifúngica se evaluó contra el hongo deteriorador mencionado anteriormente. Para el reto antifúngico se realizó una extensión en placa del hongo colocando 10⁴ esporas/mL en placas con medio PDA. Posteriormente en la parte central de la caja se colocó un disco de papel filtro y se agregaron 20 µL de la solución filmogénica formulada, las cajas se incubaron a 28±2 °C durante 5 d. El efecto antifúngico se determinó mediante el diámetro del halo de inhibición (mm) (Duarte et al., 2022).

5.6 Análisis estadístico

Se realizaron un mínimo de tres experimentos biológicos independientes, reportándose el promedio \pm la desviación estándar. Los resultados obtenidos se interpretaron usando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba de Dunnett cuando se compararon contra un control y la prueba de Tukey cuando se compararon todos los promedios. Se consideró diferencia significativa cuando $p<0.05$, empleando el software GraphPad Prism.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mitocondria es la principal fuente de energía de células dependientes del metabolismo respiratorio (Herzig and Shaw, 2018; Casanova et al., 2023). Siendo el metabolismo respiratorio un conjunto de vías metabólicas (glucolisis, ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa) involucradas en la generación de energía en forma de ATP mediante la degradación de diversos sustratos, destacando a la glucosa. Durante la glucolisis y ciclo de Krebs se sintetizan los cofactores NADH y FADH₂, que fungen como donares de electrones para el complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) y complejo II (succinato deshidrogenasa), respectivamente, de la cadena transportadora de electrones. La síntesis de ATP acoplada al flujo de electrones a través de los complejos de la cadena transportadora de electrones es definida como fosforilación oxidativa, por lo cual, la fosforilación oxidativa es la mayor fuente de ATP celular (Spinelli & Haigis, 2018; Nolfi-Donegan et al., 2020). El efecto citotóxico por la suplementación de quercetina se ha relacionado con la fosforilación oxidativa, sugiriendo a la mitocondria como el principal blanco molecular de la quercetina. Sin embargo, el mecanismo molecular de citotoxicidad aún no es claro. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue elucidar el efecto citotóxico ocasionado por la suplementación de quercetina sobre la fosforilación oxidativa, empleando como modelo de estudio a la levadura *S. cerevisiae*, para posteriormente determinar el efecto antifúngico del recubrimiento comestible con quercetina.

6.1 Efecto de la suplementación de quercetina sobre el metabolismo respiratorio de *S. cerevisiae*

Con la finalidad de evaluar el efecto de la suplementación de quercetina sobre el metabolismo respiratorio, se empleó como modelo de estudio a la levadura *S. cerevisiae*, debido a que presenta un metabolismo reproto-fementativo, permitiendo asociar el efecto de la quercetina con el metabolismo respiratorio. Esto con base en

que la levadura *S. cerevisiae* presenta una característica metabólica denominada represión por glucosa, es decir, que en concentraciones altas de glucosa se promueve un metabolismo fermentativo y en concentraciones bajas de glucosa se estimula el metabolismo respiratorio. Con base en esta información se optó por evaluar el efecto de la suplementación de quercetina (0.1, 1, 10 y 100 μ M) sobre el crecimiento exponencial de *S. cerevisiae* en cinco concentraciones diferentes de glucosa, dos concentraciones altas (5 y 10%), una concentración estándar (2%) y dos concentraciones bajas (0.1 y 0.5%).

Se observó un efecto negativo sobre el crecimiento exponencial por la suplementación con quercetina (0.1, 1 y 10 μ M) dependiente de la concentración de glucosa, a excepción de la suplementación de 100 μ M de quercetina que sólo mostró un efecto negativo significativo en los medios suplementados con 0.1% de glucosa (Figura 7). Estos datos sugieren que la influencia negativa sobre el crecimiento exponencial es dependiente de la concentración de glucosa, observando la mayor disminución en el porcentaje de crecimiento exponencial en bajas concentraciones de glucosa (0.1 y 0.5%).

Estos datos concuerdan con estudios realizados en *S. cerevisiae* que describen que la suplementación de resveratrol (1, 10, 100 y 1000 μ M) presenta un efecto negativo sobre la viabilidad celular dependiente de la concentración de glucosa, reportando que en concentraciones bajas de glucosa el efecto negativo sobre la viabilidad celular es mayor en comparación con concentraciones altas de glucosa (Madrigal-Perez et al., 2016).

Por otra parte, la suplementación de 100 μ M de quercetina mostró una disminución significativa sobre el crecimiento exponencial en la concentración más baja de glucosa (0.1%) (Figura 7). Destacando que el mayor efecto negativo sobre el crecimiento exponencial por la suplementación de quercetina se observa en concentraciones bajas de glucosa, donde el metabolismo predominante es la

respiración, sugiriendo que el efecto negativo sobre el crecimiento exponencial causado por la suplementación de glucosa está relacionado con una alteración en la fosforilación oxidativa.

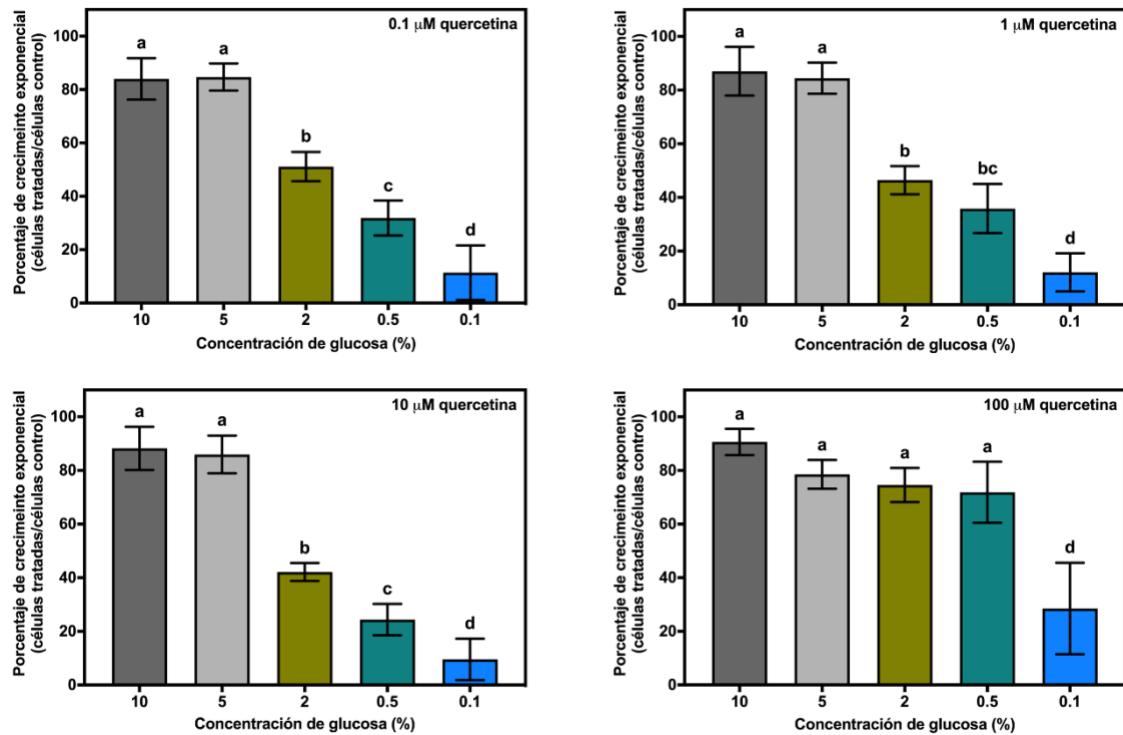


Figura 7. La suplementación de quercetina afecta negativamente el crecimiento exponencial de *S. cerevisiae* dependiente de la concentración de glucosa. Se evaluó el efecto de la suplementación de quercetina (0.1, 1, 10 y 100 μ M) sobre el crecimiento celular de *S. cerevisiae* en medio SC suplementado con glucosa (0.1, 0.5, 2, 5 10% (p/v). Se muestra la desviación estándar de cinco experimentos independientes por duplicado, las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Con la finalidad de visualizar la relación entre la quercetina y el metabolismo respiratorio se realizó un análisis de correlación, mostrando una relación negativa esperada entre la concentración de glucosa y la respiración mitocondrial, remarcando que en concentraciones bajas de glucosa se observan los mayores valores de consumo de oxígeno, los cuales disminuyen de forma dependiente del incremento de la concentración de glucosa (Figura 8). Por su parte, el factor de

cambio del crecimiento específico por la suplementación de quercetina y la concentración de glucosa tuvieron una correlación positiva (0.1 μ M quercetina, $r = 0.907$; 1 μ M quercetina, $r = 0.879$; 10 μ M quercetina, $r = 0.927$), mostrando que el incremento en el valor del factor de cambio del crecimiento específico es dependiente del incremento de la concentración de glucosa respaldando la sugerencia de que la influencia negativa de la quercetina sobre el crecimiento exponencial a bajas concentraciones de glucosa podría estar relacionada con una alteración en la respiración mitocondrial. Por su parte, la suplementación 100 μ M de quercetina presentó una correlación baja (Figura 8), lo cual concuerda con los datos que muestran que al 0.1% de glucosa la suplementación de 100 μ M de quercetina afecta de manera negativa el porcentaje de crecimiento exponencial (Figura 7). En conjunto los datos sugieren que la influencia negativa por la suplementación de quercetina sobre el crecimiento exponencial de *S. cerevisiae* está relacionada con una alteración sobre la respiración mitocondrial.

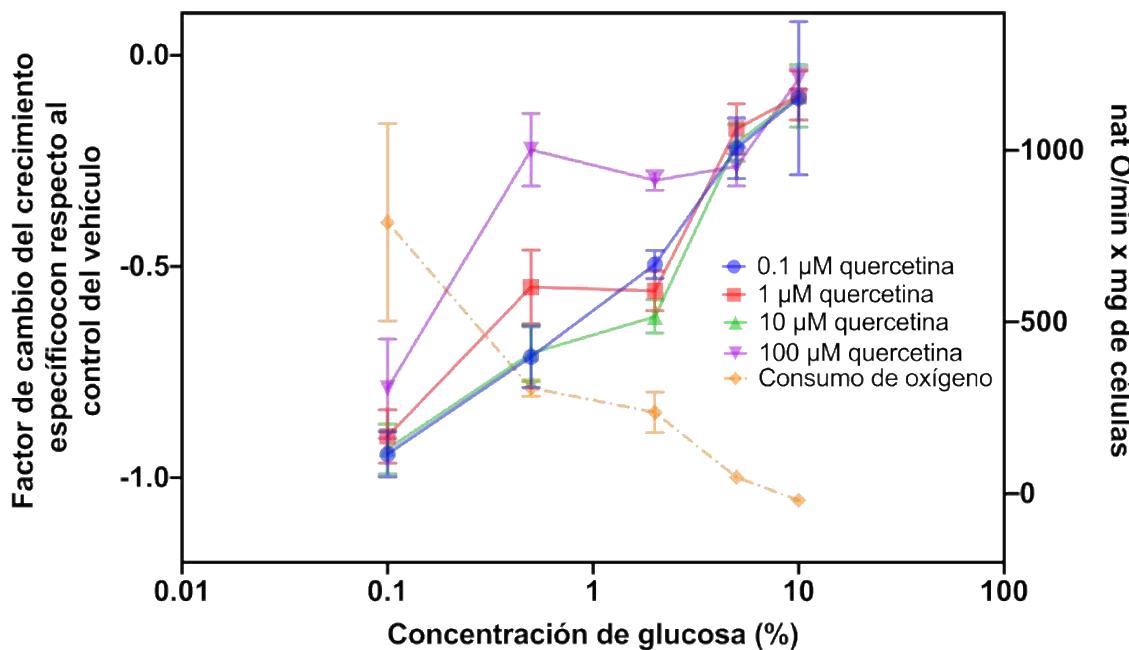


Figura 8. Efecto de la quercetina dependiente de la concentración de glucosa y del consumo de oxígeno. Las barras representan la desviación estándar de 3 y 5 experimentos independientes por duplicado ($p < 0.05$).

Con base en los datos anteriores se optó por comparar el efecto de la suplementación de quercetina con la antimicina A, inhibidor de la cadena transportadora de electrones (específicamente del complejo III, Figura 6), teniendo en cuenta que la antimicina A influye de manera negativa sobre la respiración mitocondrial. Para lo cual se visualizó el crecimiento celular de *S. cerevisiae* en un medio suplementado con 5% de glucosa, permitiendo evaluar el efecto de la suplementación de quercetina (0.1, 1, 10 y 100 μ M) y antimicina A (20 μ g/mL), tanto en el metabolismo fermentativo como en el respiratorio.

Los resultados muestran que las células suplementadas con quercetina (0.1, 1 y 10 μ M) presentan un fenotipo de crecimiento similar a las células suplementadas con antimicina A, exhibiendo un menor crecimiento en comparación con las células control, respaldando la sugerencia de que el efecto observado por la suplementación de quercetina sobre el crecimiento exponencial está relacionado con su influencia sobre la respiración mitocondrial. Adicionalmente, las células suplementadas con 100 μ M de quercetina muestran un comportamiento similar a las células control coincidiendo con los datos anteriores, donde se observó que la suplementación de quercetina (100 μ M) afectaba el crecimiento exponencial en la concentración de 0.1% de glucosa (Figura 9).

Cabe destacar que a concentraciones del 5% de glucosa predomina el metabolismo fermentativo. Sin embargo, se ha reportado en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* que, durante el metabolismo fermentativo, la respiración coadyuva a la proliferación por su influencia sobre la síntesis de aminoácidos (Malecki et al., 2020). Los datos de las curvas de crecimiento muestran que la suplementación de quercetina (0.1, 1 y 10 μ M) influye de manera negativa sobre el crecimiento celular en la fase respiro-fermentativa. Se observa un comportamiento similar a la suplementación de antimicina A, lo cual podría estar relacionado con lo reportado en *S. pombe*.

Por otra parte, durante el crecimiento respiratorio se observa que la suplementación de 0.1 μM de quercetina presenta un comportamiento similar en comparación con la suplementación de antimicina A. A diferencia de la suplementación de 1 y 10 μM de quercetina, donde se percibe al final de la curva de crecimiento un incremento en comparación con la suplementación de antimicina A. Esto podría estar relacionado con el efecto nulo sobre el crecimiento celular observado por la suplementación de 100 μM de quercetina. Los datos obtenidos reafirman la sugerencia de la influencia de la quercetina sobre la respiración mitocondrial.

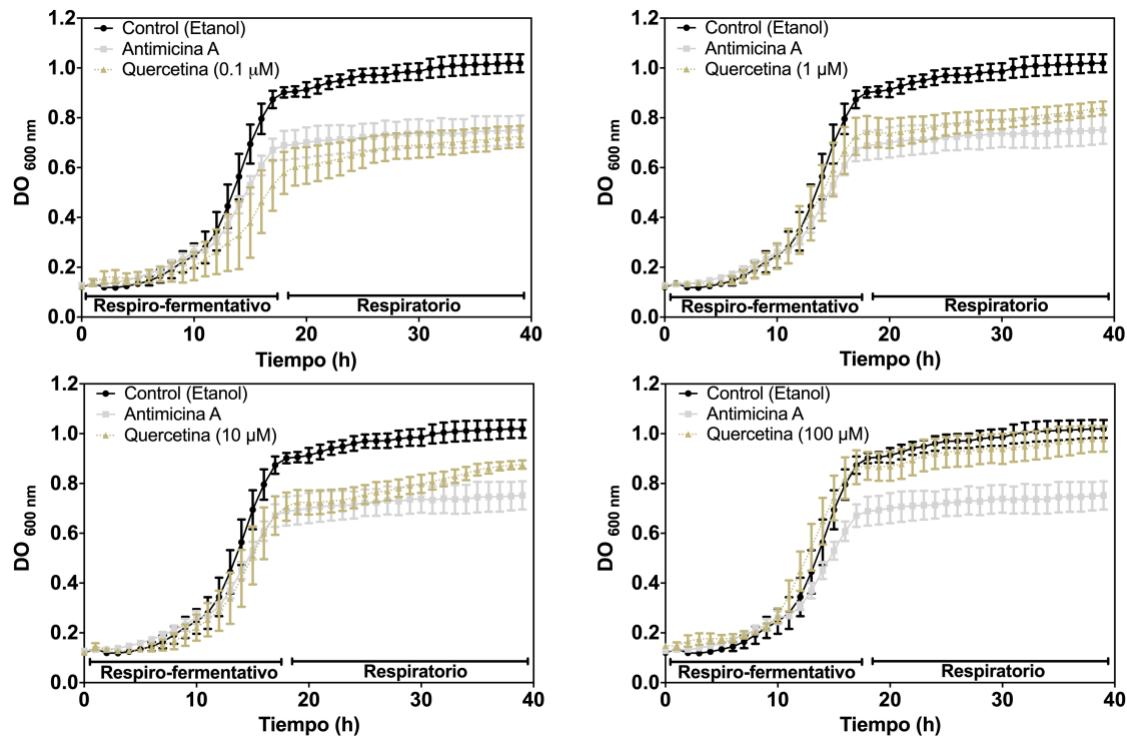


Figura 9. Efecto de la quercetina sobre el crecimiento respiro-fermentativo de *S. cerevisiae*. Se evaluó el efecto de la quercetina (0.1 y 100 μM) y la antimicina A (inhibidor del complejo III) sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* en medio SC suplementado con 5% de glucosa. Las barras representan la desviación estándar de tres experimentos independiente por duplicado.

Dado que los resultados confirman la influencia de la quercetina sobre la respiración mitocondrial, se decidió evaluar la influencia de la quercetina mediante el

crecimiento celular en medios suplementados con fuentes de carbono no fermentables que proveen electrones a la NADH deshidrogenasa (etanol), a la fosa de ubiquinonas (glicerol) y al citocromo C (lactato), con la finalidad de evaluar la influencia de la quercetina sobre el metabolismo respiratorio. Los resultados obtenidos muestran que la suplementación de quercetina no afecta el crecimiento de la levadura en medios suplementados con etanol; mientras que, en los medios suplementados con glicerol y lactato se observa un crecimiento nulo, a excepción de la suplementación de quercetina (0.1 μ M) cuando se tiene como sustrato al lactato (Figura 10). Estas evidencias sugieren que la quercetina podría estar afectando la cadena transportadora de electrones a partir de la fosa de ubiquinonas (ver Figura 6).

Estos datos coinciden con lo reportado en mitocondrias aisladas de células de rata, donde la suplementación de quercetina en concentraciones de 20 y 60 μ g/mg de proteína influyó de manera negativa sobre el transporte de electrones a través de la cadena transportadora de electrones, sugiriendo una inhibición específicamente a partir del complejo II (Yusupova et al., 2019)

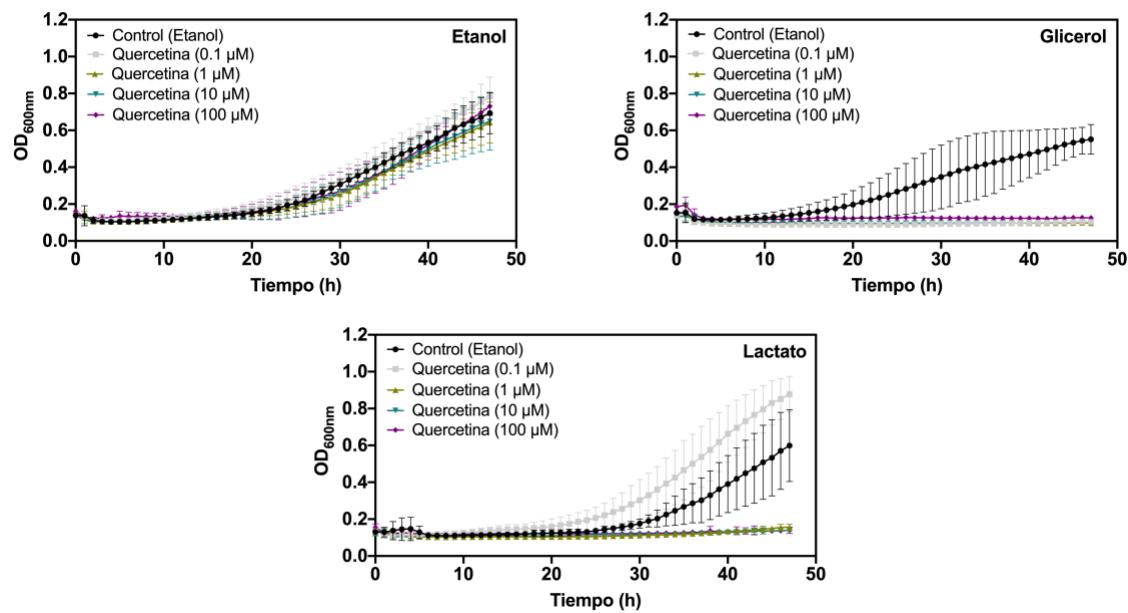
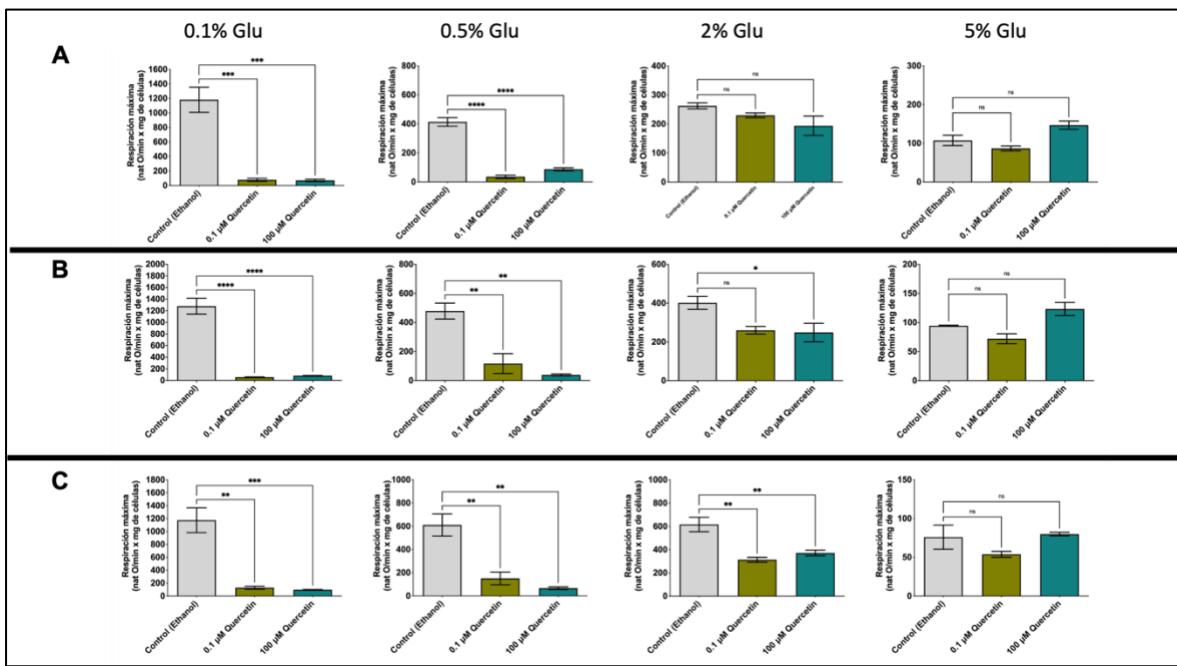
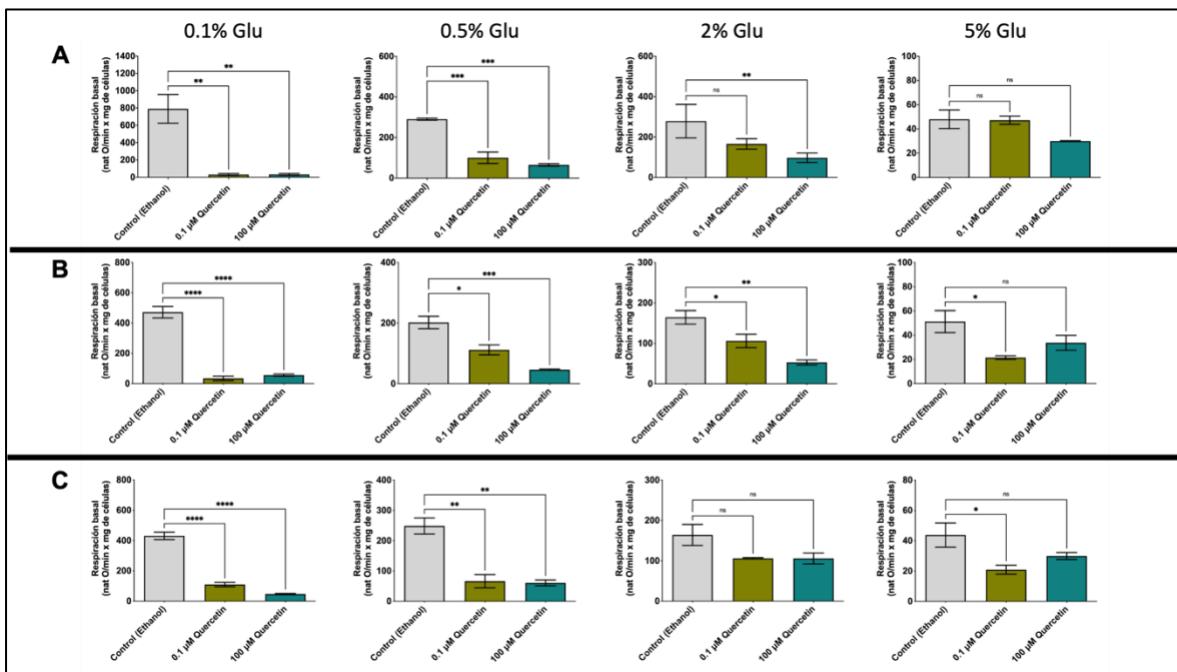


Figura 10. Efecto de la quercetina sobre el crecimiento respiratorio de *S. cerevisiae*. El crecimiento celular de *S. cerevisiae* se evaluó en medio SC suplementado con fuentes de carbono no fermentables (etanol 2%, glicerol 2% y lactato 2%). Las barras muestran la desviación estándar de tres experimentos independientes por duplicado.

En conjunto, los resultados anteriores dirigen la influencia de la quercetina a la respiración mitocondrial, sugiriendo que la quercetina puede influir en la cadena transportadora de electrones dependiente de la fosa de ubiquinonas y/o el citocromo *C*.

Por lo anterior, se decidió evaluar la influencia de la suplementación de quercetina sobre la respiración mitocondrial de *S. cerevisiae*. Considerando que la suplementación de 0.1, 1 y 10 μ M de quercetina presenta un comportamiento similar en comparación con 100 μ M, solo se emplearon las concentraciones de 0.1 y 100 μ M de quercetina para la determinación del consumo de oxígeno en medios suplementados con diferentes concentraciones de glucosa (0.1, 0.5, 2 y 5%). Para la determinación del consumo de oxígeno se emplearon los sustratos glucosa, glicerol y lactato.

La determinación del consumo de oxígeno es una herramienta experimental que permite el análisis de mecanismos mitocondriales de acción de diversos compuestos, esta herramienta nos permite evaluar diferentes condiciones del metabolismo respiratorio como respiración basal, máxima y acoplada a la generación de ATP (Divakaruni & Jastroch, 2022). La respiración basal es el consumo de oxígeno posterior a la suplementación de un sustrato de interés (p. ej. glucosa, glicerol o lactato) en condiciones fisiológicas, es decir sin adicionar inhibidores o estimuladores. La respiración máxima es el consumo máximo de oxígeno ocasionado por un estímulo como el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones por la suplementación de CCCP. La respiración acoplada a la generación de ATP es el consumo de oxígeno posterior a la suplementación de un inhibidor de la ATPsa como la oligomicina (Sperling et al 2019). Los resultados muestran una influencia negativa por la suplementación de quercetina sobre la respiración basal, respiración máxima y la respiración acoplada a la generación de ATP (Figura 11). Estos datos concuerdan con lo reportado en otros modelos de estudio, como en el caso de larvas de pez cebra, donde la suplementación de 1 y 10 $\mu\text{g/L}$ de quercetina disminuyó el consumo de oxígeno (Zhang et al., 2017). Además, en líneas celulares (Flp-In HEK293) se observó que la suplementación de 300 μM de quercetina influye sobre la reducción del consumo de oxígeno (Hawley et al., 2010). Cabe destacar que, al evaluar la influencia de la quercetina sobre el consumo de oxígeno en diferentes concentraciones de glucosa, se visualiza un efecto dependiente de la concentración de glucosa. De manera que al incrementar la concentración de glucosa la disminución en el consumo de oxígeno es mitigada y, a pesar de que la quercetina sigue limitando la respiración mitocondrial, el efecto no es significativo (Figura 11).



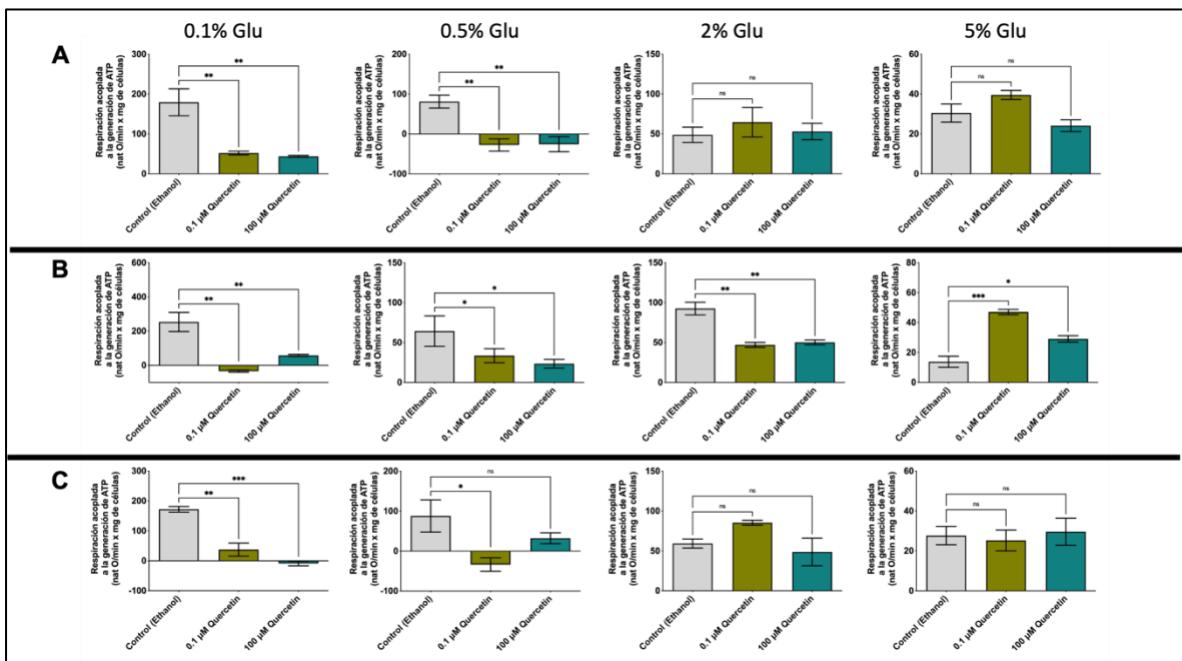


Figura 11. Efecto de la quercetina sobre la respiración mitocondrial de *S. cerevisiae*. La suplementación de quercetina (0.1 y 100 μ M) influye de manera negativa sobre la respiración basal, máxima y la acoplada a la generación de ATP dependiente de la concentración de glucosa (Glu). A) glucosa, B) glicerol y C) lactato. Se muestra la desviación estándar de tres experimentos independientes por duplicado (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). El análisis estadístico se realizó empleando una ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett's versus control (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$). ANOVA, análisis de varianza; ns, no significativo.

Es importante destacar que la suplementación de los diferentes sustratos (glucosa, glicerol y lactato) presentaron tendencia similar. Destacando que el efecto de la quercetina sobre el consumo de oxígeno es dependiente de la concentración de glucosa. Esto concuerda con los datos anteriores sugiriendo que la mayor pérdida en el porcentaje de crecimiento exponencial observada en concentraciones bajas de glucosa está relacionada con la disminución del consumo de oxígeno ocasionada por la suplementación de quercetina. Sin embargo, los datos obtenidos no proporcionan información sobre el sitio de acción de la quercetina en la cadena transportadora de electrones.

Con la finalidad de explorar de manera específica el sitio de acción de la quercetina, dependiente de la cadena transportadora de electrones, se optó por evaluar el efecto de la quercetina (0.1 y 100 μ M) sobre la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones (complejo II, segmento complejo II-III y complejo IV, Figura 6) en medios suplementados con glucosa (0.1 y 5% p/v).

En los medios suplementados con 0.1% de glucosa la suplementación de quercetina (0.1 y 100 μ M) redujo de manera significativa la actividad del complejo II y IV; mientras, que la actividad del segmento complejo II-III no fue alterada (Figura 12A). Por otra parte, en los medios suplementados con 5% glucosa solo la suplementación con 0.1 μ M de quercetina redujo de manera significativa la actividad del complejo II y IV, pero no alteró la actividad del segmento II-III. Sin embargo, la suplementación de 100 μ M de quercetina incrementó la actividad del segmento II-III y redujo la actividad del complejo IV (Figura 12B).

La reducción de la actividad de los complejos II y IV, concuerda con la sugerencia de que el sitio de acción de la quercetina podría ser la fosa de ubiqüinonas y/o citocromo c. Este resultado está de acuerdo con lo reportado en partículas submitocondriales de ratas Wistar, donde la suplementación con quercetina (10 μ M) causó la inhibición del complejo I, dependiente de la concentración de coenzima Q. Por otro lado, el segmento II-III no presentó cambios, sugiriendo una competencia entre la ubiqüinona y la quercetina por sitios de unión con el complejo I. Además, se ha sugerido que la quercetina podría fungir como una molécula mimética a la ubiqüinona permitiendo o limitando el transporte de electrones (Lagoa et al., 2011).

Considerando que el complejo II y el glicerol donan electrones a la fosa de ubiqüinonas, los resultados obtenidos sobre la actividad del complejo II (Figura 12) y el crecimiento celular en glicerol como fuente de carbono no fermentable (Figura 10), sugieren que la quercetina interfiere en el transporte de electrones entre el complejo II y la fosa de ubiqüinonas.

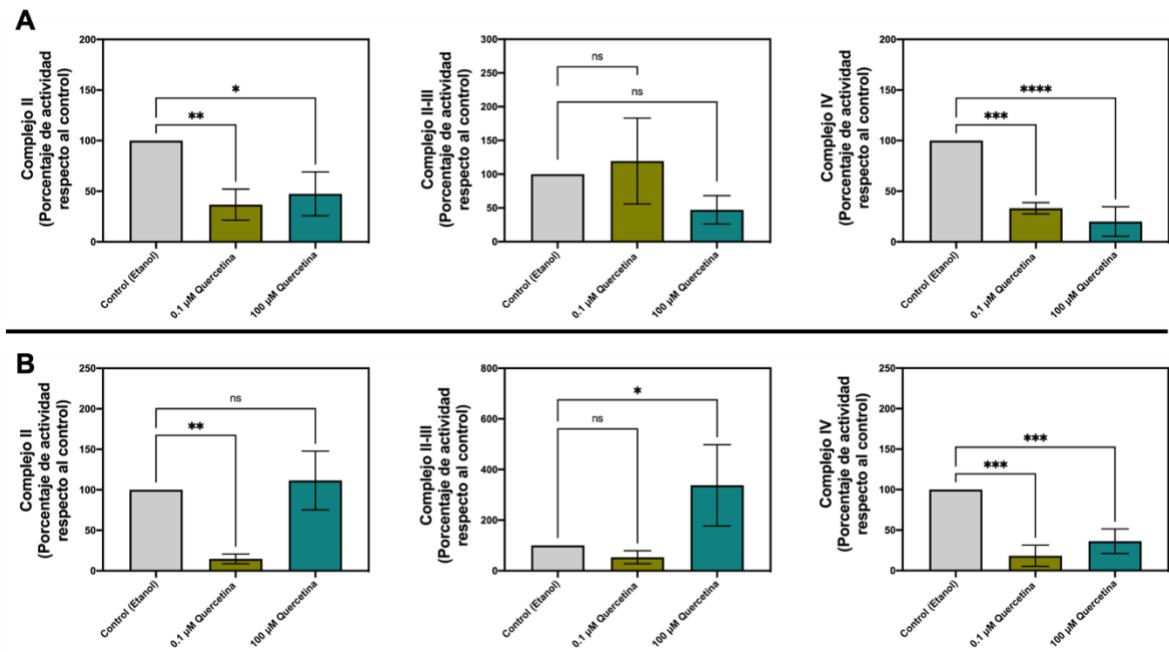


Figura 12. Influencia de la quercetina sobre la actividad de los complejos de la cadena respiratoria de *Saccharomyces cerevisiae*. Las actividades de los complejos de la cadena respiratoria se midieron en mitocondrias aisladas suplementadas con 0.1 o 100 µM de querctetina en solución de KH_2PO_4 50 mM (pH 7.6) a 4°C durante 30 min. Actividad del complejo II (succinato-DCIP oxidoreductasa); actividad del segmento complejo II-III (succinato-citocromo c reductasa sensible a la antimicina A; complejo IV (citocromo c oxidasa sensible a KCN). A) Actividad del complejo II, segmento II-III y complejo IV en medios suplementados con el 0.1% de glucosa. B) Actividad del complejo II, segmento II-III y complejo IV en medios suplementados con el 5% de glucosa. Los datos representan el porcentaje de la actividad de los complejos con respecto a la actividad control (etanol) (100%). Se muestra la desviación estándar de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó empleando una ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett versus el control (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$). ANOVA, análisis de varianza; DCIP, 2,6-diclorofenolindofenol; ANOVA: análisis de varianza; ns: no significativo.

Por otra parte, en mitocondrias aisladas de ratón se observó que la suplementación de querctetina (50 mg/kg por d, durante 15 d) reduce la actividad del complejo IV (Ruiz et al., 2015). Este reporte concuerda con el efecto negativo observado por la suplementación de querctetina sobre la actividad del complejo IV (Figura 12). Este resultado sugiere que el efecto negativo ocasionado por la querctetina (1, 10 y 100 µM) sobre el crecimiento celular en medios suplementados con lactato (Figura 10) podría ser dependiente del citocromo c. Esta idea concuerda con investigaciones previas, donde se ha sugerido que la querctetina reduce al citocromo c (Lagoa et al.,

2011). En conjunto, los resultados obtenidos sugieren como principales blancos moleculares de la quercetina a la fosa de ubiquinonas y citocromo *c* en la cadena transportadora de electrones. Considerando que la suplementación con quercetina altera el transporte de electrones se optó por evaluar el efecto de ésta sobre dos aspectos relevantes relacionados con la cadena transportadora de electrones, la generación de ATP y de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés).

6.2 Influencia de la quercetina sobre la generación de ATP en *S. cerevisiae*

Una de las principales funciones de las mitocondrias es la síntesis de ATP por medio de la fosforilación oxidativa a través de la cadena transportadora de electrones, por lo tanto, se evaluó el efecto de la quercetina sobre los niveles de ATP en las células de *S. cerevisiae*. Para lo cual, se determinó la relación ADP/ATP empleando el kit de ensayo para la relación ADP/ATP en medios suplementados con glucosa (0.1, 0.5, 2 y 5% p/v) y quercetina (0.1 y 100 μ M).

Los resultados muestran que la suplementación con quercetina influye de manera positiva sobre la relación ADP/ATP dependiente de la concentración de glucosa. Se observó que con 5% de glucosa, sólo la suplementación con 0.1 μ M de quercetina ocasiona un incremento significativo en la relación ADP/ATP. Debe aclararse que un incremento en la relación ADP/ATP es indicativo de una disminución en la concentración de ATP en las células. Por otra parte, la suplementación con 100 μ M de quercetina, no influyó de manera significativa en comparación con el control. En los medios suplementados con el 2% de glucosa, tampoco se observó un efecto significativo con los suplementos de quercetina, en comparación con el control.

Sin embargo, en los medios suplementados con 0.1 y 0.5% de glucosa, ambas concentraciones de quercetina (0.1 y 100 μ M) ocasionaron un incremento

significativo en la relación ADP/ATP. Este resultado concuerda con un estudio utilizando mitocondrias aisladas de hígado de rata Wistar, donde se reportó que la suplementación de quercetina (25 y 50 μ M) causó una disminución significativa en los niveles de ATP (Dorta et al., 2005).

Además, los resultados obtenidos muestran que la reducción en los niveles de ATP celular es dependiente de la concentración de glucosa. Esto sugiere que el efecto negativo sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* podría estar relacionado con una limitación de ATP ocasionada por la disminución de la respiración mitocondrial a causa de la alteración del transporte de electrones.

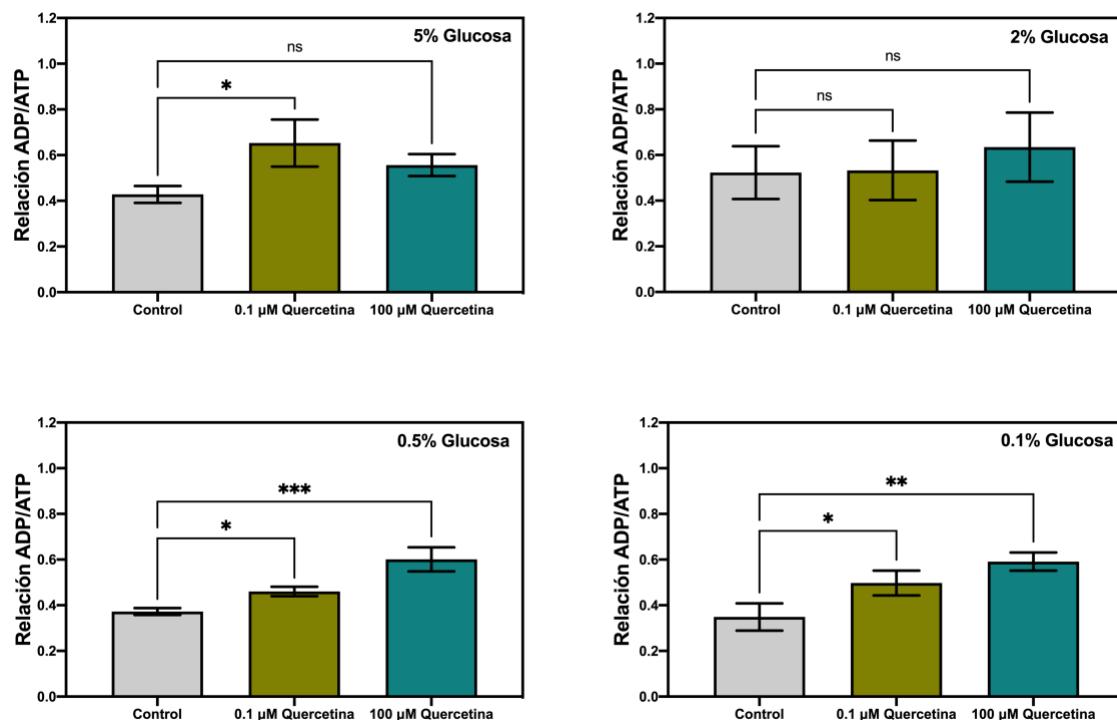


Figura 13. La suplementación de quercetina reduce los niveles de ATP en *S. cerevisiae*. Se evaluó el efecto de la suplementación de quercetina (0.1 μ M y 100 μ M) sobre la relación ADP/ATP en células de *S. cerevisiae* crecidas en medio SC suplementado con 5%, 2%, 0.5% y 0.1% de glucosa (p/v). Se muestra la desviación estándar de tres experimentos independientes analizados empleando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett versus el control (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$). ANOVA: análisis de varianza; ns: no significativo.

6.3 Influencia de la capacidad redox de la quercetina sobre la generación de especies reactivas de oxígeno en *S. cerevisiae*

Las mitocondrias son descritas como la principal fuente de ROS en la mayoría de las células (hasta un 90% del total de ROS en células). Las ROS se producen durante la fosforilación oxidativa, por medio de la cadena transportadora de electrones, por lo cual, es de esperar que la suplementación con quercetina presenta influencia sobre la generación de ROS (Balaban et al., 2005; Tirichen et al., 2021).

En *S. cerevisiae*, las principales ROS generadas son el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2). La generación de O_2^- es atribuida a la fuga de electrones de la cadena respiratoria. Posteriormente, la enzima superóxido dismutasa cataliza la dismutación de O_2^- a H_2O_2 (Ayer et al., 2013). Considerando la sugerencia de que la quercetina altera el paso de electrones a través de la cadena respiratoria afectando la generación de ATP, es relevante evaluar si la generación de ROS es alterada por la suplementación con quercetina.

Por lo tanto, se evaluó la concentración de ROS empleando el kit de ensayo para anión superóxido Amplex Red y el reactivo H₂DCFDA (para la determinación de H₂O₂) en medios suplementados con glucosa (0.1, 0.5, 2 y 10%) y quercetina (0.1 y 100 μ M). Los resultados para el anión superóxido muestran que la suplementación con 0.1 μ M de quercetina ocasiona un incremento significativo de O_2^- en las cuatro condiciones de glucosa (Figura 14). Por su parte, la suplementación de 100 μ M de quercetina sólo incrementó de manera significativa la concentración de O_2^- en el medio suplementado con 0.1% de glucosa (Figura 14).

El incremento en los niveles de O_2^- ha sido reportado en otros modelos de estudio, como fue el caso de células de cáncer de colon (HCT116) y mitocondrias aisladas, donde la suplementación con 50 μ M de quercetina potenció la generación de O_2^- .

(De Marchi et al., 2009). Los incrementos en los niveles de O_2^{*} coinciden con los resultados observados para el crecimiento celular (Figura 7). Aquí, la suplementación con 0.1 μ M de quercetina, afecta negativamente el crecimiento celular en medios suplementados con glucosa (0.1, 0.5 y 2%). Por otro lado, la suplementación con 100 μ M de quercetina sólo afecta de negativamente al crecimiento celular en los medios suplementados con el 0.1 % de glucosa. Este resultado sugiere que este efecto negativo sobre el crecimiento celular, está relacionado con el incremento en los niveles de O_2^{*} .

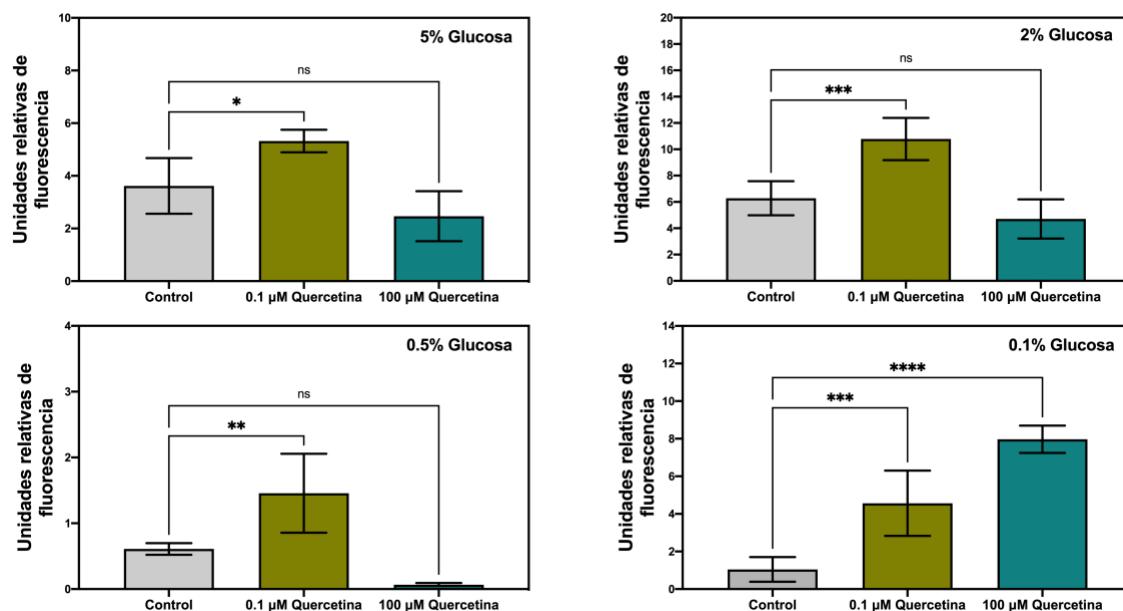


Figura 14. La suplementación de quercetina potencializa la generación de anión superóxido en *S. cerevisiae*. Se evaluó el efecto de la suplementación de quercetina (0.1 μ M y 100 μ M) sobre la generación de anión superóxido en medio SC suplementado con 5%, 2%, 0.5% y 0.1% de glucosa (p/v). Se muestra la desviación estándar de cinco experimentos independientes por triplicado analizados empleando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett's versus control (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$). ANOVA, análisis de varianza; ns, no significativo.

Por su parte, los resultados obtenidos en la evaluación de H_2O_2 , muestran que la suplementación con quercetina (0.1 y 100 μ M) no afectó de manera significativa en medios suplementados con 5, 2 y 0.5 % de glucosa. Se observó un efecto negativo

significativo por la suplementación de 0.1 y 100 μM de quercetina, en los medios conteniendo 0.1% de glucosa (Figura 15).

La influencia de la quercetina sobre los cambios de óxido-reducción que ocurren en la célula, genera cuestionamientos sobre la relación entre la generación de ROS y su efecto citotóxico. Además, es relevante mencionar que en los últimos años se ha fortalecido la hipótesis que sugiere a la quercetina como un compuesto con efecto pro-oxidante. Dicho efecto se ha relacionado con un incremento en los niveles de ROS celulares, pero en algunos modelos de estudio como células carcinogénicas se ha descrito que el incremento de ROS puede alcanzar niveles citotóxicos (Rather & Bhagat, 2019). Por lo anterior, aún no es claro si la generación de ROS es un evento previo o subsecuente al efecto citotóxico causado por la quercetina.

Los resultados obtenidos no permiten establecer si la acumulación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ es un evento previo que causa el efecto negativo sobre el crecimiento celular, o es un evento subsecuente causado por la interferencia en el paso de electrones. Sin embargo, sí se podría fortalecer la hipótesis de que uno de los principales blancos moleculares es la fosa de ubiqüinonas. Se ha descrito que una deficiencia funcional, o la inhibición del complejo II, puede ocasionar un incremento en la generación de ROS. Este suceso sugiere que la alteración del sitio Q_p del complejo II en *S. cerevisiae* ocasiona un incremento en la generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Debe aclararse que Q_p funge como sitio de unión entre el complejo II y la ubiqüinona (Guo & Lemire, 2003; Szeto et al., 2007). Por lo anterior, se sugiere que los incrementos en los niveles de $\text{O}_2^{\cdot-}$ podrían ser causados por una interferencia de la quercetina entre el complejo II y la fosa de ubiqüinonas. En conjunto, los resultados obtenidos en la evaluación de ROS, sugieren la generación de ROS como un evento subsecuente, ya que sólo se presentó un incremento en los niveles de $\text{O}_2^{\cdot-}$, que podría estar relacionado con el efecto de la quercetina sobre la fosa de ubiqüinonas. Debe aclararse que los niveles de H_2O_2 no fueron alterados por la suplementación con quercetina, a excepción de

los medios suplementado con 0.1% de glucosa que presentaron una disminución significativa en los niveles de H_2O_2 .

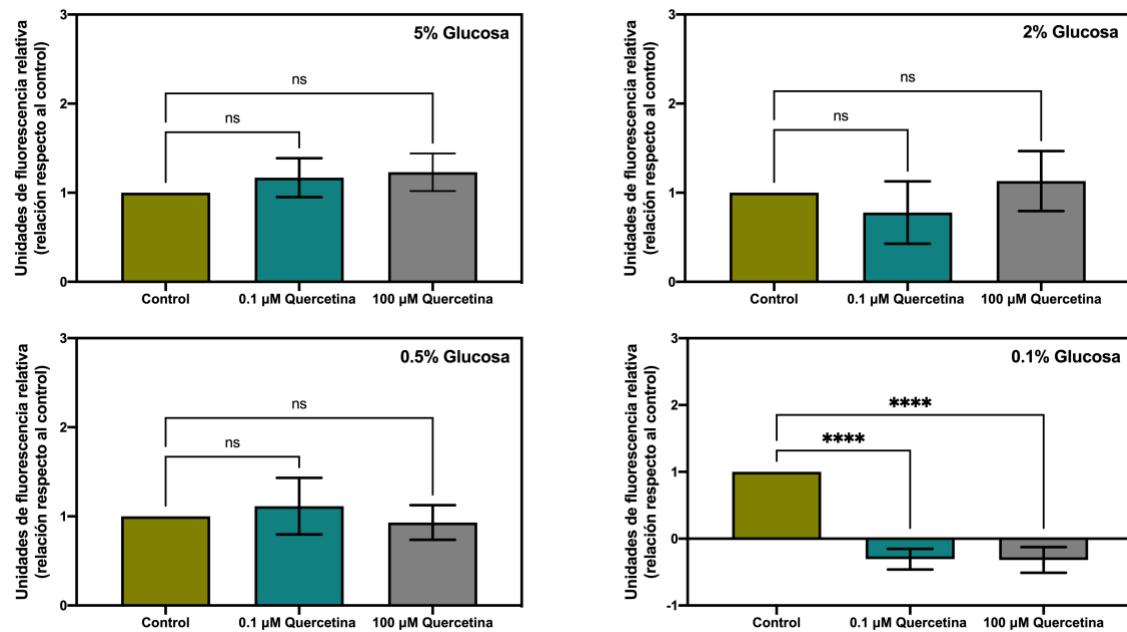


Figura 15. La suplementación de quercentina influye de manera negativa sobre la generación de peróxido de hidrogeno en *S. cerevisiae*. Se evaluó el efecto de la suplementación de quercentina (0.1 μM y 100 μM) sobre la generación de peróxido de hidrogeno en medio SC suplementado con 5%, 2%, 0.5% y 0.1% de glucosa (p/v). Se muestra la desviación estándar de cinco experimentos independientes por triplicado analizados empleando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett's versus control (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$). ANOVA: análisis de varianza; ns: no significativo.

Este resultado permitió suponer que la muerte celular causada por la suplementación con quercentina no estaba asociada a la generación de ROS en dichas células. Sin embargo, las evidencias no permiten establecer de manera directa si el efecto negativo sobre el crecimiento celular de *S. cerevisiae* por la suplementación con quercentina es dependiente de la generación de anión superóxido, o si ésta es un efecto subsecuente debido a la interferencia al paso de electrones.

Por otra parte, cabe resaltar que los complejos III y IV presentan menor influencia en la generación de ROS comparado con los complejos I y II (Zhao et al., 2019). Sin embargo, el citocromo *c* también es descrito como uno de los principales blancos de la quercetina, de manera que la interacción entre el citocromo *c* y la quercetina podría estar relacionada con la reducción de la actividad del complejo IV. Este efecto ya fue reportado anteriormente, con un enfoque en la influencia de la quercetina sobre la reducción del citocromo *c* (Lagoa et al., 2011).

El citocromo *c* está ampliamente relacionado con la apoptosis celular, resaltando que una de las principales características del inicio de la cascada de señalización de apoptosis en la célula es la translocación del citocromo *c* hacia el citosol. Además, el estado redox del citocromo *c* juega un papel fundamental en los procesos biológicos; el citocromo *c* férrico se relaciona con el estado pro-apoptótico y el citocromo *c* ferroso con el estado de pro-supervivencia (Brown et al., 2008).

Otro aspecto relevante del citocromo *c* son sus interacciones con componentes de la membrana celular como la cardiolipina (Basova et al., 2007). La cardiolipina es un fosfolípido aniónico, que conforma aproximadamente del 15% al 20% de la membrana interna mitocondrial. Presenta una diversidad de funciones, destacando su influencia sobre la estructura y función de la membrana interna mitocondrial. Se ha sugerido que la cardiolipina favorece el plegado de la membrana y podría fungir como un transportador lateral de protones de los complejos hacia la ATP sintasa, debido a su característica aniónica (Pennington et al., 2019). La interacción entre el citocromo *c* y la cardiolipina forman el complejo citocromo *c*:cardiolipina alterando el estado redox y la actividad peroxidasa del citocromo *c*. Una alteración en la interacción del complejo citocromo *c*:cardiolipina se ha relacionado con la liberación del citocromo *c* de las mitocondrias, lo cual, es un paso fundamental en el inicio de la apoptosis celular (Basova et al., 2007; Lagoa et al., 2017). Por lo tanto, la influencia de la quercetina sobre el estado redox del citocromo *c* podría estar relacionada con el mecanismo citotóxico de la quercetina. Sin embargo, se ha

reportado que la suplementación de concentraciones bajas de quercetina (10 μ M) no afectan la unión del complejo citocromo *c*:cardiolipina (Lagoa, et al., 2017). En este estudio ya se reportó que la suplementación de concentraciones bajas de quercetina (0.1 μ M, 1 μ M y 10 μ M) influyen de manera negativa sobre el crecimiento celular de *S. cerevisiae* y la suplementación con 100 μ M de quercetina no afecta el crecimiento celular, presentando un comportamiento similar al control (Figura 9).

En conjunto, los resultados que se han presentado, sugieren que el efecto citotóxico por la suplementación de quercetina, depende principalmente de la disfunción mitocondrial, ocasionada por una limitación en el paso de electrones a través de la cadena transportadora de electrones.

Sin embargo, la evidencia no permite discriminar la influencia de la generación de ROS y el estado redox del citocromo *c* sobre el efecto citotóxico de la quercetina, ya que se han observado tendencias similares en medios suplementados con altas y bajas concentraciones de glucosa. Esto se exemplifica con la disminución en la actividad de los complejos II y IV, alteración de la generación de ROS y limitación en la generación de ATP. Por su parte, el consumo de oxígeno solo presentó una disminución significativa en bajas concentraciones de glucosa, y que a estas concentraciones el metabolismo respiratorio es la principal fuente de ATP, mientras que altas concentraciones de glucosa favorecen el metabolismo fermentativo. Se sugiere que en concentraciones altas de glucosa la limitación del crecimiento celular podría estar relacionado con aspectos como la generación de ROS y el estado redox del citocromo *c*. Mientras que la limitación del crecimiento celular ocasionada por la suplementación con quercetina, en bajas concentraciones de glucosa, podría ser atribuido principalmente a la limitación de la CTE, de manera específica sobre la fosa de ubiquinona o citocromo *c*. Por otra parte, un aspecto relevante dentro del efecto citotóxico de la quercetina es su internalización a la célula.

6.4 Efecto de la quercetina sobre la membrana celular en *S. cerevisiae*

La internalización de la quercetina es un paso fundamental para su mecanismo de acción, se ha sugerido que la quercetina podría estar interactuando con las cabezas polares de los fosfolípidos que conforman las membranas celulares y mitocondriales (Hendrich et al., 2002; Košinová et al., 2011). Además, se ha sugerido que la quercetina altera la permeabilidad de las membranas celulares, ocasionando una alteración en la fluidez de la membrana celular (Kreczmer et al., 2021; Dini & Grumetto, 2022; Meleleo et al., 2023). Por lo anterior, se evaluó el efecto de la suplementación con quercetina sobre la morfología celular empleando microscopía de fuerza atómica. Los resultados muestran que la suplementación con quercetina (0.1 μ M y 100 μ M) no afecta de manera significativa la morfología de *S. cerevisiae*, esto con base en el análisis de rugosidad. Cabe mencionar que empleando las bacterias *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* se observó que, la suplementación con quercetina (como agente fotosensibilizante) y la aplicación de un tratamiento fotodinámico (luz azul a 405 nm de longitud de onda y con un flujo radiante de 10 mW) de manera independiente, no afectaron la integridad de la membrana. Sin embargo, al emplearse en conjunto se observaron poros en la membrana y un incremento de la captación de quercetina por parte de las células; destacando que el daño membranal causado fue atribuido a la generación de ROS (Lee et al., 2022). Cabe destacar que el tratamiento fotodinámico se fundamenta en la suplementación de un agente fotosensibilizante que es irradiado con una longitud de luz específica causando la generación de ROS (Prado-Silva et al., 2022). En conjunto estos datos sugieren que, a pesar de la interacción reportada entre la quercetina y los fosfolípidos de la membrana, la suplementación de concentraciones de 0.1 μ M y 100 μ M de quercetina podrían alterar la fluidez, sin causar la generación de poros sobre la membrana celular.

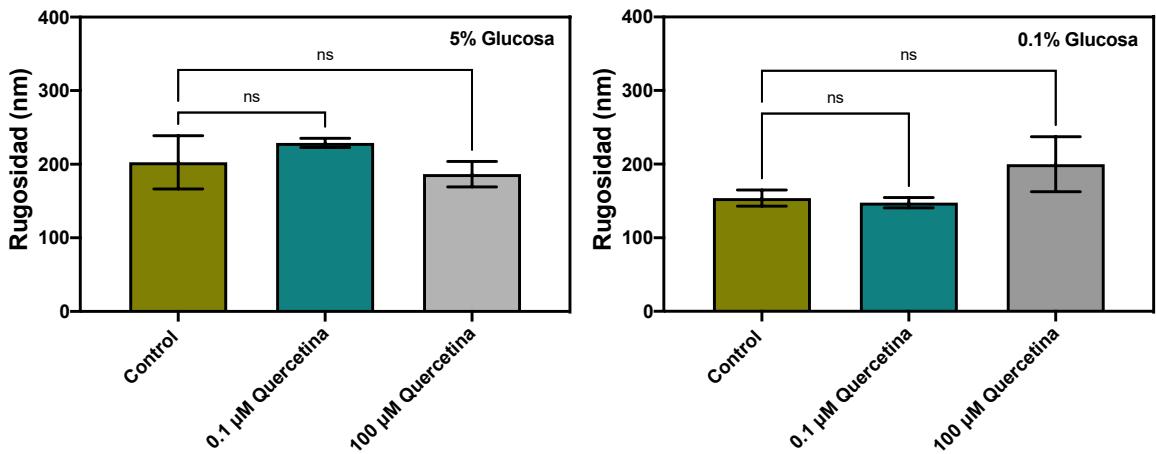


Figura 16. La morfología de *S. cerevisiae* no es afectada por la suplementación de quercetina. Se evaluó la influencia de la suplementación de quercetina sobre la morfología de *S. cerevisiae* empleando microscopía de fuerza de átomo en medio SC suplementado con 0.1% y 5% de glucosa (p/v). Se muestra la desviación estándar de tres experimentos independientes analizados empleando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett versus el control; ANOVA: análisis de varianza; ns: no significativo.

6.5 Efecto antifúngico del recubrimiento comestible

Los polifenoles son compuestos producidos por una amplia variedad de plantas, principalmente, como mecanismo de defensa frente a diversas condiciones de estrés biótico y abiótico (Stiller et al., 2021). Estos compuestos presentan una diversidad de propiedades biológicas, destacando sus efectos benéficos sobre la salud como propiedades antioxidantes, anticancerígenas, neuroprotectoras (Overman et al., 2011; Sato & Mukai, 2020). Sin embargo, también presentan efectos citotóxicos induciendo apoptosis en diversos organismos como levaduras y hongos (Nguyen & Bhattacharya, 2022). Su efecto citotóxico ha sido relacionado con su influencia sobre factores apoptóticos, limitación del metabolismo respiratorio y la generación de especies reactivas de oxígeno. Por lo cual, en los últimos años diversas investigaciones se han enfocado en la actividad antimicrobiana de diversos polifenoles, entre los que destaca la quercetina. Se ha reportado que la quercetina es un potente agente antimicrobiano frente a patógenos bacterianos, virales y fúngicos (Nguyen & Bhattacharya, 2022). Con base en esta información se optó por

evaluar el efecto antifúngico de la quercetina incorporada en la formulación de un recubrimiento comestible a base de quitosano al 1% (p/v) y almidón oxidado al 4 % mezclados en una proporción 4:1 (almidón oxidado:quitosano; p/p) suplementado con diferentes concentraciones de quercetina (40, 80, 120, 160 y 200 μ M) emulsificada en Tween 80 al 20% v/v.

Con la finalidad de extrapolar los datos a una aplicación en frutos, se realizó la evaluación del efecto antifúngico de la quercetina empleando la solución filmogénica y el recubrimiento mediante la determinación de los halos de inhibición. Los resultados muestran que la suplementación con quercetina (40, 80, 120, 160 y 200 μ M) no presenta un efecto inhibitorio frente al hongo *C. gloeosporioides*.

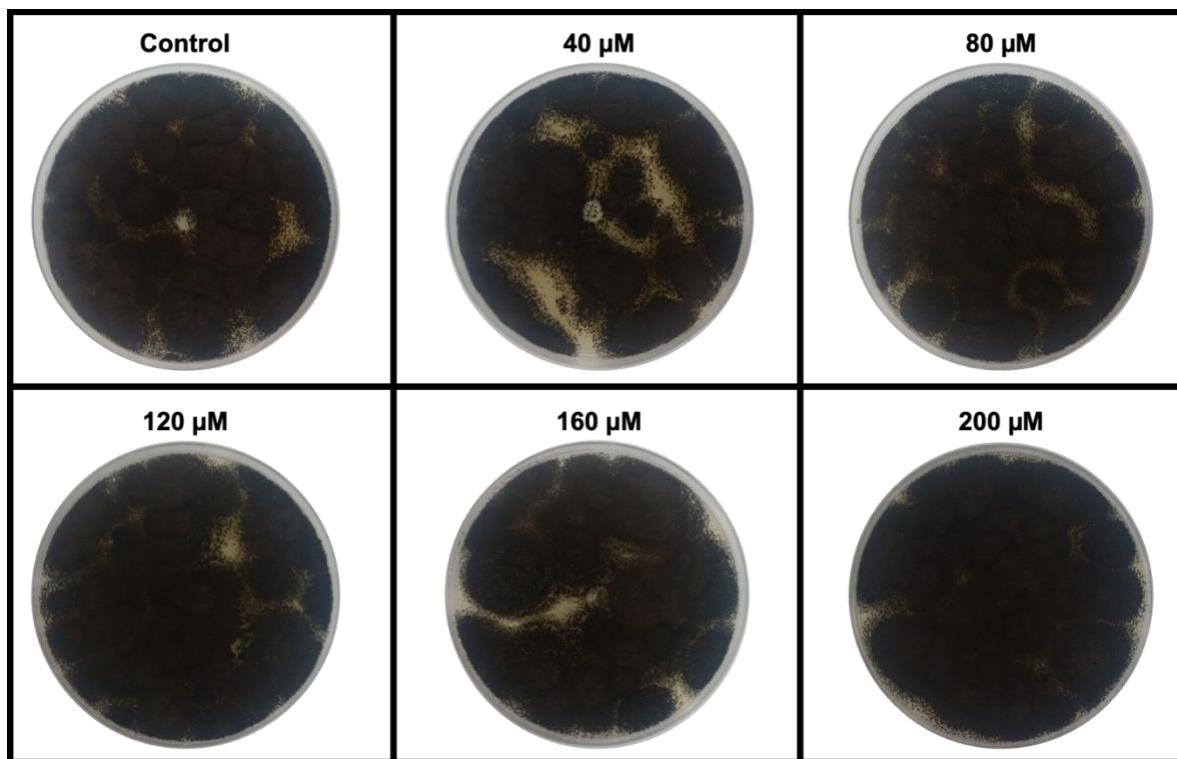


Figura 17. La quercetina no afecta la esporulación de *C. gloeosporioides*. Se evaluó el efecto antifúngico de la quercetina a diferentes concentraciones (40, 80, 120, 160 y 200 μ M) sobre la esporulación de *C. gloeosporioides*, dependiente del halo de inhibición. Se inoculó por extensión en superficie 1×10^4 esporas/mL, en disco de papel filtro se colocaron 20 μ L de la solución filmogénica conteniendo (40, 80, 120, 160 y 200 μ M). Las cajas se incubaron a 27 °C durante 5 días.

Cabe destacar que debido a la formulación del recubrimiento se optó por emplear Tween 80 al 20% como agente emulsificante para disolver la quercetina, lo cual limitó la concentración máxima de quercetina a 200 μM .

A pesar de que existe evidencia del efecto antifúngico de la quercetina en diversos hongos, los resultados obtenidos pueden estar relacionados con mecanismos de resistencia de los hongos (Figura 17). Se ha descrito una correlación entre la capacidad antifúngica y la capacidad lipofílica de los flavonoides. Por lo cual, una de las principales estrategias de resistencia de los hongos se basa en aumentar la propiedad hidrofílica de los flavonoides. Un estudio empleó el hongo *Rhizopus azygosporus* frente a la suplementación de naringenina (220 μM) y quercetina (200 μM), las cuales no afectaron el crecimiento celular en comparación con el control. Se observó que la quercetina retrasó el crecimiento celular en una fase inicial, pero transcurridas 180 h no se presentó una diferencia en el crecimiento celular comparado con el control (Gonzales et al., 2016). Estos datos evidencian la capacidad de algunos hongos para metabolizar flavonoides antifúngicos en sus derivados más hidrofílicos que exhiben una menor toxicidad. Si bien la quercetina de manera individual no presentó efecto antifúngico, esta se ha empleado en conjunto con otros compuestos como el fluconazole reportando efecto antifúngico frente a *Candida tropicalis* (da Silva et al., 2014).

7. CONCLUSIONES

La suplementación con quercetina afecta negativamente el crecimiento celular respiratorio de *S. cerevisiae*, asociado a una disfunción mitocondrial. Esto ocasiona una disminución de la respiración mitocondrial, una limitación en la generación de ATP y un incremento en la concentración de anión superóxido, debido a la reducción de la actividad de los complejos II y IV. Los resultados sugieren que el sitio de acción de la quercetina es la fosa de ubiquinona y/o el citocromo c en *S. cerevisiae*.

La quercetina puede mantener su mecanismo de acción en diversos microrganismos. Sin embargo, el nulo efecto antifúngico reportado en este trabajo está relacionado con un mecanismo de resistencia que impide que la quercetina interactúe con las mitocondrias. Este efecto podría ser abordado empleando un tratamiento o agente que induzca poros en las membranas para facilitar la incorporación de la quercetina a la célula.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aboody, M. S. A. & Mickymaray, S. (2020). Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Antibiotics*, 26, 45. doi: 10.3390/antibiotics9020045
- Aghababaei, F. & Hadidi, M. (2023). Recent advances in potential health benefits of quercetin. *Pharmaceuticals*, 16, 1020. doi: 10.3390/ph16071020
- Aguirre-Güitrón, L., Calderón-Santoyo, M., Bautista-Rosales, P. U. & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2019). Application of powder formulation of *Meyerozyma caribbica* for postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* in mango (*Mangifera indica L.*). *LWT - Food Science and Technology*, 113, 108271–108277. doi:10.1016/j.lwt.2019.108271
- Aguirre-Joya, J. A., Pastrana-Castro, L., Nieto-Oropeza, D., Ventura-Sobrevilla, J., Rojas-Molina, R. & Aguilar, C. N. (2018). The physicochemical, antifungal and antioxidant properties of a mixed polyphenol based bioactive film. *Helijon*, 942–956. doi:10.1016/j.heliyon.2018.e00942
- Al Aboody, M. S. & Mickymaray, S. (2020). Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Antibiotics*, 9, 45. doi: 10.3390/antibiotics9020045
- Andres, S., Pevny, S., Ziegenhagen, R., Bakhiya, N., Schäfer, B., Hirsch-Ernst, K. I. & Lampen, A. (2018). Safety aspects of the use of quercetin as a dietary supplement. *Molecular Nutrition Food Research*, 62. doi: 10.1002/mnfr.201700447
- Armghan-Khalid, M., Niaz, B., Saeed, F., Afzaal, M., Islam, F., Hussain, M., Mahwish, Salman Khalid, H. M., Siddeeg, A. & Al-Farga, A. (2022). Edible coatings for enhancing safety and quality attributes of fresh produce: A comprehensive review. *International Journal of Food Properties*, 25, 1817–1847. doi: 10.1080/10942912.2022.2107005
- Arredondo-Ochoa, T., García Almendárez, B. E., Amaro Reyes, A., Rivera Pastrana D. M., Gutiérrez López G. F., Martín Beloso O. & Regalado-González, C. (2016). Design and characterization of corn starch edible films including beeswax and natural antimicrobials. *Food Bioprocess Technology*, 10:103–114. doi: 10.1007/s11947-016-1800-4
- Arredondo-Ochoa, T., García-Almendárez, B. E., Escamilla-García, M., Martín-Beloso O., Rossi-Márquez G., Medina-Torres, L. & Regalado-González, C. (2017). Physicochemical and antimicrobial characterization of beeswax–starch food-grade nanoemulsions incorporating natural antimicrobials. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2712-2729. doi:10.3390/ijms18122712

- Ayer, A., Gourlay, C. W. & Dawes, I. W. (2013). Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 14, 60-72. doi:10.1111/1567-1364.12114
- Azeem, M., Hani, M., Mahmood, K., Ameer, N., Sajid Chughtai, F. R. & Abid, U. (2023). An insight into anticancer, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and anti-inflammatory effects of quercetin: a review. *Polymer Bulletin*, 80, 241 - 262. doi: 10.1007/s00289-022-04091-8
- Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. ;120, 483–495. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.001
- Basova, L. V., Kurnikov, I. V., Wang, L., Ritov, V. B., & Belikova, N. A. (2007) Cardiolipin switch in mitochondria: shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity. *Biochemistry*, 46, 3423–3434
- Batiha, G. E. S., Beshbishi, A. M., Ikram, M., Mulla, Z. S., El-Hack, M. E. A., Taha, A. E., Algammal, A. M. & Elewa, Y. H. A. (2020). The Pharmacological activity, biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: Quercetin. *Foods*, 9, 374–390. doi:10.3390/foods9030374
- Berners-Lee, M., Kennelly, C., Watson, R. & Hewitt, C. N. (2018). Current global food production is sufficient to meet human nutritional needs in 2050 provided there is radical societal adaptation. *Elementa*, 52, 310–324. doi:10.1525/elementa.310
- Bi, F., Zhang, X., Bai, R., Liu, Y., Liu, J. & Liu, J. (2019). Preparation and characterization of antioxidant and antimicrobial packaging films based on chitosan and proanthocyanidins. *International Journal of Biological*, 134, 11 -19. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.042
- Brand, M. D. & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, 312, 297–312. doi:10.1042/BJ20110162
- Brown, G. C. & Borutaite, V. (2008). Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergy*, 1777, 877–881. doi: 10.1016/j.bbabiobio.2008.03.024
- Cahyana, Y., Verrell, C., Kriswanda, D., Aulia, G. A., Yusra, N. A., Marta, H., Sukri, N., Esirgapovich, S. J. & Abduvakhitovna, S. S. (2023). Properties comparison of oxidized and heat moisture treated (hmt) starch-based biodegradable films. *Polymers*, 15, 2046. doi: 10.3390/polym15092046

- Casanova, A., Wevers, A., Navarro-Ledesma, S. & Pruimboom, L. (2023) Mitochondria: It is all about energy. *Frontiers in Physiology*, 25, 1114231. doi: 10.3389/fphys.2023
- Chakarawet, K., Harris, T. D. & Long, J. R. (2020). Semiquinone radical-bridged M2 (M = Fe, Co, Ni) complexes with strong magnetic exchange giving rise to slow magnetic relaxation. *Chemical Science*, 11, 8196-8203. doi: 10.1039/D0SC03078C
- Compart, J., Singh, A., Fettke, J. & Apriyanto, A. (2023). Customizing starch properties: a review of starch modifications and their applications. *Polymers*, 15, 3491. doi: 10.3390/polym15163491
- Cook, N. C. & Samman, S. (1996). Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7, 66–76. doi:10.1080/10641963
- Cortés-Rojo, C., Calderón-Cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Estrada-Villagómez, M., Manzo-Avalos, S., Mejía-Zepeda, R., Boldogh, I. & Saavedra-Molina, A. (2009). Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41, 15-28. doi:10.1007/s10863-009-9200-3
- da Silva, C. R., de Andrade Neto, J. B., de Sousa Campos, R., Figueiredo, N. S., Sampaio, L. S., Magalhães, H. I., Cavalcanti, B. C., Gaspar, D. M., de Andrade, G. M., Lima, I. S., de Barros Viana, G. S., de Moraes, M. O., Lobo, M. D., Grangeiro, T. B. & Nobre Júnior, H. V. (2014). Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 1468 - 1478. doi: 10.1128/AAC.00651-13
- Dabeek, W. M. & Ventura Marra, M. (2019). Dietary quercetin and kaempferol: Bioavailability and potential cardiovascular-related bioactivity in humans. *Nutrients*, 11, 2288–2307. doi:10.3390/nu11102288
- Davies, C. R., Wohlgemuth, F., Young, T., Violet, J., Dickinson, M., Sanders, J.-W., Vallieres, C., & Avery, S. V. (2021). Evolving challenges and strategies for fungal control in the food supply chain. *Fungal Biology Reviews*, 36, 15–26. doi:10.1016/j.fbr.2021.01.003
- de Barros, D. P. C., Santos, R., Reed, P., Fonseca, L. P. & Oliva, A. (2022). Design of quercetin-loaded natural oil-based nanostructured lipid carriers for the

treatment of bacterial skin infections. *Molecules*, 27, 8818. doi: 10.3390/molecules27248818

De León-Zapata, M. A., Pastrana-Castro, L., Barbosa-Pereira, L., Rua-Rodríguez, M. L., Saucedo, S., Ventura-Sobrevilla, J. M., Salinas-Jasso, T. A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2017). Nanocoating with extract of tarbush to retard Fuji apples senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 134, 67–75. doi:10.1016/j.postharvbio.2017.08.010

De Marchi, U., Biasutto, L., Garbisa, S., Toninello, A., & Zoratti, M. (2009). Quercetin can act either as an inhibitor or an inducer of the mitochondrial permeability transition pore: A demonstration of the ambivalent redox character of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787, 1425-1432. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.06.002

Díaz-Montes, E. & Castro-Muñoz, R. (2021) Edible films and coatings as food-quality preservers: an overview. *Foods*, 2, 249 - 265. doi: 10.3390/foods10020249

Dikalov, S. I. & Harrison, D. G. (2014). Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling*, 20, 372-382. doi: 10.1089/ars.2012.4886

Dini, I. & Grumetto, L. (2022). Recent advances in natural polyphenol research. *Molecules*, 11, 8777. doi: 10.3390/molecules27248777

Dorta, D. J., Pigoso, A. A., Mingatto, F. E., Rodrigues, T., Prado, I. M., Helena, A. F. C., Uyemura, S. A., Santos, A. C., & Curti, C. (2005). The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chemico-Biological Interactions*, 152, 67-78. doi:10.1016/j.cbi.2005.02.004

Du, T., Li, X., Wang, S., Su, Z., Sun, H., Wang, J. & Zhang, W. (2023). Phytochemicals-based edible coating for photodynamic preservation of fresh-cut apples. *Food Research International*, 163, 112293. doi: 10.1016/j.foodres.2022.112293

Duarte, S., Magro, A., Tomás, J., Hilário, C., Ferreira, R. B. & Carvalho, M. O. (2022). Antifungal activity of benzoquinones produced by *Tribolium castaneum* in Maize-Associated fungi. *Insects*, 13, 868. doi: 10.3390/insects13100868

Escamilla-García, M., Delgado-Sánchez L. F., Ríos-Romo, R. A., García-Almendárez B. E., Calderón-Domínguez, G., Méndez-Méndez J. V., Amaro-Reyes A., Di Pierro P. & Regalado-González, C. (2019). Effect of transglutaminase cross-linking in protein isolates from a mixture of two quinoa

varieties with chitosan on the physicochemical properties of edible films. *Coatings*, 9, 736-754. doi: 10.3390/coatings9110736

Escamilla-García, M., Rodríguez-Hernández, M. J., Hernández-Hernández, H. M., Delgado-Sánchez, L. F., García-Almendárez, B. E., Amaro-Reyes, A. & Regalado-González, C. (2018). Effect of an edible coating based on chitosan and oxidized starch on shelf life of *Carica papaya* L., and its physicochemical and antimicrobial properties. *Coatings*, 8, 318–332. doi:10.3390/coatings8090318

Firdous, N., Moradinezhad, F., Farooq, F. & Dorostkar, M. (2023). Advances in formulation, functionality, and application of edible coatings on fresh produce and fresh-cut products: A review. *Food Chemistry*, 407, 135186. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.135186

Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D. & Gurr, S. J. (2018). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360, 739–742. doi:10.1126/science.aap7999

Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L. & Gurr, S. J. (2013). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484, 7393–7411. doi:10.1038/nature10947

Flamini, R., Mattivi, F., De Rosso, M., Arapitsas, P. & Bavaresco, L. (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 19651–19669. doi:10.3390/ijms141019651

FRAC, F. R. A. C. (2021). Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (pp. 1–17). FRAC Code List, Basilea.

Fuentes, J., Atala, E., Pastene, E., Carrasco-Pozo, C. & Speisky H. (2017). Quercetin oxidation paradoxically enhances its antioxidant and cytoprotective properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 11002-11010. doi: 10.1021/acs.jafc.7b05214

Gayibov, U., Gayibova, S. N., Pozilov, M. K., Tuxtaeva, F. S., Yusupova, U. R., Djabbarova, G. M.-K., Mamatova, Z. A., Ergashev, N. A. & Aripov, T. F. (2021). Influence of quercetin and dihydroquercetin on some functional parameters of rat liver mitochondria. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 11, 2924. doi: 10.15414/jmbfs.2924

Gonzales, G. B., Smagghe, G., Wittevrongel, J., Huynh, N. T., Van Camp, J. & Raes, K. (2016). Metabolism of quercetin and naringenin by food-grade

- fungalinoculum, *Rhizopus azygosporus* Yuan et Jong (ATCC 48108). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 9263-9464. doi: 10.1021/acs.jafc.6b04124
- Guo, J. & Lemire, B. D. (2003). The Ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* Succinate-Ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide. *Journal Biological Chemistry*, 278, 47629-47635. doi:10.1074/jbc.M306312200
- Haque, E., Irfan, S., Kamil, M., Sheikh, S., Hasan A., Ahmad, A., Lakshmi, V., Nazir, A. & Mir, S.S. (2016). Terpenoids with antifungal activity trigger mitochondrial dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 85, 436-443. doi: 10.1134/S0026261716040093
- Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G. M. & Lines, T. C. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity , including lack of genotoxic / carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2179–2205. doi:10.1016/j.fct.2007.05.015
- Hawley, S. A., Ross, F. A., Chevtzoff, C., Green, K. A., Evans, A., Fogarty, S. ... & Hardie, D. G. (2010). Use of cells expressing g subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metabolism*, 11, 554–565. doi:10.1016/j.cmet.2010.04.001
- Herzig, S. & Shaw, R. J. (2018). Ampk: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, 121–135. doi: 10.1038/nrm.2017.95
- Hung, C.-H., Chan, S.-H., Chu, P.-M. & Tsai, K.-L. (2015). Quercetin is a potent anti-atherosclerotic compound by activation of *SIRT1* signaling under oxLDL stimulation. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59, 1905–1917. doi:10.1002/mnfr.201500144
- Jiang, A., Patel, R., Padhan, B., Palimkar, S., Galgali, P., Adhikari, A., Varga, I. & Patel, M. (2023). Chitosan based biodegradable composite for antibacterial food packaging application. *Polymers*, 15, 2235 - 2256. doi: 10.3390/polym15102235
- Jiménez-Gómez, C. P. & Cecilia, J. A. (2020). Chitosan: A natural biopolymer with a wide and varied range of applications. *Molecules*, 25, 3981 - 4024. doi: 10.3390/molecules25173981
- Khodadadi, F., González, J. B., Martin, P. L., Giroux, E., Bilodeau, G. J., K. Peter, A., Doyle, V. P. & Aćimović, S. G. (2020). Identifcation and characterization of *Colletotrichum* species causing apple bitter rot in New York and description of

C. noveboracense sp. nov. *Scientific Reports*, 10, 11043. doi: 10.1038/s41598-020-66761-9

Kreczmer, B., Dyba, B., Barbasz, A. & Rudolphi-Szydło, E. Advantageous/unfavorable effect of quercetin on the membranes of SK-N-SH neuroblastoma cells. *Molecules*, 16, 4945. doi: 10.3390/molecules26164945

Kummu, M., de Moel, H., Porkka, M., Siebert, S., Varis, O. & Ward, P. J. (2012). Lost food , wasted resources : Global food supply chain losses and their impacts on freshwater , cropland , and fertiliser use. *Science of the Total Environment*, 438, 477–489. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.08.092

Kusaczuk, M., Kretowski, R., Naumowicz, M., Stypułkowska, A. & Cechowska-Pasko, M. (2022). A preliminary study of the effect of quercetin on cytotoxicity, apoptosis, and stress responses in glioblastoma cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1345-1366. doi: 10.3390/ijms23031345

Kwolek-Mirek, M. & Zadrag-Tecza, R. (2014). Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research*, 14, 1068–1079. doi:10.1111/1567-1364.12202

Kwun, M. S. & Lee, D. G. (2020). Quercetin-induced yeast apoptosis through mitochondrial dysfunction under the accumulation of magnesium in *Candida albicans*. *Fungal Biology*, 124, 83-90. doi: 10.1016/j.funbio.2019.11.009

Lagoa, R., Graziani, I., Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V., & Gutierrez-Merino, C. (2011). Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 1562-1572. doi:10.1016/j.bbabi.2011.09.022

Lagoa, R., Samhan-Arias, A. K., & Gutierrez-Merino, C. (2017). Correlation between the potency of flavonoids for cytochrome c reduction and inhibition of cardiolipin-induced peroxidase activity. *Biofactors*, 43, 451-468. doi: 10.1002/biof.1357

Lee, I. H., Kim, S. H. & Kang, D. H. (2022). Quercetin mediated antimicrobial photodynamic treatment using blue light on *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Current Research in Food Science*, 6, 100428. doi: 10.1016/j.crfs.2022.100428

Lewicka, K., Siemion, P. & Kurcok, P. (2015). Chemical modifications of starch : Microwave effect. *International Journal of Polymer Science*, 9, 1–10. doi:10.1155/2015/867697

- Li, Y., Shao, X., Xu, J., Wei, Y., Xu, F. & Wang, H. (2017). Effects and possible mechanism of tea tree oil against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* *in vitro* and *in vivo* test. *Canadian Journal of Microbiology*, 3, 219–227. doi:10.1139/cjm-2016-0553
- Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M. & Storey, K. B. (2018). Pesticide toxicity: A mechanistic approach. *Experimental and clinical sciences Journal*, 17, 1101–1136. doi:10.17179/excli2018-1710
- Madrigal-Perez, L. A., Canizal-Garcia, M., González-Hernández, J. C., Reynoso-Camacho, R., Nava, G. M. & Ramos-Gomez, M. (2016). Energy-dependent effects of resveratrol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 33, 227–234. doi:10.1002/yea.3158
- Madrigal-Perez, L. A., Nava, M., González-, J. C. & Ramos-gomez, M. (2015). Resveratrol increases glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae* via a SNF1-dependet mechanism. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. doi:10.1007/s10863-015-9615-y
- Mahajan, P. V., Caleb, O. J., Gil, M. I., Izumi, H., Colelli, G., Watkins, C. B. & Zude, M. (2017). Quality and safety of fresh horticultural commodities: Recent advances and future perspectives. *Food Packaging and Shelf Life*, 14, 2-11. doi: 10.1016/j.fpsl.2017.08.001
- Malecki, M., Kamrad, S., Ralser, M. & Bähler, J. (2020). Mitochondrial respiration is required to provide amino acids during fermentative proliferation of fission yeast. *EMBO reports*, 21, 1-11. doi: 10.15252/embr.202050845
- Martinez-Ortiz, C., Carrillo-Garmendia, A., Correa-Romero, B. F., Canizal-García, M., González-Hernández, J. C., Regalado-Gonzalez, C. & Madrigal-Perez, L. A. (2019). *SNF1* controls the glycolytic flux and mitochondrial respiration. *Yeast*, 36, 487–494. doi:10.1002/yea.3399
- Materska, M. (2008). Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58, 407–413
- Matloob, A., Ayub, H., Mohsin, M., Ambreen, S., Atta Khan, F., Oranab, S., Abdul Rahim, M., Khalid, W., Ahmad Nayik, G., Ramniwas, S. & Ercisli, S. (2023). A review on edible coatings and films: advances, composition, production methods, and safety concerns. *ACS Omega*, 32, 28932-28944. doi:10.1021/acsomega.3c03459
- Meleleo, D., Avato, P., Conforti, F., Argentieri, M. P., Messina, G., Cibelli, G. & Mallamaci, R. Interaction of quercetin, cyanidin, and their o-glucosides with

planar lipid models: implications for their biological effects. *Membranes*, 13, 600. doi: 10.3390/membranes13060600

Metsiou, S., Pyrovolou, K., Konteles, S. J., Trapali, M., Krisilia, S., Kokla, V., Apostolaki, A., Founda, V., Houhoula, D. & Batrinou, A. (2024). Exploring the antifungal activity of various natural extracts in a sustainable *Saccharomyces cerevisiae* model using cell viability, spot assay, and turbidometric microbial assays. *Applied Sciences*, 14, 1899. doi: 10.3390/app14051899

Michala, A. S. & Pritsa, A. (2022). Quercetin: A molecule of great biochemical and clinical value and its beneficial effect on diabetes and cancer. *Diseases*, 10, 37. doi: 10.3390/diseases10030037

Nguyen T. L. A., Bhattacharya, D. (2022). Antimicrobial activity of quercetin: an approach to its mechanistic principle. *Molecules*, 12, 2494-2507. doi: 10.3390/molecules27082494

Nguyen, T. L. A. & Bhattacharya, D. (2022). Antimicrobial activity of quercetin: an approach to its mechanistic principle. *Molecules*, 27, 2494. doi: 10.3390/molecules27082494

Nolfi-Donegan, D., Braganza, A. & Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement, *Redox Biology*, 37, 101674. doi: 10.1016/j.redox.2020.101674

Nunes, C. A. (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology*, (133), 181–196. doi:10.1007/s10658-011-9919-7

Olivares-Marin, I. K., González-Hernández, J. C. & Madrigal-Perez L. A. (2019). Resveratrol cytotoxicity is energy-dependent. *Journal of Food Biochemistry*, 43, 13008-13018. doi: 10.1111/jfbc.13008

Ortega, R. & García, N. (2009). The flavonoid quercetin induces changes in mitochondrial permeability by inhibiting adenine nucleotide translocase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41, 41–47. doi:10.1007/s10863-009-9198-6

Overman, A., Chuang, C. & McIntosh, M. (2011). Quercetin attenuates inflammation in human macrophages and adipocytes exposed to macrophage- conditioned media. *International Journal of Obesity*, 35, 1165–1172. doi:10.1038/ijo.2010.272

- Ozgen, S., Kilinc, O. K. & Selamoglu, Z. (2016). Antioxidant Activity of Quercetin : A Mechanistic Review. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 4, 1134–1138. doi: 10.24925/turjaf.v4i12.1134-1138.1069
- Patil, V., Shams, R. & Dash, K. K. (2023). Techno-functional characteristics, and potential applications of edible coatings: A comprehensive review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100886. doi: 10.1016/j.jafr.2023.100886
- Pavinatto, A., De Almeida Mattos, A. V., Granato Mapass, C., Hitomi Okura, M., Balogh, D. T. & Sanfelice, R. C. (2019). Coating with chitosan-based edible films for mechanical/ biological protection of strawberries. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19, 1004–1030. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.11.076
- Pawlakowska-Pawlęga, B., Gruszecki, W. I., Misiak, L., Paduch, R., Piersiak, T., Zarzyka, B. & Gawron, A. (2007). Modification of membranes by quercetin , a naturally occurring flavonoid , via its incorporation in the polar head group. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, 2195–2204. doi:10.1016/j.bbamem.2007.05.027
- Pech-Cohuo, S. C., Martín-López, H., Uribe-Calderón, J., González-Canché, N. G., Salgado-Tránsito, I., May-Pat, A., Cuevas-Bernardino, J. C., Ayora-Talavera, T., Cervantes-Uc, J. M. & Pacheco, N. (2022). Physicochemical, mechanical, and structural properties of bio-active films based on biological-chemical chitosan, a novel ramon (*Brosimum alicastrum*) starch, and quercetin. *Polymers*, 14, 1346. doi: 10.3390/polym14071346
- Peng, J., Sang, H., Proffer, T. J., Gleason, J., Outwater, C. A., Jung, G. & Sundin, G. W. (2020). A method for the examination of SDHI fungicide resistance in phytopathogenic fungi using a heterologous expression system in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 5, 819–830. doi:10.1094/PHYTO-09-20-0421-R
- Peng, Y., Li, S. J., Yan, J., Tang, Y., Cheng, J. P., Gao, A. J., Yao, X., Ruan, J. J., Xu, B. L. (2021). Research progress on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents. *Frontiers in Microbiology*, 28, 670135 - 670148. doi: 10.3389/fmicb.2021.670135
- Perera, K. Y., Jaiswal, A. K. & Jaiswal, S. (2023). Biopolymer-based sustainable food packaging materials: challenges, solutions, and applications. *Foods*, 12, 2422. doi: 10.3390/foods12122422
- Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E. & Hyde, K. D. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common

pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity*, 44, 33–43. doi:10.1007/s13225-010-0046-0

Prado-Silva, L., Brancini, G. T. P., Braga, G. U. L., Liao, X., Ding, T. & Sant'Ana, A. S. (2022). Antimicrobial photodynamic treatment (aPDT) as an innovative technology to control spoilage and pathogenic microorganisms in agri-food products: An updated review. *Food Control*, 132, 108527. doi: 10.1016/j.foodcont.2021.108527

Priya, K., Thirunavookarasu, N. & Chidanand, D. V. (2023). Recent advances in edible coating of food products and its legislations: A review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 12, 100623. doi: 10.1016/j.jafr.2023.100623

Pshenichnyuk, S. A. & Komolov, A. S. (2015) Dissociative electron attachment to resveratrol as a likely pathway for generation of the H₂ antioxidant species inside mitochondria. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 6, 1104- 1110. doi: 10.1021/acs.jpclett.5b00368

Punia Bangar, S., Chaudhary, V., Thakur, N., Kajla, P., Kumar, M. & Trif, M. (2021). Natural antimicrobials as additives for edible food packaging applications: a review. *Foods*, 26, 2282 - 2306. doi: 10.3390/foods10102282

Qi, W., Qi, W., Xiong, D. & Long, M. (2022). Quercetin: its antioxidant mechanism, antibacterial properties and potential application in prevention and control of toxipathy. *Molecules*, 27, 6545. doi: 10.3390/molecules27196545

Qiu, L., Luo, Y. & Chen, X. (2018). Quercetin attenuates mitochondrial dysfunction and biogenesis via upregulated AMPK / SIRT1 signaling pathway in OA rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 1585–1591. doi:10.1016/j.biopha.2018.05.003

Ramos-Gomez, M., Olivares-Marin, I. K., Canizal-García, M., González-Hernández, J. C., Nava, G. M. & Madrigal-Perez, L. A. (2017). Resveratrol induces mitochondrial dysfunction and decreases chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* in a glucose-dependent manner. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 49, 241–251. doi:10.1007/s10863-017-9709-9

Rarinca, V., Nicoara, M. N., Ureche, D. & Ciobica, A. (2023). Exploitation of quercetin's antioxidative properties in potential alternative therapeutic options for neurodegenerative diseases. *Antioxidants*, 12, 1418. doi: 10.3390/antiox12071418

- Rather, R. & Bhagat, M. (2019). Quercetin as an innovative therapeutic tool for cancer chemoprevention: Molecular mechanisms and implications in human health. *Cancer medicine*, 9, 9181-9192. doi:10.1002/cam4.1411
- Romanazzi, G. & Feliziani, E. (2014). *Botrytis cinerea* (Gray Mold). In postharvest decay: Control strategies (pp. 131–146). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-411552-1.00004-1
- Ruiz, L., M., Salazar, C., Jensen, E., Ruiz, P. A., Tiznado, W., Quintanilla, R. A., Barreto, M., & Elorza, A. A. (2015). Quercetin Affects Erythropoiesis and Heart Mitochondrial Function in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 836301. doi:10.1155/2015/836301
- Sanver, D., Sadeghpour, A., Rappolt, M., Di Meo, F. & Trouillas, P. (2020). Structure and dynamics of dioleoyl-phosphatidylcholine bilayers under the influence of quercetin and rutin. *Langmuir*, 36, 1484. doi: 10.1021/acs.langmuir.0c01484
- Sato, S. & Mukai, Y. (2020). Modulation of chronic inflammation by quercetin : The beneficial effects on obesity. *Journal of Inflammation Research*, 13, 421–431. doi:10.2147/JIR.S228361
- Scariot, F. J., Pansera M. S., Longaray Delamare, A. P. & Echeverrigaray, S. (2020). Antifungal activity of monoterpenes against the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45, 15433-15442. doi: 10.1111/jfpp.15433
- Siddiqui, Y. & Ali, A. (2014). *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). In postharvest decay: Control strategies (pp. 337–371). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-411552-1.00011-9
- Silva, M. G., Mendes, D., Oliveira, M. M., Andrade, P. B., Videira, R. A. & Peixoto, F. (2023). Mitochondria as a toxicological target for fungicides. *Mitochondrial Intoxication*, Academic Press, 493 - 526. doi: 10.1016/B978-0-323-88462-4.00012-2
- Singh, P., Arif, Y., Bajguz, A. & Hayat, S. (2021). The role of quercetin in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 10-19. doi: 10.1016/j.plaphy.2021.05.023
- Sinha, A., & Pick, E. Chaper 7: Fluorescence detection of increased reactive oxygen species levels in *Saccharomyces cerevisiae* at the diauxic shift. Jesús Espada (ed.), *Reactive Oxygen Species: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (1st ed., Vol. 2202, pp. 81-91). Humana Press.

- Souza, M. P., Vaz, A. F. M., Silva, H. D., Cerqueira, M. A., Vicente, A. A. & Carneiro-da-Cunha, M. G. (2015). Development and characterization of an active chitosan-based film containing quercetin. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 2183–2191. doi:10.1007/s11947-015-1580-2
- Sperling, J. A., Sakamuri, S. S. V.P., Albuck, A. L., Sure, V. N., Evans, W. R., Peterson, N. R., Rutkai, I., Mostany, R., Satou, R. & Katakam, P. V. G. (2019). Measuring respiration in isolated murine brain mitochondria: implications for mechanistic stroke studies. *Neuromolecular Medicine*, 4, 493-504. doi: 10.1007/s12017-019-08552-8
- Spinelli, J. B. & Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature Cell Biology*, 7, 745-754. doi: 10.1038/s41556-018-0124-1
- Stiller, A., Garrison, K., Gurdyumov, K., Kenner, J., Yasmin, F., Yates, P. & Song, B.-H. (2021). From fighting critters to saving lives: polyphenols in plant defense and human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 8995-9016
- Sudheeran, P. K., Sela, N., Carmeli-Weissberg, M., Ovadia, R., Panda, S., Feygenberg, O. & Alkan, N. (2021). Induced defense response in red mango fruit against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Horticulture Research*, 8, 17–28. doi:10.1038/s41438-020-00452-4
- Sun, Y., Ju, Y., Wang, L., Tao, R., Li, L., Fan, B. & Wang, B. (2024). Development of multifunctional fruit packaging by incorporating starch aldehyde-quercetin conjugate into chitosan coating films. *Food Hydrocolloids*, 157, 110320. doi: 10.1016/j.foodhyd.2024.110320
- Sutharsan, J., Boyer, C. A. & Zhao, J. (2022). Physicochemical properties of chitosan edible films incorporated with different classes of flavonoids. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 4, 100232. doi: 10.1016/j.carpta.2022.100232
- Szeto, S. S. W., Reinke, S. N., Sykes, B. D., & Lemire, B. D. (2007). Ubiquinone-binding site mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase generate superoxide and lead to the accumulation of succinate. *Journal Biological Chemistry*, 282, 27518-27526. doi:10/1074/jbc.M700601200
- Tavassoli, M., Sani, M. A., Khezerlou, A., Ehsani, A. & McClements, D. J. (2021). Multifunctional nanocomposite active packaging materials: Immobilization of quercetin, lactoferrin, and chitosan nanofiber particles in gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 118, 106747. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106747

- Tebbets, B., Stewart, D., Lawry, S., Nett, J., Nantel, A., Andes, D & Klein, B. S. (2012). Identification and characterization of antifungal compounds using a *Saccharomyces cerevisiae* reporter bioassay. *Plos One*, 7, 36021-36032. doi: 10.1371/journal.pone.0036021
- Tetlow, I. J. & Bertoft, E. (2020). A review of starch biosynthesis in relation to the building block-backbone model. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7011. doi: 10.3390/ijms21197011
- Thangasamy, T., Sittadjody, S. & Burd, R. (2009). Quercetin: A potential complementary and alternative cancer therapy. In *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population*, 563–584. doi:10.1016/B978-0-12-374228-5.00027-5
- Tirichen, H., Yaigoub, H., Xu, W., Wu, C., Li, R., & and Li, Y. (2021). Mitochondrial reactive oxygen species and their contribution in chronic kidney disease progression through oxidative stress. *Frontiers in Physiology*, 12, 627837-627849. doi:10.3389/fphys.2021.627837
- United Nations. (2009). Achieving the Global Public Health Agenda Dialogues at the Economic and Social Council (p. 274). *United Nations Publications*, New York.
- Veiko, A. G., Sekowski, S., Lapshina, E. A., Wilczewska, A. Z., Markiewicz, K. H., Zamaraeva, M. ... & Zavodnik, I. B. (2020). Flavonoids modulate liposomal membrane structure, regulate mitochondrial membrane permeability and prevent erythrocyte oxidative damage. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1862, 183442–183451. doi:10.1016/j.bbamem.2020.183442
- Vieira, J. M., Flores-López, M. L., de Rodríguez, D. J., Sousa, M. C., Vicente, A. A. & Martins, J. T. (2016). Effect of chitosan – Aloe vera coating on postharvest quality of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 116, 88–97. doi:10.1016/j.postharvbio.2016.01.011
- Vilariño, M. V., Franco, C. & Quarrington, C. (2017). Food loss and waste reduction as an integral part of a circular economy. *Frontiers in Environmental Science*, 5, 1–5. doi:10.3389/fenvs.2017.00021
- Vissenaken, H., Smagghe, G., Criel, H., Grootaert, C., Raes, K., Rajkovic, A., Goeminne, G., Boon, B., De Schutter, K. & Van Camp, J. (2021). Intracellular quercetin accumulation and its impact on mitochondrial dysfunction in intestinal Caco-2 cells. *Food Research International*, 145, 110430. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110430

- Wang, S., Yao, J., Zhou, B., Yang, J., Chaudry, M. T., Wang, M. ... & Yin, W. (2018). Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative *in vivo* and its antibacterial mechanism *in vitro*. *Journal of Food Protection*, 81, 68–78. doi:10.4315/0362-028X.JFP-17-214
- Wang, X., Yong, H., Gao, L., Li, L., Jin, M. & Liu, J. (2019). Preparation and characterization of antioxidant and pH-sensitive films based on chitosan and black soybean seed coat extract. *Food Hydrocolloids*, 89, 56-66. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.10.019
- Yang, D., Wang, T., Long, M. & Li, P. (2020) Quercetin: its main pharmacological activity and potential application in clinical medicine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 30, 8825387. doi: 10.1155/2020/8825387
- Yang, K., Dang, H., Liu, L., Hu, X., Li, X., Ma, Z., Wang, X. & Ren, T. (2019). Effect of syringic acid incorporation on the physical, mechanical, structural and antibacterial properties of chitosan film for quail eggs preservation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 876-884, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.045
- Yousuf, B., Qadri, O. S. & Srivastava, A. K (2017). Recent developments in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 198–209. doi: 10.1016/j.lwt.2017.10.051
- Yusupova, U. R., Hushbaktova, Z. A., Syrov, V. V. & Almatov, K. T. (2019). Influence of quercetin on energy formation and reactive oxygen species in liver mitochondria. *European journal of medical and pharmaceutical sciences*, 4, 499–509
- Zhang, J.-L., Souders, C. L., Denslow, N. D. & Martyniuk, C. J. (2017). Quercetin, a natural product supplement, impairs mitochondrial bioenergetics and locomotor behavior in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 327, 30–38. doi:10.1016/j.taap.2017.04.024
- Zhang, T., Galdieri, L., Hasek, J. & Vancura, A. (2018). Yeast phospholipase C is required for stability of casein kinase I Yck2p and expression of hexose transporters. *FEMS Microbiology Letters*, 364, 1–8. doi:10.1093/femsle/fnx227
- Zhang, X., Lian, H., Shi, J., Meng, W. & Peng, Y. (2020). Plant extracts such as pine nut shell, peanut shell and jujube leaf improved the antioxidant ability and gas permeability of chitosan films, *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 1242 - 1250. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.108

Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu Z. B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *International Journal of Molecular Medicine*, 44, 3-15. doi: 10.3892/ijmm.2019.4188

Zheng, Y. & Chow, A. H. L. (2009). Production and characterization of a spray-dried hydroxypropyl- β -cyclodextrin / quercetin complex. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35, 727–734. doi:10.1080/03639040802526805

Zhou, A. & Sadik, O.A. (2008). Comparative analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: a mechanistic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 12081-12091. doi: 10.1021/jf802413v