UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

DESARROLLO Y EVALUACIÓN IN VITRO DE UN SISTEMA ZEOLITA–ACEITE ESENCIAL DE *Thymus vulgaris* CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A CEPAS ATCC DE *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO.

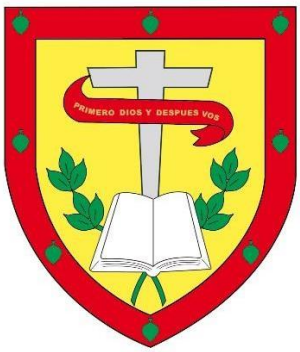
AUTOR: LEONARDO FABIAN TIGRE OROZCO

DIRECTOR: QF. JONATHAN XAVIER RIVERA TUBA. MSc.

CUENCA - ECUADOR

2026

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

DESARROLLO Y EVALUACIÓN IN VITRO DE UN SISTEMA ZEOLITA–ACEITE ESENCIAL DE *Thymus vulgaris* CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A CEPAS ATCC DE *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: LEONARDO FABIAN TIGRE OROZCO

DIRECTOR: QF. JONATHAN XAVIER RIVERA TUBA. MSc.

CUENCA – ECUADOR

2026

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Universidad Católica de Cuenca

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Leonardo Fabian Tigre Orozco portador(a) de la cédula de ciudadanía N.º **0106631542**. Declaro ser el autor de la obra: "**Desarrollo y evaluación in vitro de un sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* con actividad antimicrobiana frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli***", sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **14 de octubre de 2026.**

F: .....

Leonardo Fabian Tigre Orozco

C.I. **0106631542**

Universidad Católica de Cuenca

Certificación del Tutor

QF. Jonathan Xavier Rivera Tuba. MSc
DOCENTE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD.
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA
De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado **"Desarrollo y evaluación in vitro de un sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* con actividad antimicrobiana frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*"**, realizado por **TIGRE OROZCO LEONARDO FABIAN**, ha sido revisado y orientado durante su ejecución, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que está expedito para su sustentación.

Cuenca, 30 de septiembre 2026.

Firma.....

QF. Jonathan Xavier Rivera Tuba. Mgt

C.I.:**1104561129**

DEDICATORIA.

Dedico este trabajo a mi padre celestial, porque ha sido mi fortaleza en los momentos de dificultad, por guiar mi camino, darme sabiduría y mucha perseverancia para llegar hasta este momento tan importante de mi vida.

A mis padres Manuel y Carmen, con mucho amor y gratitud, por creer en mí incluso cuando ni yo creía en mí mismo, por sostenerme con esfuerzo, paciencia y apoyo incondicional, cada sacrificio, cada palabra de aliento y cada día de trabajo fueron el impulso que me permitió continuar y no renunciar a este sueño.

Me faltan palabras para agradecer todo lo que hacen por mí, este logro no me pertenece solo a mí, también es suyo, en cada página escrita y cada meta alcanzada está el inmenso amor con el que siempre me han acogido, todo lo que soy y todo lo que hoy es por ustedes.

Con todo mi cariño y admiración, les dedico este trabajo como un pequeño homenaje a tanto apoyo, esperando que sea solo el primero de muchos logros con los que pueda recompensar, un poco todo el amor que me han brindado.

LEONARDO TIGRE

AGRADECIMIENTOS:

Mi agradecimiento para mi tutor Q.F. Javier Rivera Tuba. Mgt, por su orientación constante, sus conocimiento, paciencia y compromiso durante todo el desarrollo de este trabajo, su guía fue importante para alcanzar los objetivos planificados.

A su vez al Q.F. Jonathan Ortiz. Mgt, por brindar sus conocimientos, apoyo y orientación en la aplicación de las técnicas microbiológicas, así como por sus valiosas recomendaciones durante la fase experimental.

Un reconocimiento a mi querida Universidad Católica de Cuenca, por facilitarme el uso de las instalaciones, laboratorios y recursos necesarios para realizar esta investigación, contribuyendo significativamente al desarrollo del presente trabajo.

Finalmente, agradezco a todas las personas que aportaron con su tiempo, conocimientos, consejos o apoyo para hacer posible la culminación de este proyecto.

LEONARDO TIGRE

RESUMEN

Introducción: La resistencia antimicrobiana es un problema mundial, se buscan alternativas para el control de microorganismos, el uso de aceites esenciales y estructuras como las zeolitas ha generado interés por su actividad antimicrobiana. Por esta razón en esta investigación se evaluó un sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Objetivo: Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de un sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* previamente desarrollado frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli.*

Metodología: Para el desarrollo de esta investigación se empleó un enfoque cuantitativo, con un diseño experimental, descriptivo, transversal y de laboratorio *in vitro*. Se evaluó la actividad antimicrobiana del sistema mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Resultados: Se obtuvo inhibición del crecimiento en la técnica de CMI a las concentraciones del 100 % y 50 % para ambos microorganismos. En la técnica de CMB se confirmó la actividad microbicida total en el 100 % de las réplicas evaluadas al 100 % y 50 % de concentración. La dilución al 25 % mostró pérdida de la efectividad, con más de 300 colonias por placa.

Conclusión: El sistema evaluado presentó actividad antimicrobiana frente a ambas cepas bajo las condiciones del laboratorio. Las concentraciones del 100 % y 50 % mostraron mayor actividad, mientras que al 25 % se observó pérdida marcada de efectividad en las condiciones experimentales evaluadas para las cepas de referencia utilizadas en este estudio.

Palabras clave: Zeolita, *Thymus vulgaris*, actividad antimicrobiana, Concentración mínima inhibitoria (CMI), Concentración mínima bactericida (CMB).

ABSTRACT

Introduction: Antimicrobial resistance is a global problem, and alternatives for controlling microorganisms are being sought. The use of essential oils and materials such as zeolites has generated interest due to their antimicrobial activity. For this reason, this study evaluated a zeolite–*Thymus vulgaris* essential oil system against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Objective: To determine the *in vitro* antimicrobial activity of a previously developed zeolite–Thymus vulgaris essential oil system against ATCC strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Methodology: A quantitative approach was used for this study, employing a descriptive, cross-sectional, in vitro laboratory experimental design. The antimicrobial activity of the system was evaluated by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC).

Results: Growth inhibition was observed in the MIC assay at concentrations of 100% and 50% for both microorganisms. In the MBC assay, total microbicidal activity was confirmed in 100% of the replicates evaluated at 100% and 50% concentrations. The 25% dilution showed a loss of effectiveness, with more than 300 colonies per plate.

Conclusion: The evaluated system exhibited antimicrobial activity against both strains under laboratory conditions. Concentrations of 100% and 50% showed greater activity, while at 25% a marked loss of effectiveness was observed under the experimental conditions evaluated for the reference strains used in this study.

Keywords: Zeolite, *Thymus vulgaris*, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC).

ABREVIATURAS

AE: Aceite esencial

ATCC: American Type Culture Collection

Ca^{2+}: Ion calcio

CMB: Concentración mínima bactericida

CMI: Concentración mínima inhibitoria

DMSO: Dimetilsulfóxido

EE: Esencia/aceite esencial

E. coli: Escherichia coli

MBC: Minimum Bactericidal Concentration

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

MHB: Mueller-Hinton Broth (caldo Mueller-Hinton)

MHA: Mueller-Hinton Agar (agar Mueller-Hinton)

NaCl: Cloruro de sodio

OD: Densidad óptica

PCA: Agar para Recuento en Placa

S. aureus: Staphylococcus aureus

Zn^{2+}: Ion zinc

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN 8

I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN. 12

I.2.- JUSTIFICACIÓN 15

I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA 17

I.2.2.- HIPOTESIS 17

I.3.- OBJETIVOS 18

I.3.1.-Objetivo General 18

I.3.2.-Objetivos Específicos: 18

I.4.- MARCO TEÓRICO 18

I.4.1.- Antecedentes: 18

I.4.2.- Marco referencial: 19

4.2.1. ACEITES ESENCIALES 19

4.2.2. PRINCIPALES GRUPOS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS 22

4.2.3. ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES 25

4.2.4. ACEITE ESENCIAL DE *Thymus vulgaris* 27

4.2.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Thymus vulgaris* 29

4.2.6. ZEOLITAS 34

4.2.7. MECANISMOS DE CARGA Y SORCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN MATRICES POROSAS 44

4.2.8. RESISTENCIA ANTIBACTERIANA Y MECANISMOS DE ACCIÓN EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS 45

4.2.9. MECANISMOS DE PERMEABILIDAD Y RESPUESTA CELULAR EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS 46

II.1. Diseño de investigación 49

II.2.- Población y muestra 49

II.2.1. Universo o población 50

II.2.2. Muestreo y muestra 51

II.3.- Definición y clasificación de las variables 53

II.3.1- Variable independiente 53

II.3.2- Variable dependiente 53

II.4.- Procedimientos, técnicas e instrumentos para la obtención de datos ... 53

II.5.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos 56

II.6.- Aspectos éticos 56

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 59

IV.1.- CONCLUSIONES 73

IV.2.- RECOMENDACIONES 74

BIBLIOGRAFÍA 75

ANEXOS REQUERIDOS 87

I. INTRODUCCIÓN

Cuando los microorganismos logran resistir los tratamientos convencionales, la medicina moderna se queda sin armas. Esta realidad describe a la resistencia antimicrobiana: un problema de salud pública mundial que prolonga el internamiento hospitalario y, en casos graves, cuesta vidas. Gran parte de esta crisis deriva del manejo inadecuado de los fármacos disponibles. Más allá del evidente peligro clínico, existe un fuerte impacto económico para el afectado debido a la falta de terapias efectivas. Es por ello que nuestra investigación se plantea, ante todo, la necesidad de hallar nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas que sirvan como futuras vías de tratamiento (1).

Dentro de los microorganismos de mayor importancia destacan *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* que son responsables de múltiples infecciones tanto extra como intrahospitalarias, *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo que forma parte de la microbiota normal de piel y mucosas cuando esta supera las barreras del hospedero puede ocasionar daños a nivel cutáneo, osteoarticulares, respiratorias, cardiovasculares y septicemias, tiene la capacidad para desarrollar múltiples mecanismos de resistencia, como la formación de proteínas fijadoras de penicilina modificadas y la formación de biofilms, ha favorecido la aparición de cepas resistentes a penicilina (MRSA), consideradas como un grave problema por la dificultad que representan para las opciones terapéuticas (2).

Por otro lado, *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo presente en la microbiota intestinal de humanos y animales, pero determinadas cepas poseen factores de virulencia capaces de provocar infecciones urinarias, gastrointestinales, septicemias y múltiples enfermedades de importancia clínica. En la actualidad el incremento de cepas productoras de *β*-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y otros mecanismos de resistencia han reducido significativamente la eficacia de numerosos antibióticos, convirtiéndola en una de los principales agentes implicados en múltiples infecciones de atención sanitaria (3).

Es por esta razón que se ha hecho evidente que el desarrollo de alternativas terapéuticas que emplean productos naturales ha demostrado una actividad bastante interesante por la gran variedad de metabolitos bioactivos y por la oportunidad de ejercer mecanismos de acción múltiples contra tales bacterias y que de esta forma se reduce la probabilidad de un desarrollo de resistencia, entre los compuestos se encuentran los aceites esenciales de plantas medicinales, los cuales han demostrado actividad *in vitro* bastante interesante frente a diferentes bacterias y que cuentan con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antifúngicas, lo que los ha vuelto nuevos agentes antimicrobianos (4).

Entre las plantas con mayor potencial ha sobresalido *Thymus vulgaris* de la familia *Lamiaceae*, que ha sido utilizado dentro de la medicina tradicional en múltiples ocasiones debido a sus distintas propiedades terapéuticas, el aceite esencial contiene esencialmente *timol* y *carvacrol* que son compuestos fenólicos que son responsables de la mayor parte de su actividad biológica. Adicional, han demostrado que con estos compuestos, se altera la membrana citoplasmática bacteriana, incrementa su permeabilidad, provocando la pérdida de algunos componentes intracelulares e interferir en procesos metabólicos importantes (5).

Estos metabolitos ejercen una acción bacteriostática y bactericida frente a diferentes microorganismos, incluidos *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* pero la eficacia antimicrobiana puede verse afectada por factores como concentración, tiempo de exposición, la composición química del aceite y la capacidad de difusión de sus componentes activos en el medio de cultivo, esto nos ha llevado a la búsqueda de sistemas que permitan proteger los compuestos volátiles, mejorar su estabilidad y favorecer una liberación más controlada en el sitio de acción (6).

Por esta razón el uso de materiales porosos como las zeolitas representa una alternativa prometedora, las mismas son aluminosilicatos cristalinos con una estructura tridimensional altamente organizada, tienen la presencia de canales y cavidades microscópicas que les confieren una elevada capacidad de adsorción e intercambio iónico, esto ha favorecido su utilización en diversas áreas, incluyendo

aplicaciones ambientales, industriales, farmacéuticas y biomédicas, especialmente como sistemas de transporte y liberación controlada de compuestos bioactivos (7).

La incorporación de aceites esenciales en matrices de zeolita puede ofrecer múltiples ventajas, entre ellas la protección frente a la volatilización y degradación de los compuestos activos, el aumento de su estabilidad química y la liberación gradual del agente antimicrobiano, favoreciendo un efecto prolongado sobre los microorganismos, por esta razón la combinación de un soporte inorgánico con un compuesto natural representa una estrategia innovadora para potenciar la eficacia antimicrobiana y ampliar las posibilidades de aplicación de los aceites esenciales en el ámbito clínico (8).

Por ello, planteamos evaluar la actividad antimicrobiana in vitro de un sistema compuesto por zeolita modificada con cationes (Ca^{2+}/ Zn^{2+}) y aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), con el propósito de determinar la efectividad de esta formulación híbrida y contribuir al desarrollo de nuevas alternativas frente a bacterias de importancia clínica.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO TEÓRICO.

I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

Situación problemática: La búsqueda de nuevas opciones en la batalla contra las bacterias ha generado un mayor interés por el uso de productos naturales y/o materiales con propiedades antimicrobianas. Se incluyen los aceites esenciales como fuente de compuestos bioactivos entre ellos; en particular, el aceite de *Thymus vulgaris* ha demostrado ser efectivo contra microorganismos por la existencia de metabolitos con propiedades antimicrobianas.

Sin embargo, el uso directo de los aceites esenciales se encuentra limitado por características como su volatilidad, estabilidad y solubilidad. Las zeolitas, debido a su estructura porosa y capacidad de intercambio catiónico, se ha identificado su potencial para emplearse como materiales de soporte para la incorporación de sustancias bioactivas. La modificación de la zeolita mediante intercambio catiónico con Ca^{2+} y Zn^{2+} y su posterior incorporación con aceite esencial de *T. vulgaris* constituye una alternativa que requiere evaluación microbiológica para determinar su capacidad de inhibir y eliminar microorganismos.

Con el fin de lograr un completo entendimiento respecto del mecanismo de acción antimicrobiana del sistema desarrollado se considera de relevancia la caracterización de metabolitos secundarios extraídos del aceite esencial de *Thymus vulgaris* cuya importancia radica en *timol* y *carvacrol*. A partir de este tipo de compuestos se ha logrado originar un mecanismo de acción antimicrobiano que se basa en alterar la permeabilidad de la membrana citoplasmática bacteriana, tal mecanismo es el responsable de que se genere una despolarización de la membrana, fuga de iones vitales y en consecuencia la lisis celular.

Una degradación prematura de estos compuestos, cuando son expuestos a la luz, al oxígeno, o a aumentos de temperatura, van a limitar la aplicación directa de los mismos. Al incorporar el aceite dentro la red tridimensional de la zeolita se busca

resguardar estas moléculas bioactivas de la adversidad ambiental, asegurando así un perfil de liberación en el tiempo controlado y extendido.

La inclusión de cationes bivalentes como Ca^{2+} y Zn^{2+} en la matriz de la zeolita modifica la estructura superficial del aluminosilicato e introduce un efecto antimicrobiano complementario. Mientras que el ion calcio (Ca^{2+}) contribuye a estabilizar la red cristalina y a modular la retención de los principios activos, el zinc (Zn^{2+}) posee una actividad antibacteriana intrínseca reconocida.

El zinc interactúa con los grupos tiol de las proteínas bacterianas, inactiva enzimas clave y genera especies reactivas de oxígeno que dañan el material genético del microorganismo. La combinación de estos cationes con el aceite esencial sobre el soporte poroso permite diseñar un material híbrido inorgánico-orgánico con un espectro de acción potencialmente ampliado.

Asimismo, la elección de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* como modelos biológicos responde a sus marcadas diferencias estructurales en la pared celular. Las bacterias Gram positivas (*S. aureus*) poseen una gruesa capa de peptidoglicano que, aunque rígida, es permeable a moléculas lipofílicas de pequeño tamaño. En contraste, la membrana externa de las bacterias Gram negativas (*E. coli*), rica en lipopolisacáridos, actúa como una barrera selectiva que restringe la entrada de agentes hidrófobos. Evaluar el sistema zeolítica-aceite es esencial frente a ambos grupos bacterianos; cuyo permitirá esclarecer si el soporte modificado facilita el transporte de los compuestos activos a través de la membrana externa o si la presencia del metal incrementa la susceptibilidad del microorganismo.

La determinación de parámetros microbiológicos cuantitativos como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) proporcionará las bases metodológicas para comparar la eficacia del sistema híbrido frente a sus componentes individuales (aceite libre, zeolita sin modificar y zeolita catiónica).

Problema de investigación: Se requiere determinar experimentalmente la actividad antimicrobiana de un sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Si bien se conocen las propiedades antimicrobianas del aceite esencial y las características de las zeolitas como materiales de soporte, es necesario establecer la eficacia del sistema combinado mediante parámetros microbiológicos objetivos.

Por lo tanto, es interesante identificar en el comportamiento que tiene el soporte inorgánico en relación a la fase orgánica. La impregnación en el interior de los poros de la zeolita previamente modificada con Ca^{2+} y Zn^{2+} del aceite esencial de *Thymus vulgaris*; ya que, no se considera como una mera mezcla física por la retención de las moléculas lipófilas como es el caso del *timol* y el *carvacrol* dependen de los equilibrios de adsorción-desorción y de las restricciones estéricas que se derivan de la geometría.

Saber si el aceite tipo esencial mantiene la conformación bioactiva, o bien si queda atrapado y retenido irreversible en su interior es una condición necesaria para saber cómo y de qué forma los principios activos se liberan al medio bacteriano.

Asimismo, la presencia del ion Zn^{2+} y los componentes del aceite esencial introduce una variable crítica de interacción biológica que debe ser caracterizada. Existe la pregunta de si la conjunción de dichos compuestos suscita un acto de adición, cooperación mutua, o un efecto de oposición respecto a las membranas celulares de los microrganismos. Aun cuando el aceite de tomillo perturba la doble capa lipídica a través de disruptivas alteraciones de índole hidrofóbica, el zinc en su estado divalente, a medida que penetra la parte interna de la célula, descompone el equilibrio interno de esta y altera la actividad de las enzimas.

Por otro lado, la disparidad estructural entre *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) y *Escherichia coli* (Gram negativa) plantea un desafío metodológico para la estandarización de los ensayos microbiológicos. La barrera lipopolisacárida de *E. coli* dificulta el paso de moléculas hidrófobas de alto peso molecular, mientras que

la gruesa capa de peptidoglicano de *S. aureus* responde de manera distinta a los gradientes de difusión de los cationes liberados.

Abordar este reto permitirá compensar las carencias de tipo técnico en el campo de aplicación de la microbiología y de la ciencia de materiales, además de consolidar el soporte necesario para poder estudiar la utilidad del composite. Asegurar que el conjunto de zeolita - aceite esencial siga teniendo un gran potencial de carácter antibacterial tras su fijación proporcionará la justificación necesaria para su evolución en fabricación de films activos para la presentación de alimentos, dispositivos de uso biológico o de desinfección.

I.2.- JUSTIFICACIÓN

La investigación parte de la necesidad de generar evidencia experimental sobre la actividad antimicrobiana de un sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Esto radica en la evaluación de un sistema que integra un material zeolítico previamente modificado mediante intercambio catiónico con Ca^{2+} y Zn^{2+} y un aceite esencial de origen vegetal.

Servirá para incrementar la información relativa a la aplicación de aceites esenciales y materiales zeolíticos con potencial antimicrobiano; en la esfera metodológica, aportará resultados obtenidos a partir de procedimientos microbiológicos que sean reproducibles para la determinación de CMI y la determinación de CMB; y, en lo que respecta a la aplicación, suministrará información que sirva como base para la generación de futuras investigaciones en el marco del desarrollo y la aplicación de materiales antimicrobianos.

Este proyecto de titulación se relaciona a la microbiología, biotecnología, productos naturales, desarrollo de alternativas para el control microbiológico. Entre sus beneficios destacan el fortalecimiento de la formación investigadora y de recursos humanos en microbiología experimental, el aprovechamiento científico de recursos naturales y la producción de conocimientos con potencia de aplicación tecnológica

que, sin embargo, no generan por sí mismos un impacto medioambiental significativo, ya que se trata de un proceso experimental in vitro. Los beneficiados directos de este proceso son los investigadores, la comunidad académica vinculada a la microbiología y las ciencias afines.

La pertinencia de esta investigación radica en la necesidad de contribuir a dar respuesta a un fenómeno creciente, como es el fenómeno de la resistencia bacteriana, a través del diseño de materiales híbridos inorgánico-orgánicos de alto valor añadido. La combinación de la matriz microporosa de la zeolita con los fitoquímicos que utiliza el aceite de *Thymus vulgaris* da solución al carácter vulnerable que presentan los compuestos volátiles a la degradación prematura. Al encapsular dichos principios activos e introducir cationes bioactivos como el Zn^{2+}se establece una plataforma funcional para proporcionar el antibacteriano, sin necesidad de incrementar las dosis requeridas para los efectos de inhibición del crecimiento bacteriano, al mismo tiempo que logra controlar la liberación de sustancias en el medio.

Adicional, se tiene la oportunidad de dilucidar los mecanismos de acción multifactoriales que emergen de la interacción entre los iones metálicos (Zn^{2+}, Ca^{2+}) y los terpenos fenólicos (*timol* y *carvacrol*). La evaluación simultánea sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* permite determinar si la alteración física de la pared celular inducida por el aceite esencial facilita la entrada de los cationes de zinc o se da una competencia por los sitios de fijación en la membrana.

Asimismo, la investigación responde a la urgencia de valorizar los recursos fitogenéticos mediante procesos tecnológicos sustentables y de bajo costo. El aprovechamiento del aceite esencial de tomillo en combinación con zeolitas materiales abundantes, de bajo costo y con elevada capacidad de intercambio iónico se enmarca en los principios de la química verde y la economía circular.

Demostrar la factibilidad técnica de inmovilizar compuestos bioactivos en matrices minerales abre la puerta al reemplazo gradual de aditivos sintéticos, conservantes

químicos y bactericidas de alta toxicidad ambiental en cadenas productivas clave, promoviendo el uso responsable de la biodiversidad vegetal.

Además, es importante para el futuro diseño de insumos funcionales en áreas de alto impacto socioeconómico, tales como el envasado activo de alimentos, la industria textil sanitaria y la biomedicina. Disponer de datos cuantitativos precisos sobre la CMI y CMB del sistema cargado permite definir los rangos de concentración efectivos que deberán incorporarse en futuras matrices poliméricas, películas biodegradables o recubrimientos de superficies.

La implementación en el laboratorio de este protocolo presenta un tipo de diseño experimental con escasa complejidad, de riesgo biosanitario muy bajo y con un impacto ambiental limitado, ya que, a partir de cepas de referencia ATCC bien descritas e implicando protocolos microbiológicos estandarizados, se tiene garantizada la generación de conocimiento bajo estrictos parámetros de ética y biosanidad, lo que hace posible extraer datos concluyentes sobre la actividad antimicrobiana del composite zeolita-aceite esencial sin alterar el entorno y sin la necesidad de modelos animales durante este periodo.

I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Cuál es la actividad antimicrobiana in vitro, determinada mediante la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida, de un sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*?

I.2.2.- HIPÓTESIS

El sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* presenta actividad antimicrobiana in vitro frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, evidenciada mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB).

I.3.- OBJETIVOS

I.3.1.-Objetivo General:

Determinar la actividad antimicrobiana in vitro de un sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* previamente desarrollado frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

I.3.2.-Objetivos Específicos:

- Elaborar un sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* mediante la carga del aceite esencial en una zeolita previamente modificada por intercambio catiónico con Ca^{2+} y zinc Zn^{2+}, con el fin obtener un material con un alto potencial de actividad antimicrobiana.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

I.4.- MARCO TEÓRICO

I.4.1.- Antecedentes:

Micucci et al. (2020) desarrollaron una formulación efectiva del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, los cuales evaluaron su composición química y actividad antimicrobiana. Esta formulación presentó características relacionadas con la estabilidad del aceite y conservó actividad frente a microorganismos del tipo bacteriano. La importancia radica en que demuestra la posibilidad de incluir el aceite esencial de *T. vulgaris* en una matriz o sistema de formulación para favorecer su explotación y conservar su actividad biológica (9).

Tardugno et al. evaluaron los aceites esenciales extraídos de *Thymus vulgaris* de los Apeninos haciendo un análisis fitoquímico y antimicrobiano frente a microorganismos relacionados con alimentos; donde la actividad antimicrobiana de los aceites analizados se relacionó a la composición química de los aceites analizados con la capacidad de inhibir microorganismos (10).

Galgano et al. evaluaron in vitro el efecto del tiempo de contacto y las concentraciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre su efecto antibacteriano, concentraciones y tiempos de exposición, demostrando cómo la actividad antimicrobiana está en función de la concentración utilizada y el tiempo de contacto con el microorganismo (11).

Alcívar-Bazurto et al. valoraron las características antimicrobianas de un alimento cárnico confeccionado con hidrolatos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y de tomillo (*Thymus vulgaris*) en Ecuador; donde se evaluó el comportamiento microbiológico del alimento o producto cárnico en *Staphylococcus aureus* encontrando diferencias en la actividad antimicrobiana según la formulación utilizada (12).

En Cuenca, Astudillo Aspiazu et al. (2023) valoraron la capacidad conservante de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Salvia officinalis* en una formulación cosmética, siendo estas formulaciones inoculadas con cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* y definido su eficacia mediante la realización de un ensayo de desafío microbiológico. El aceite esencial de *T. vulgaris* mostró inhibición del crecimiento microbiano durante los primeros días de evaluación, si bien la eficacia varió en función de la concentración y del microorganismo empleado (13).

I.4.2.- Marco referencial:

4.2.1. ACEITES ESENCIALES

Producidos y almacenados en los tejidos de plantas aromáticas y medicinales, los aceites esenciales son mezclas complejas de sustancias orgánicas volátiles; se

caracterizan por su hidrofobicidad, elevada volatilidad y la presencia de numerosos metabolitos secundarios, constituidas especialmente por compuestos de las familias de los terpenoides y los terpenos. La composición química depende de factores intrínsecos de la especie vegetal, las condiciones ambientales, del estado de desarrollo de la planta y el método de extracción que se usa (9,10).

La volatilidad que caracteriza a los aceites esenciales tiene que ver con la mayor presencia de moléculas de bajo peso molecular, lo que hace que sean fácilmente liberados hacia el medio ambiente y que presenten aromas característicos de las plantas de las que proceden. Esta volatilidad es la responsable de una propiedad importante en las aplicaciones de los aceites esenciales, pero también se trata de una limitación cuando se quiere utilizar aceites esenciales en sistemas en los que se quiere mantener una actividad biológica durante largos períodos de tiempo (10).

Desde el punto de vista fisicoquímico, los aceites esenciales presentan generalmente baja solubilidad en agua y mayor afinidad por sustancias orgánicas y superficies hidrofóbicas. Esta característica debe considerarse durante su evaluación microbiológica, debido a que puede dificultar su dispersión homogénea en medios de cultivo acuosos y afectar la disponibilidad de sus componentes frente a los microorganismos. Por esta razón, la metodología empleada para evaluar su actividad antimicrobiana debe considerar factores como la concentración, el vehículo utilizado, el tiempo de contacto y las condiciones del ensayo (9).

En el aceite esencial se encuentran monoterpenos, sesquiterpenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres y compuestos fenólicos. La acción biológica del aceite esencial se ve afectada por la acción de diversas moléculas y las interacciones que se producen entre ellas; por ello, dos aceites esenciales extraídos de la misma especie usualmente tienen diferente acción antimicrobiana (11).

La variabilidad química de los aceites esenciales constituye un aspecto fundamental para su estudio. Factores como el origen geográfico, las condiciones climáticas, la composición del suelo, la disponibilidad de agua, la época de cosecha, el órgano

vegetal utilizado y el procedimiento de extracción pueden modificar la proporción de sus componentes. En *Thymus vulgaris*, estas variaciones influyen en la concentración de compuestos como *timol*, *carvacrol*, *p*-cimeno y *γ-terpineno* (6,8).

La vía del mevalonato y la del fosfato de metileritritol regula la síntesis de terpenos, como la de fenilpropanoides, tal como demuestra el análisis de estos metabolitos secundarios. Estas rutas determinan la composición química del extracto y controlan directamente la proporción de las fracciones bioactivas. La interacción de monoterpenos oxigenados con hidrocarburos sesquiterpénicos produce efectos de sinergia metabólica en donde la combinación de moléculas potencia la actividad biológica respecto a los componentes aislados (14,15).

Una característica de especial interés es su actividad antimicrobiana, atribuida principalmente a la capacidad de determinados componentes para interactuar con las estructuras celulares de los microorganismos. Los compuestos de naturaleza hidrofóbica pueden asociarse con los componentes lipídicos de las membranas bacterianas y alterar su organización y permeabilidad. Como consecuencia, pueden producirse pérdida de componentes intracelulares, alteraciones del equilibrio iónico, disminución del potencial de membrana y afectación de procesos metabólicos esenciales para la supervivencia bacteriana (16).

El mecanismo de acción de los aceites esenciales consiste en a difusión de los compuestos liposolubles al interior del citoplasma induce la desnaturalización masiva de proteínas enzimáticas clave, provocando la interrupción de la cadena de transporte de electrones y el consecuente agotamiento del trifosfato de adenosina (ATP) (17).

Este estallido de energía provoca una inestabilidad en las bombas iónicas dependientes de membranas de los microbios, lo que ocasiona un flujo descontrolado de potasio y protones que colapsa de forma irreversible el gradiente electroquímico de los microbios. Igualmente, también se ha descrito que estas concentraciones alteran la expresión génica relacionada a la virulencia, lo que

disminuye significativamente la capacidad de motilidad, adhesión y de formación de biopelículas en patógenos ya resistentes (18).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales no es uniforme frente a todos los microorganismos, pues, tras las diferencias estructurales que presentan las bacterias Gram positivas y Gram negativas, se dan diferencias en la susceptibilidad. En ese sentido, la presencia de una membrana externa constituye una barrera frente a algunos de los compuestos hidrofóbicos en las Gram negativas mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular diferente estructuralmente (9).

La utilización directa de los aceites esenciales presenta algunas limitaciones relacionadas con su volatilidad, sensibilidad a factores ambientales, baja solubilidad acuosa y posible pérdida de los compuestos activos durante su manipulación y almacenamiento. Estas características han impulsado el desarrollo de estrategias destinadas a incorporar los aceites esenciales en matrices o sistemas de soporte que permitan mejorar su estabilidad, manipulación y disponibilidad; dando lugar a, la incorporación en materiales minerales porosos, como las zeolitas, que actuan como matrices capaces de retener compuestos bioactivos (19,20).

La alta reactividad de sus dobles enlaces conjugados y la presencia de grupos funcionales volátiles son desafíos para los factores de degradación ambiental como el oxígeno molecular, la radiación ultravioleta y el estrés térmico. La exposición continua a estos agentes desencadena reacciones de oxidación, polimerización e isomerización fotoquímica que degradan rápidamente la integridad bioactiva del aceite esencial, produciendo derivados inactivos (17,18).

4.2.2. PRINCIPALES GRUPOS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Los aceites esenciales son en realidad mezclas bastante complejas de metabolitos secundarios. En su mayoría, están formados por compuestos que pertenecen a los terpenos y sus derivados oxigenados. La variedad y proporción de estos componentes son los que marcan las diferencias en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, incluida su capacidad para combatir microorganismos. Es curioso cómo la composición puede cambiar dependiendo de varios factores: la especie de

planta, el lugar de origen, las condiciones bajo las cuales se cultiva, e incluso el método que se usa para extraerlos. Entre los grupos que realmente llaman la atención al caracterizar aceites esenciales, destacan los monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos fenólicos (10,16).

4.2.2.1. Monoterpenos

Los monoterpenos son compuestos que se forman a partir de diez átomos de carbono que provienen de dos unidades de isopreno. Estos compuestos son comunes en muchos aceites esenciales, los cuales presentan hidrocarburos y formas oxigenadas incluyendo alcoholes, aldehídos, cetonas y éteres; su alta volatilidad juega un papel crucial en las fragancias de las plantas (21).

Entre los monoterpenos presentes en aceites esenciales se encuentran compuestos como *α-pineno*, *β*-pineno, *limoneno*, *γ-terpineno y p-cimeno*. Aunque algunos de estos compuestos presntan actividad antimicrobiana individual, su efecto varia dependiendo de su concentración y de las interacciones con los demás componentes del aceite. Por ello, la actividad biológica de un aceite esencial debe analizarse considerando su composición global y no únicamente la presencia de un compuesto aislado (10).

En el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, los monoterpenos tienen especial importancia. El *p-cimeno y el γ-terpineno*, por ejemplo, suelen encontrarse entre sus componentes, aunque sus concentraciones dependen del quimiotipo y de las condiciones de obtención del aceite. Estos compuestos pueden contribuir a la actividad biológica del aceite mediante interacciones con estructuras celulares bacterianas y mediante efectos que pueden complementar la acción de otros constituyentes (9).

Los monoterpenos también influyen en la actividad de otros componentes presentes en el aceite. La interacción entre diferentes moléculas puede modificar la permeabilidad de las membranas bacterianas y favorecer la penetración de compuestos con mayor actividad biológica (21).

4.2.2.2. Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos son compuestos terpénicos constituidos generalmente por quince átomos de carbono, derivados de tres unidades de isopreno. En comparación con los monoterpenos, presentan mayor peso molecular y menor volatilidad relativa; se encuentran como hidrocarburos o como derivados oxigenados y forman parte de numerosos aceites esenciales(16).

Entre los sesquiterpenos presentes en aceites esenciales pueden encontrarse compuestos como *β-cariofileno*, *humuleno y germacreno*, además de diferentes derivados oxigenados; su importancia biológica se relaciona con su capacidad para interactuar con diferentes estructuras celulares y participar en actividades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias (22).

En el caso de *T. vulgaris*, los sesquiterpenos forman parte de la fracción minoritaria del aceite esencial. Aunque reciben menor atención que los monoterpenos fenólicos, su presencia contribuye al perfil químico global del aceite y modificar sus propiedades biológicas mediante interacciones con otros componentes (23).

4.2.2.3. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de metabolitos caracterizados por la presencia de un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático. Dentro de los aceites esenciales de especies pertenecientes a la familia *Lamiaceae*, algunos compuestos fenólicos tienen particular importancia debido a su actividad biológica. Entre ellos destacan *timol* y *carvacrol*, dos componentes estrechamente relacionados con la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Thymus vulgaris (24,25).*

El *timol* es un monoterpeno fenólico que presenta propiedades lipofílicas e interactua con la membrana citoplasmática bacteriana. Esta interacción modifica la organización de la bicapa lipídica, incrementar su permeabilidad y favorecer la pérdida de iones y otros componentes intracelulares. Como consecuencia, se producen alteraciones del equilibrio celular que comprometen el crecimiento y la supervivencia bacteriana (25).

El *carvacrol*, estructuralmente relacionado con el *timol*, también aporta a los efectos sobre la membrana bacteriana. Su carácter hidrofóbico favorece la interacción con los componentes lipídicos de la membrana y produce alteraciones de su integridad. La acción conjunta del *carvacrol* y otros componentes del aceite contribuye a explicar la actividad antimicrobiana observada frente a diferentes especies bacterianas (26).

La importancia de estos compuestos para la presente investigación radica en que *timol* y *carvacrol* constituyen componentes relevantes del aceite esencial de *T. vulgaris* y contribuyen a la actividad antimicrobiana que se pretende evaluar. Sin embargo, no debe asumirse que la actividad del aceite depende exclusivamente de ellos, debido a que otros monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos minoritarios pueden modificar el efecto final mediante interacciones sinérgicas, aditivas o antagonistas (27).

4.2.3. ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales presentan una notable amplitud de actividades biológicas como consecuencia de la diversidad de los metabolitos secundarios que los conforman. Las actividades, tal como ya se ha señalado, vienen determinadas por la composición química, por la concentración, las características fisicoquímicas y las interacciones de los componentes de los aceites. Dentro de las propiedades biológicas más estudiadas, se encuentran, entre otras, la actividad antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiinflamatoria y antiparasitaria, aunque a veces la magnitud de estas actividades varía según la especie botánica estudiada y las condiciones experimentales que hayan marcado el desarrollo del trabajo (28).

La actividad antimicrobiana es, sin duda alguna, una de las propiedades que más sobresalen en la evolución de las aplicaciones biotecnológicas de los aceites esenciales. Diversos constituyentes normalmente interaccionan o afectan las estructuras celulares de los microorganismos, en particular a las membranas, dada su naturaleza lipófila. La interacción con las estructuras de la membrana resultan en

una alteración de la permeabilidad, en la pérdida de los componentes intracelulares, en alguna circunstancia de la homeostasis iónica y en la alteración o el cese de los procesos metabólicos más importantes y necesarios para la viabilidad de la célula. A esos mecanismos se les atribuye, dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición, la inhibición del crecimiento o la pérdida de la viabilidad de la célula bacteriana (28,29).

Para diversos aceites esenciales, también se ha dicho que tienen actividad antifúngica. Los diferentes componentes de estos aceites esenciales son capaces de alterar la integridad de las membranas de las células del hongo e interferir en las actividades necesarias para el crecimiento y para la formación de las estructuras que son necesarias para la supervivencia del microorganismo. Esta actividad antifúngica ha suscitado interés por considerarlo como sustituto o complemento a las sustancias antimicrobianas ya conocidas, sobre todo para ser utilizadas en sistemas de control de microorganismos en alimentos, productos agrícolas y otras aplicaciones biológicas (18).

Una propiedad adicional de gran interés es la actividad antioxidante, entendida como la capacidad de ciertos elementos de reaccionar con especias reactivas y de prevenir las reacciones de oxidación. Sin embargo, la actividad antioxidante no tiene que estar necesariamente relacionada, de una manera necesariamente directa, con la actividad antimicrobiana, de aquí que debamos tener en cuenta que ambas propiedades son fenómenos biológicos distintos (28).

Los aceites esenciales muestran también actividad antiinflamatoria en diferentes modelos experimentales. Estos aceites contienen compuestos actúan como moduladores de vías implicadas en la respuesta inflamatoria y en la producción de mediadores celulares. La evidencia existente presenta variabilidad entre especies

La actividad antimicrobiana y antifúngica tiene un carácter destacado pues es la propiedad biológica que se evaluará en el sistema zeolita–aceite esencial de *T. vulgaris*. A diferencia del aceite esencial evaluado como tal, el aceite esencial es incorporado en un sistema que incluye el aceite como un componente más de una

matriz zeolítica que ha sido modificada previamente de forma instintiva con Ca^{2+} y Zn^{2+}.

4.2.4. ACEITE ESENCIAL DE *Thymus vulgaris*

Thymus vulgaris L. conocido como tomillo, corresponde a una especie vegetal de la familia *Lamiaceae,* del género *Thymus*. Esta planta es famosa por su productor de metabolitos secundarios y compuestos volátiles con multitud de propiedades biológicas. Se trata de una planta aromática perenne de porte bajo, con tallos ramificados y hojas pequeñas que presentan estructuras secretoras que acumulan los componentes responsables de su aroma. La principal distribución de la especie está asociada a la región mediterránea aunque en la actualidad su cultivo se ha extendido a otras regiones debido a su uso culinario, farmacológico y biotecnológico. La composición química de esta especie puede diferir a razón de factores genéticos, ambientales, geográficos o metodológicos así que lo que se puede observar en individuos de una misma especie y ver diferencias relevantes en el mismo perfil de metabolitos y particularmente en la composición del aceite esencial (27,30).

El aceite esencial de *T. vulgaris* constituye una mezcla compleja de compuestos volátiles cuya composición depende de la procedencia de la materia vegetal, el quimiotipo, la parte de la planta empleada y las condiciones de extracción. Entre sus principales componentes se han identificado *timol*, *carvacrol*, *p-cimeno y γ-terpineno*, además de otros monoterpenos y sesquiterpenos presentes en proporciones variables. La coexistencia de estos compuestos determina el perfil químico específico del aceite y puede explicar parte de la variabilidad observada en sus propiedades biológicas (30,31).

El *timol* es un monoterpeno fenólico de naturaleza lipofílica que forma interacciones con los constituyentes de las membranas bacterianas y que cambia la disposición de dicha membrana y su permeabilidad. Adicionalmente, el *carvacrol* relacionado con el *timol*, también tiene propiedades antimicrobianas que alteran la estructura de

las membranas celulares. Otros compuestos como el *p-cieno* o el *γ-terpineno* conforman el perfil químico del aceite del orégano y alteran su actividad debido a la interacción producidas con el resto de los componentes (32)

La composición química del aceite esencial de *T. vulgaris* presenta una variabilidad que puede estar asociada con la existencia de diferentes quimiotipos. Estos se diferencian por la predominancia relativa de determinados compuestos, lo que genera diferencias en la actividad antimicrobiana. Factores como la temperatura, disponibilidad de agua, características del suelo, altitud, etapa de desarrollo de la planta, época de cosecha y procedimiento de extracción pueden modificar la concentración de los componentes presentes en el aceite (30).

Se ha identificado que *T. vulgaris* ejerce efectos frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, aunque la magnitud de la actividad depende tanto de la composición química del aceite como de las características del microorganismo evaluado. Los mecanismos incluyen alteración de la membrana citoplasmática, modificación de la permeabilidad celular, pérdida de componentes intracelulares y afectación de procesos metabólicos esenciales (26).

Tardugno et al. evaluaron la composición química y la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *T. vulgaris*, observando diferencias en el perfil químico y actividad frente a microorganismos de interés. Estos resultados evidencian que las características químicas del aceite deben considerarse al analizar su efecto antimicrobiano. De manera complementaria, Galgano et al. demostraron que la actividad antibacteriana del aceite esencial de *T. vulgaris* está influenciada por variables como la concentración y el tiempo de contacto (10,11).

La actividad antimicrobiana del aceite esencial debe analizarse considerando las diferencias estructurales entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas. *Staphylococcus aureus posee* una pared celular gruesa constituida por peptidoglucano, mientras que *Escherichia coli* tiene una estructura de envoltura celular más compleja que incluye una membrana externa (9,33).

Una limitación asociada con la utilización directa de los aceites esenciales es su volatilidad, baja solubilidad en medios acuosos y susceptibilidad a procesos de degradación, dificultando su manipulación y limitan la disponibilidad de sus componentes activos durante determinados procedimientos experimentales. En consecuencia, se han desarrollado estrategias destinadas a incorporar aceites esenciales en matrices capaces de retenerlos y favorecer su estabilidad. Entre estas alternativas se encuentran las estructuras zeolíticas, debido a sus características de porosidad, superficie específica y capacidad para interactuar con diferentes moléculas (30,34).

El empleo de estructuras zeolíticas como sistemas para la incorporación y liberación de aceites esenciales destacan por su potencial como matrices capaces de proteger y transportar compuestos volátiles. La incorporación del aceite en una estructura porosa puede modificar sus propiedades de liberación y favorecer una utilización más controlada de los compuestos bioactivos (35).

4.2.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Thymus vulgaris*

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se encuentra relacionado con la composición química del aceite como la presencia de terpenos, terpenoides y compuestos fenólicos capaces de interactuar con estructuras celulares esenciales. En *Thymus vulgaris*, el potencial antimicrobiano se ha asociado con compuestos como *timol*, *carvacrol, p-cimeno y γ-terpineno*, aunque la proporción de estos componentes puede variar según el origen geográfico de la planta, el quimiotipo, las condiciones ambientales, la etapa de recolección y el método de extracción (36)

La literatura reciente ha confirmado que los terpenos y otros fitoquímicos presentes en los aceites esenciales pueden presentar actividad frente a diferentes bacterias y que la alteración de la membrana celular constituye uno de los mecanismos antimicrobianos más frecuentemente descritos (10,37).

Uno de los principales mecanismos asociados con esta actividad es la interacción de los componentes lipofílicos del aceite esencial con las membranas bacterianas. Debido a su afinidad por estructuras hidrofóbicas, determinadas moléculas pueden incorporarse a la bicapa lipídica y modificar su organización, fluidez y permeabilidad. Estas alteraciones pueden provocar pérdida de iones, cambios en el potencial de membrana, salida de componentes intracelulares y alteraciones del equilibrio osmótico. Cuando el daño supera la capacidad de reparación de la célula, pueden producirse alteraciones irreversibles que conducen a la pérdida de viabilidad bacteriana (36,37).

En el aceite esencial de *T. vulgaris*, el *timol* presenta particular importancia debido a su naturaleza monoterpénica fenólica y a su capacidad para interactuar con las membranas bacterianas. Su carácter hidrofóbico favorece la asociación con los componentes lipídicos de la membrana, lo que puede incrementar su permeabilidad y producir alteraciones en el equilibrio celular. El *carvacrol*, estructuralmente relacionado con el *timol*, puede ejercer efectos similares y contribuir al daño de la membrana (38).

Tanto el *p-cimeno* como el *γ-terpineno* contribuyen en cantidades relevantes al aceite esencial de *T. vulgaris*. A pesar de que su acción como actividad es distinta de la de los compuestos fenólicos, su presencia sí colabora en el perfil químico global del aceite, así como en la acción que se puede esperar, en función de las concentraciones de cada uno, para el resto de sus constituyentes. Esta particularidad es la que justifica que la composición relativa del aceite sea una de las piezas fundamentales para interpretar los resultados microbiológicos descritos. De forma que, Tardugno et al describen que las condiciones de cultivo influyen en la modificación de la composición química del aceite esencial de *T. vulgaris*, así como también en las variaciones de la actividad antimicrobiana, dejándonos evidenciar la necesidad de tomar cada perfil químico específico del material con el que se está ensayando en cada estudio (37,39).

La actividad antimicrobiana del aceite esencial también varía según la estructura de la bacteria. Las bacterias Gram positivas y Gram negativas presentan diferencias

relevantes en la organización de su envoltura celular, lo que puede modificar la interacción con compuestos hidrofóbicos. *Staphylococcus aureus*, utilizada en esta investigación como bacteria Gram positiva, presenta una pared celular gruesa rica en peptidoglucano y carece de la membrana externa característica de las bacterias Gram negativas (32,40).

Escherichia coli presenta una envoltura celular constituida por una membrana citoplasmática, una capa relativamente delgada de peptidoglucano y una membrana externa que contiene lipopolisacáridos. Estas diferencias estructurales influyen en la penetración y acción de los componentes del aceite esencial y justifican la evaluación de ambos microorganismos como representantes de grupos bacterianos con características diferentes (41).

La comparación entre *S. aureus* y *E. coli* permite determinar si el sistema desarrollado presenta un comportamiento antimicrobiano similar o diferente frente a bacterias con distinta organización celular. No obstante, la mayor o menor susceptibilidad de una bacteria no se explica únicamente por su clasificación Gram. También interviene la composición del aceite, la concentración del agente, la densidad del inóculo, las condiciones del medio, el tiempo de exposición y las características fisiológicas del microorganismo (40,42).

En concreto, se ha estudiado directamente el efecto del aceite esencial de tomillo contra la *E. coli* y la *S. aureus.* En un estudio sobre nanoemulsiones de este aceite esencial de tomillo se determinó la actividad antibacteriana mediante CMI, CMB y curvas de muerte y se observaron modificaciones de las características de las membranas bacterianas, como la fluidez y la despolarización de la membrana (30).

La actividad antimicrobiana del *T. vulgaris* también se ha demostrado a través de diversas metodologías experimentales. Tardugno et al. evaluaron aceites esenciales de esta especie y observaron actividad contra los microorganismos patógenos, además de observar que la composición química estaba relacionada con la actividad antimicrobiana (5,6).

Micucci et al. desarrollaron una formulación sólida de aceite esencial de *T. vulgaris* y demostraron que la formulación mantenía actividad antimicrobiana, lo cual resulta relevante para investigaciones que buscan incorporar el aceite esencial en una matriz o sistema sólido en lugar de utilizarlo exclusivamente en estado libre (30,33,36).

La concentración del aceite esencial es uno de los parámetros determinantes de su nivel de actividad antimicrobiana. A concentraciones bajas, la carga de compuestos bioactivos que contenga el aceite esencial puede no ser suficiente para provocar modificaciones celulares significativas; pero por el contrario, al aumentar la concentración aumenta la interacción con la membrana y otras estructuras bacterianas. El tiempo de exposición es también un parámetro significativo puesto que un tiempo de contacto más largo favorece la acumulación del daño celular. En el caso de *T. vulgaris*, cabe señalar que experimentalmente se ha demostrado que la concentración y el tiempo de contacto tienen una significante influencia en la actividad antibacteriana, y por esta razón, estas dos variables deben permanecer controladas durante la evaluación microbiológica (43).

Por lo contrario, la solución es muy volátil, poco soluble en agua y además extremadamente hidrofóbica, por lo que la dispersión en medios de cultivo acuosos resulta muy compleja y también limita la cantidad total de compuesto que llega a estar en contacto con las células bacterianas. Este hecho limita progresivamente su utilización directa y condiciona la búsqueda de sistemas de encapsulación, emulsificación y soporte sólido para mejorar su estabilidad y disponibilidad (41,44).

La encapsulación o, en su defecto, la inmovilización tiene la capacidad de cambiar la liberación del compuesto, disminuir la pérdida de compuestos volátiles en el entorno, además de permitir una interacción diferente y más controlada con el medio biológico. Se ha demostrado, que la encapsulación del aceite esencial de tomillo mediante sistemas de secado por aspersión tiene el efecto de conservar propiedades antimicrobianas y mejorar algunas características de estabilidad del aceite o incluso retardando la pérdida de compuestos volátiles de aromas, entre otras propiedades relevantes (9).

Las zeolitas son una serie de compuestos que cuentan con cualidades que le otorgan ventajas a la hora de utilizarlas como matrices para la incorporación de aceites esenciales, particularmente por su estructura porosa, su elevada superficie específica y su posibilidad de interacción con distintas moléculas, que permiten usarlas como materiales soporte. Ferreira et al. revisaron la incorporación de aceites esenciales en estructuras zeolíticas identificando la potencialidad de estos como sistemas de liberación de los compuestos volátiles (35).

La actividad antimicrobiana de un sistema zeolita–aceite esencial, por tanto, no debe asumirse como equivalente a la actividad del aceite en estado libre. La incorporación en una matriz puede modificar la disponibilidad de los componentes activos, su dispersión, su liberación y la interacción con las células bacterianas. Asimismo, la modificación de la zeolita mediante intercambio catiónico puede modificar las propiedades superficiales de la matriz y, en el caso del zinc, aportar un componente con potencial actividad antimicrobiana. Por ello, la actividad final del sistema debe establecerse mediante evaluación experimental frente a los microorganismos seleccionados y no inferirse únicamente a partir de los resultados publicados para el aceite esencial libre (6).

En consecuencia, la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *T. vulgaris* constituye el fundamento biológico de la investigación, mientras que la incorporación del aceite en una matriz zeolítica modificada representa la estrategia tecnológica mediante la cual se pretende desarrollar un sistema con potencial actividad antimicrobiana. La evaluación frente a cepas ATCC de *S. aureus* y *E. coli*, mediante la determinación de CMI y CMB, permitirá establecer experimentalmente la eficacia del material desarrollado y determinar si el sistema conserva o potencia una actividad antimicrobiana frente a ambos grupos bacterianos. De esta manera, el análisis integra la composición química del aceite, sus mecanismos de acción, las diferencias estructurales de los microorganismos y las propiedades de la matriz de soporte, proporcionando el fundamento teórico para la evaluación in vitro planteada en la investigación.

4.2.6. ZEOLITAS

Las zeolitas son materiales minerales de estructura cristalina microporosa constituidos principalmente por aluminosilicatos hidratados de elementos alcalinos y alcalinotérreos. Su estructura se caracteriza por la presencia de unidades tetraédricas de silicio y aluminio enlazadas mediante átomos de oxígeno, formando una red tridimensional con canales y cavidades de dimensiones nanométricas. La sustitución parcial de Si^{4+} por Al^{3+} genera una carga negativa en la estructura, la cual es compensada por cationes ubicados en los canales y cavidades del material. Estos cationes pueden intercambiarse por otros presentes en una solución, propiedad conocida como capacidad de intercambio catiónico, que constituye una de las características fisicoquímicas más importantes de las zeolitas y permite modificar sus propiedades superficiales y de interacción con diferentes moléculas (7).

La estructura porosa de las zeolitas les proporciona una elevada superficie interna y una capacidad de adsorción que depende del tamaño de poro, composición química, naturaleza de los cationes compensadores y condiciones del medio. Estas características han favorecido su utilización en diferentes áreas, entre ellas tratamiento de aguas, catálisis, separación de moléculas, agricultura, industria farmacéutica y desarrollo de materiales funcionales. Su capacidad para incorporar determinadas moléculas resulta particularmente relevante, ya que contribuye a mejorar la estabilidad y modificar la liberación de sustancias volátiles o poco solubles (35).

Las zeolitas presentan intercambio catiónico; puesto que, los cationes en los canales de la estructura pueden ser reemplazados por otros cationes cuando el material entra en contacto con una solución que contiene especies iónicas diferentes. Este proceso depende de factores como la naturaleza y concentración del catión, pH, temperatura, tiempo de contacto, composición de la zeolita y selectividad de intercambio. La modificación mediante intercambio catiónico permite

obtener materiales con propiedades diferentes a las de la zeolita original, lo que amplía sus posibilidades de aplicación (35,45).

Se modificará la zeolita mediante intercambio catiónico con Ca^{2+} y Zn^{2+}; ; ya que estos cationes pueden modificar las características superficiales y las propiedades de interacción con la matriz ya que, el calcio es un catión divalente que usualmente actua como especie compensadora de la carga negativa de la estructura zeolítica, mientras que el zinc, dada su participación en el intercambio catiónico y el interés en las propiedades antimicrobianas que presentan diferentes materiales que corresponden a los que contienen Zn^{2+}. Por lo tanto, la modificación de la zeolita, en la que se combinan ambos cationes, es una etapa importante de la estrategia de modificación que se desarrollará para poder incorporar el aceite esencial de Thymus vulgaris (35).

La incorporación de aceites esenciales en estructuras zeolíticas constituye una estrategia de interés para reducir algunas de las limitaciones asociadas con su utilización directa. Los aceites esenciales presentan elevada volatilidad, sensibilidad a determinadas condiciones ambientales y baja solubilidad en agua, características dificultan su manipulación y aplicación. La utilización de una matriz porosa favorece la retención de los componentes volátiles, protegerlos frente a determinados procesos de degradación y modificar su disponibilidad en el medio. Ferreira et al. analizaron específicamente el empleo de estructuras zeolíticas para la incorporación de aceites esenciales y señalaron su potencial como sistemas de liberación de compuestos bioactivos (28,35).

La interacción entre una zeolita y un aceite esencial depende de las características fisicoquímicas de ambos componentes. El tamaño y distribución de los poros, la superficie específica, la polaridad, la relación Si/Al y la naturaleza de los cationes presentes que influyen en la capacidad de incorporación del aceite. De manera complementaria, el tamaño molecular, polaridad, volatilidad y composición química de los componentes del aceite determinan su afinidad con la estructura zeolítica (35).

Parámetros como la composición mineral, la capacidad de intercambio catiónico, tamaño de partícula, superficie específica y características estructurales influyen en la incorporación del aceite esencial y en su comportamiento posterior. En consecuencia, cuando sea técnicamente posible, la descripción del material utilizado y de las condiciones de modificación deberá acompañar los resultados microbiológicos para facilitar la interpretación de la relación entre las propiedades del material y su actividad antimicrobiana (46).

La capacidad de las zeolitas para actuar como matrices de incorporación y liberación controlada ha generado interés en aplicaciones relacionadas con compuestos bioactivos. La incorporación de moléculas en materiales porosos disminuye su volatilización y modifica su velocidad de liberación, lo que permite prolongar su presencia en el medio. Esta característica favorece un contacto más sostenido entre el agente activo y el microorganismo, aunque el comportamiento específico dependerá de las características del material y de las condiciones experimentales (35).

La utilización de una zeolita previamente modificada con Ca^{2+} y Zn^{2+} tiene una función central, debido a que constituye la matriz sobre la cual se desarrollará el sistema zeolita–aceite esencial de *T. vulgaris*. La modificación mediante intercambio catiónico permitirá preparar el material antes de la carga del aceite esencial, mientras que la posterior incorporación del aceite permitirá obtener el sistema que será sometido a evaluación microbiológica. La secuencia de estas etapas resulta coherente con el objetivo de desarrollar un material con potencial actividad antimicrobiana frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli (32)*.

La zeolita como se mencionó es una matriz funcional de soporte, mientras que el aceite esencial constituye la fuente principal de compuestos orgánicos bioactivos. La presencia de Ca^{2+} y Zn^{2+} permite modificar la matriz y potencialmente generar propiedades adicionales. La actividad antimicrobiana final será una propiedad del sistema completo y deberá evaluarse mediante procedimientos microbiológicos estandarizados. La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y

concentración mínima bactericida (CMB) permitirá establecer cuantitativamente y cualitativa el comportamiento del material frente a los microorganismos seleccionados (35).

4.2.6.1 Tipos de zeolitas

Las zeolitas sintéticas son materiales cristalinos diseñados mediante síntesis hidrotermal para controlar rigurosamente el tamaño de poro, la composición química y la relación sílice-aluminio. Entre las estructuras se encuentran la Zeolita A, las estructuras tipo Faujasita) y la ZSM-5, las cuales poseen una geometría tridimensional uniforme que les otorga una selectividad molecular excepcional. Su alta pureza estructural evita las variaciones inherentes a los minerales de yacimiento, permitiendo su aplicación precisa en procesos catalíticos de refinación de petróleo, craqueo catalítico fluido, purificación de gases industriales y sistemas de intercambio iónico a gran escala (47,48).

La capacidad de ajustar su acidez superficial e hidrofobicidad mediante la modificación de la red de aluminosilicato transforma a estas estructuras en soportes ideales para la retención y entrega controlada de moléculas orgánicas y agentes bioactivos (47).

La idoneidad de las zeolitas producidas se muestra de manera significativa en los campos de la biotecnología, la biomedicina y la generación de materiales avanzados, dada su capacidad de adaptarse al tamaño de partícula. La zeolita A tiene una red de poquísimos poros ampliamente desarrollada en la deshidratación de disolventes y el ablandamiento del agua, mientras que la zeolita X e Y poseen unas cavidades de gran diámetro que cumplen la función de retener macromoléculas y complejos metálicos activo (49,50).

La zeolita tipo ZSM-5 se distingue por poseer una muy alta estabilidad térmica y una elevada resistencia en ambientes ácidos, lo que la hace idónea para experimentos con reacciones químicas severas. El encuadre estructural de esta zeolita permite la inclusión de cationes metálicos antimicrobianos como el zinc y el cobre, mejorando

su funcionalidad en sistemas de liberación controlada de fármacos o recubrimientos bactericidas para aplicaciones clínicas (48,50,51).

Las zeolitas naturales son aluminosilicatos que se han originado a lo largo de procesos geológicos durante milenios que se producen a consecuencia de la interacción hidrotermal de cenizas volcánicas con aguas alcalinas en entornos lacustres o marinos. Los minerales más abundantes y representativos son *la clinoptilolita*, *la mordenita*, *la chabazita*, la *erionita* y *la philipsita*, siendo *la clinoptilolita* la más estudiada del grupo por su importante biocompatibilidad y estabilidad física (52).

Las zeolitas naturales son estructuras con canales y cavidades microscópicas que albergan cationes intercambiables como sodio, potasio, calcio y magnesio, los cuales equilibran la carga negativa de la red. Su amplia disponibilidad en yacimientos, el bajo costo de extracción y su notable resistencia química las convierten en insumos esenciales para aplicaciones medioambientales. Entre estas aplicaciones se incluyen la descontaminación de aguas residuales, la adsorción de metales pesados y la retención de amonio en suelos agrícolas (52).

El valor industrial de las zeolitas naturales se basa en su elevada capacidad de intercambio catiónico y su estructura porosa, permitiéndoles actuar como tamices moleculares y como matrices adsorbentes. La clinoptilolita y la mordenita son especialmente valoradas por su alta resistencia a procesos físicos y químicos que pudiesen modificarlas, manteniendo así la integridad de su red inorgánica (53) .

Estas zeolitas purifican y eliminan impurezas por medio de procesos térmicos de deshidratación y lavados, que permiten recuperar espacios en sus canales, además de mejorar la superficie específica para adsorber metabolitos orgánicos. Por otro lado, su estructura rígida, además, actúa como una barrera de protección frente a elementos degradantes del medio como son la oxidación y la luz, que permite aumentar la estabilidad y la vida útil de los compuestos bioactivos que se almacenan en su matriz (54,55).

El área de la biomedicina mediante la ingeniería de materiales ha aumentado progresivamente el uso de zeolitas naturales como soportes funcionales, gracias a su capacidad de aceptar alteraciones catiónicas y la compatibilidad con los seres vivos. La polaridad de la superficie interior de especies como la clinoptilolita o la mordenita se modifica y se suman propiedades bactericidas que son inherentes a la matriz inorgánica, mediante intercambios cationicos con cationes divalentes, como puede ser el calcio o el zinc. Esta adsorción de carácter fisicoquímico permite que el mineral no solo funcione como un portador inerte, sino que adquiera carácter de elemento dinámico con capacidad de aceptar compuestos fenólicos volátiles y aceites esenciales mediante interacciones por adsorción no covalente (55,56).

La combinación de la red mineral natural dopada con iones metálicos y compuestos vegetales da lugar a sistemas híbridos que regulan la difusión y liberación gradual de agentes antimicrobianos, contrarrestando los mecanismos de resistencia bacteriana tanto en cepas Gram positivas como Gram negativas (50,53).

4.2.6.2 Mordenita

La *mordenita* es una zeolita que presenta una estructura cristalina con una alta relación Al/Si, lo que le otorga una gran resistencia en condiciones altamente ácidas y alta estabilidad térmica. Su red tridimensional inorgánica se caracteriza por canales unidireccionales que constan de doce átomos, teniendo un diámetro de poro que oscila entre 0,67-0,70 nm (57,58).

La conversión de la mordenita en un soporte de gran capacidad de intercambio, su elevada superficie específica, la posibilidad de modificar su estructura mineral en condiciones severas de calcinación y deshidratación, y su resistencia física a dichas condiciones, hacen que se convierta en un aluminosilicato de interés práctico y experimental tanto en procesos catalíticos industriales como en la obtención de materiales con funcionalidad avanzada (59).

Para el diseño de soportes de fármacos y sistemas de liberación prolongada, la mordenita requiere un condicionado físico-químico exigente, el cual permitirá maximizar su volumen libre intracristalino. El procedimiento comienza por un

tamizado y un lavado intensivo con agua destilada para eliminar impurezas superficiales y sales solubles que pueden bloquear el acceso a los microporos (59,60).

El material se somete a un tratamiento térmico de activación a temperaturas elevadas para conseguir eliminar las moléculas de agua coordinadas en los canales sin desorganizar la estructura inerte. Su acondicionamiento incrementa notablemente la energía libre superficial del mineral, y la hidrofobicidad local prepara así la estructura inorgánica para una adsorción más eficiente de las moléculas orgánicas lipofílicas. Para que la mordenita actúe como una matriz hospedadora uniforme y reproducible en aplicaciones biotecnológicas, esta fase de acondicionamiento resulta indispensable (60).

La importancia biomédica y antimicrobiana de la mordenita se potencia mediante su modificación por intercambio catiónico con cationes divalentes como el calcio (Ca^{2+}) y el zinc (Zn^{2+}). La incorporación de Ca^{2+} estabiliza la densidad de carga electrostática de la red y modula la accesibilidad a los canales, mientras que el Zn^{2+} aporta propiedades bactericidas intrínsecas al alterar la rigidez de la membrana celular bacteriana y promover la generación local de especies reactivas de oxígeno (60,61).

Esta matriz de mineral dopado actúa como un reservorio activo que puede impregnar y retener compuestos volátiles bioactivos, como son los monoterpenos y fenoles del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, lo que disminuye su rapidez de evaporación. La liberación hacia el medio de iones metálicos y de agentes vegetales desde la estructura porosa provocan un ataque multifactorial contra los gérmenes asociados con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, neutralizando eficientemente la resistencia de los mecanismos bacterianos (62).

4.2.6.3 Estructura Cristalina y Propiedades Fisicoquímicas de las Zeolitas Modificadas

Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos caracterizados por una red tridimensional de tetraedros de SiO_4 y AlO_4 unidos por átomos de oxígeno compartidos. Esta disposición estructural genera una red rígida con cavidades y canales de dimensiones moleculares bien definidas. La sustitución isomórfica del silicio tetravalente por aluminio trivalente genera un déficit de carga positiva dentro de la red inorgánica. Para mantener la electroneutralidad del cristal, se requiere la presencia de cationes compensadores situados en los canales del material. Estos cationes no están fuertemente ligados a la estructura, lo que les confiere movilidad y la capacidad de interactuar dinámicamente con soluciones acuosas externas (52,63).

La aptitud para el intercambio catiónico es una de las propiedades más significativas de estos materiales minerales en relación a la aplicación biomédica. La naturaleza del catión compensador afecta enormemente la polaridad interna, el diámetro efectivo de poro y la energía libre superficial del entramado zeolítico. Variando el entorno químico interior a partir del intercambio catiónico se controla la selectividad de adsorción hacia moléculas orgánicas complejas. Igualmente, el tamaño de los poros y la superficie específica controlan el volumen total accesible para la difusión de fluidos y sustancias volátiles (35).

El proceso de preparación y acondicionamiento previene la obstrucción de la red por impurezas o humedad residual. Los lavados sucesivos con agua destilada eliminan solubles o sales libres de la superficie sin alterar la red del aluminosilicato (63). El tratamiento térmico posterior libera las moléculas de agua coordinadas en las cavidades, aumentando el volumen libre disponible para moléculas de mayor tamaño. Este proceso de deshidratación o activación térmica resulta fundamental para optimizar la capacidad adsorbente de la matriz. Una matriz deshidratada presenta mayor afinidad hacia compuestos lipofílicos u orgánicos volátiles (52).

Las propiedades de sorción en las zeolitas dependen tanto de la geometría de los canales como de las interacciones electrostáticas locales. Las moléculas alojadas

en las cavidades experimentan fuerzas de Van der Waals y atracciones dipolares que favorecen su retención. Esta interacción física previene la evaporación acelerada de volátiles cuando quedan confinados en los microporos. Asimismo, la estructura mineral actúa como una barrera física frente a factores ambientales degradantes como la luz o el oxígeno (35).

La forma en que el comportamiento de la zeolita como matriz de liberación se ve en realidad fuertemente determinada por la estabilidad de su red. Cuando se encuentra en un medio físico o biológico, en condiciones de laboratorio, el armazón inerte no sufre cambios en su estructura que lo lleven a su degradación rápida. La liberación de las especies adsorbidas se produce en condiciones fisiológicas fundamentalmente a través de procesos de difusión por la red porosa. La cinética de este proceso esta influenciada por la fuerza de la interacción entre la molécula de interés retenida y la superficie interna modificada (64).

4.2.6.4 Rol del Zinc (Zn^{2+}) y Calcio (Ca^{2+}) como Agentes Antimicrobianos e Intercambiables

La modificación de materiales zeolíticos mediante el intercambio catiónico con Zn^{2+} y Ca^{2+} altera las características electrostáticas y biológicas de la matriz. El ion calcio (Ca^{2+}) es un catión divalente con un radio iónico adecuado, actúa estabilizando la carga de la red cristalina sin colapsar los canales porosos. Su presencia influye en el comportamiento de hidratación de la zeolita y condiciona la accesibilidad a los centros activos del mineral. Además, el Ca^{2+} participa en el equilibrio iónico superficial, actuando como un puente electrostático que puede facilitar la interacción con moléculas polares u otros iones presentes en la solución (65).

Por su parte, el ion zinc (Zn^{2+}) aporta propiedades biológicamente activas a la estructura inorgánica. Los cationes Zn^{2+} liberados gradualmente desde la matriz zeolítica pueden interactuar directamente con las estructuras envolventes de las bacterias. Este catión divalente se une a los grupos funcionales con carga negativa presentes en las membranas celulares, como fosfatos y carboxilos. Dicha interacción causa una alteración en la rigidez de la membrana celular,

desestabilizando su potencial bioeléctrico. Se produce un desequilibrio en el transporte iónico celular que compromete la viabilidad del microorganismo (65,66).

El mecanismo antibacteriano del Zn^{2+} abarca también la generación de especies reactivas de oxígeno en la superficie del material. Estas especies oxidantes inducen un estrés en los componentes lipídicos y proteicos de las membranas circundantes. Cuando los iones de zinc penetran el espacio intracelular, interfieren con la función de diversas metaloenzimas esenciales para el metabolismo respiratorio bacteriano. La inactivación de estos sistemas enzimáticos bloquea la producción de energía intracelular y promueve el daño estructural. Esta acción multifacética dificulta que los microorganismos desarrollen resistencia rápida frente a este ion (54).

La combinación de Ca^{2+} y Zn^{2+} dentro del mismo entramado mineral genera una acción complementaria entre la función estructural del primero y la bioactividad del segundo. El ion Ca^{2+} ayuda a modular la fuerza iónica local y la afinidad superficial, lo que regula el ritmo con el que el Zn^{2+} es intercambiado o liberado hacia el medio líquido. Esta regulación previene una liberación violenta e incontrolada de los iones activos, prolongando su disponibilidad en el sitio de acción. Así, la presencia conjunta de ambos cationes optimiza el rendimiento funcional de la matriz inorgánica (51).

En el contexto de un sistema combinado con aceites esenciales, los cationes metálicos fijados en los canales modifican la polaridad del canal mineral. Esto crea un ambiente fisicoquímico diferenciado que condiciona la adsorción de los metabolitos orgánicos. La interacción entre los cationes divalentes y los grupos funcionales oxigenados de los monoterpenos puede influir en la retención del compuesto vegetal. En consecuencia, la matriz dopada con Zn^{2+} y Ca^{2+} no actúa como un mero soporte inerte, sino como un componente activo que participa en el efecto antimicrobiano global del sistema (51,54,67).

4.2.7. MECANISMOS DE CARGA Y SORCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN MATRICES POROSAS

Realizando la impregnación de aceites esenciales en estructuras minerales porosas es posible captar su gran volatilidad, así como su falta de estabilidad química. La técnica de carga a base de disolventes evaporables mediante el uso de etanol permite conseguir la disolución transitoria de los componentes lipofílicos del aceite. Así, la mezcla líquida recorría por capilaridad el sistema de poros de la zeolita, de forma que los metabolitos activos fuesen transportados hasta el interior de las cavidades. La posterior y controlada evaporación del disolvente propicia una deposición del compuesto vegetal en la superficie interna y externa del mineral (68,69).

Las fuerzas impulsoras del proceso de adsorción se sustentan en interacciones físicas de naturaleza no covalente. Se generan enlaces de hidrógeno y atracciones dipolo-dipolo entre la superficie de la zeolita modificada y el *timol* y el *carvacrol*, componentes del aceite esencial. Las regiones aromáticas e hidrofóbicas de los monoterpenos se relacionan con los sitios activos de la red inorgánica. Estas interacciones disminuyen la presión de vapor de los compuestos orgánicos volátiles, haciendo que la pérdida de dichos compuestos por evaporación a temperatura ambiente se ralentice (69).

La inclusión de aceites esenciales en cavidades nanométricas restringe su contacto directo con elementos degradantes que pueden ser intrínsecos o extrínsecos. La radiación UV, el oxígeno atmosférico y la temperatura suelen promover la oxidación de los monoterpenos. En este contexto, podemos constatar que las moléculas orgánicas, por el hecho de encontrase en el interior de una red zeolítica, son inmunes a polimerizaciones o degradaciones fotoquímicas, es decir, su estructura química permanece sin alteración por períodos más prolongados de tiempo (70).

Los mecanismos fundamentales que controlan la velocidad a la que se libera el aceite esencial desde la matriz porosa hasta el medio que lo rodea son los procesos

de difusión y cuando la matriz porosa entra en contacto con una fase acuosa o un medio de cultivo disuelto, en este momento se inicia una competencia por la ocupación de los sitios de adsorción. Las moléculas de agua o los iones en solución son los que progresivamente desplazan a los metabolitos orgánicos retenidos en la red. Este despojo controlado genera un flujo continuo y sostenido del aceite esencial hacia la superficie del material (68,70).

Este sistema de liberación controlada permite que la concentración en el sitio local del agente antimicrobiano se mantenga durante más tiempo. En contraste con el uso de un aceite libre que se agota rápidamente por evaporación o agregación, el sistema soportado actúa como un reservorio. Esta liberación controlada hace que se mejore el contacto entre los monoterpenos activos y cada patógeno haciendo que se potencie la inhibición microbiana con cantidades relativamente importantes de sustancia activa (70).

4.2.8. RESISTENCIA ANTIBACTERIANA Y MECANISMOS DE ACCIÓN EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

Las bacterias Gram positivas se caracterizan por una estructura de envoltura celular compuesta predominantemente por una capa gruesa de peptidoglucano que rodea la membrana citoplasmática. Inmersos en esta red tridimensional se encuentran polímeros como los ácidos teicoicos y lipoteicoicos, los cuales otorgan una carga neta negativa a la superficie bacteriana. Aunque esta pared celular otorga rigidez y estabilidad frente a la presión osmótica, no constituye una barrera impenetrable contra moléculas lipofílicas de bajo peso molecular (71,72).

El mecanismo de acción de los aceites esenciales sobre esos microorganismos inicia con el contacto de sus constituyentes activos con la cubierta celular. Debido a su naturaleza hidrofóbica, las moléculas terpénicas y fenólicas atraviesan fácilmente la porosa red de peptidoglucano e insertan en la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática. Esta inserción induce un desorden del empaquetamiento de los fosfolípidos, lo que aumenta la fluidez de la membrana y altera, en gran medida, su integridad estructural (73) .

La pérdida de integridad en la membrana citoplasmática desencadena un incremento drástico en la permeabilidad vascular y celular. Esto provoca la salida incontrolada de constituyentes intracelulares esenciales, tales como iones potasio, nucleótidos y moléculas de ATP. Simultáneamente, se destruye el gradiente electroquímico y la fuerza motriz de protones necesaria para la síntesis de energía metabólica. Sin la capacidad de mantener este equilibrio, la célula pierde el control de su volumen y de los procesos de transporte activo requeridos para la supervivencia (73) .

Adicionalmente, al penetrar al citoplasma, los compuestos activos inactivan enzimas esenciales y desnaturalizan proteínas intracelulares. El colapso energético y la pérdida del contenido vital conducen al cese del crecimiento celular o a la lisis bacteriana. La relativa simplicidad de la envoltura en bacterias Gram positivas las hace particularmente susceptibles a estos agentes lipofílicos. La integración de un soporte inorgánico modificado prolonga este efecto, manteniendo una concentración constante de los agentes activos e intensificando el estrés celular mediante la liberación gradual de cationes metálicos (74,75).

4.2.9. MECANISMOS DE PERMEABILIDAD Y RESPUESTA CELULAR EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Las bacterias Gram negativas presentan una envoltura celular de alta complejidad compuesta por una membrana interna, una capa delgada de peptidoglucano en el espacio periplásmico y una membrana externa adicional. La cara exterior de esta membrana externa está constituida predominantemente por lipopolisacáridos (LPS) fuertemente empaquetados y estabilizados por cationes divalentes. Esta red lipopolisacárida actúa como una barrera selectiva e hidrofílica que dificulta la entrada de sustancias hidrofóbicas y compuestos antimicrobianos de gran tamaño hacia el interior de la célula (76,77).

Esta barrera estructural confiere a las bacterias Gram negativas una mayor resistencia intrínseca frente a agentes lipofílicos. Sin embargo, la presencia de monoterpenos hidrocarburados en los aceites esenciales puede desencadenar la

desorganización inicial de esta cubierta. Estos compuestos se insertan en las regiones hidrofóbicas de los LPS, alterando los puentes iónicos que mantienen la cohesión de la membrana externa. Esta desestabilización incrementa la permeabilidad superficial y abre paso a las moléculas con mayor actividad bactericida hacia el espacio periplásmico (78).

Cuando los elementos activos sobrepasan la membrana externa, se ponen en contacto directo con la membrana interna del citoplasma. Interactuar con esta segunda barrera cambia la permeabilidad celular de manera similar a lo que sucede en las bacterias Gram positivas, ya que corta la cadena de transporte de electrones y favorece el escape de metabolitos necesarios. Esta agresión en fases sucesivas pone en riesgo de manera irreversible la viabilidad celular (78,79).

La adición de cationes divalentes en el sistema hace que este proceso de permeabilización se intensifique. El zinc compite a nivel electrostático con los cationes nativos que estabilizan la red de lipopolisacáridos, lo que provoca la aparición de poros y huecos en el recubrimiento protector. El daño estructural acumulado favorece la difusión constante de los aceites esenciales desde la matriz porosa hasta el interior celular. Así, la combinación de los principios activos y la matriz mineral garantiza un ataque que considera múltiples factores y tiene capacidad para contrarrestar los mecanismos adaptativos del recubrimiento Gram negativo (76–78).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

II.1. Diseño de investigación

El enfoque de la investigación fue cuantitativo, experimental e *in vitro*, fundamentado en la medición sistemática de parámetros microbiológicos para determinar la actividad antimicrobiana del sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris*. Esta metodología estandarizada consiguió superar las limitaciones físicas inherentes al material inorgánico en un entorno líquido y obtener una caracterización rigurosa de la eficacia terapéutica frente a los microorganismos examinados.

La determinación inicial de la Concentración Mínima Inhibitoria se basó en la evaluación de la CMI en medio líquido. El parámetro evaluado consistió en la apreciación macroscópica de la presencia o ausencia de turbidez en el caldo Müller-Hinton tras la siembra e incubación. La insolubilidad y la opacidad natural que las partículas de zeolita otorgan a la suspensión líquida generaron una interferencia óptica que impidió discernir visualmente si la turbidez observada correspondía a la proliferación celular activa de las bacterias o a la dispersión física del soporte mineral.

Ante la limitación visual de la CMI en medio líquido, la confirmación de la eficacia antimicrobiana requirió la evaluación cuantitativa de la Concentración Mínima Bactericida (CMB). En esta etapa en medio sólido (agar PCA y agar Müller-Hinton), se eliminó la interferencia visual de la zeolita al sembrar alícuotas del ensayo mediante diluciones seriadas para controlar el efecto de arrastre del antimicrobiano, procediendo al recuento numérico de unidades formadoras de colonias (Colonias/placa) según el límite de detección metodológico.

El estudio contó con un diseño experimental *in vitro*, basado en la elaboración rigurosa del sistema híbrido zeolita–aceite esencial y la manipulación intencional de la variable independiente representada por las concentraciones del sistema (100 % equivalente a X mg/mL de masa total y Y mg/mL de aceite esencial en un volumen final de Z mL, $50\,\%$ y $25\,\%$). La variable dependiente, correspondiente a la respuesta biológica de las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, se midió en un entorno exógeno bajo el estricto

control de parámetros ambientales como la temperatura, la humedad, el tiempo de incubación y la estandarización del inóculo.

El método de investigación fue experimental y descriptivo, con el objetivo de determinar la magnitud del efecto bactericida y la inhibición que logró el sistema. El análisis se realizó con base en la recopilación de datos de la CMI y el recuento numérico de poblaciones bacterianas sobrevivientes expresadas en Colonias/placa, sin realizar inferencias causales no fundamentadas.

Este estudio fue considerado de tipo laboratorio (in vitro) porque se realizó en un medio controlado y aislado lo que confirió la posibilidad de repetir los experimentos. Se consideró experimental porque se intervino de forma directa en la concentración del material. Se trató de un estudio transversal por su carácter temporal. La recogida, el registro y la medición de los datos numéricos se realizaron en un marco temporal delimitado y específico del experimento sin que se desarrollara un seguimiento longitudinal intenso de las poblaciones de bacterias presentes.

II.2.- Población y muestra.

II.2.1. Universo o población

El universo de estudio estuvo constituido de manera general por microorganismos bacterianos de referencia utilizados a nivel internacional en investigaciones microbiológicas, control de calidad analítico y ensayos de susceptibilidad antimicrobiana. La población experimental se delimitó concretamente a cepas bacterianas estandarizadas de colección de referencia, caracterizadas por su pureza genotípica, estabilidad fenotípica y alta reproductibilidad en pruebas *in vitro*. Estas cepas fueron seleccionadas estratégicamente por poseer diferencias estructurales y fisiológicas determinantes en la arquitectura de sus envolturas celulares, permitiendo evaluar la amplitud del espectro de acción y la eficacia del sistema híbrido zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

La población se formó tomando en cuenta los dos grandes conjuntos de bacterias que tienen un impacto importante desde el punto de vista clínico, epidemiológico e industrial: Gram positivas y Gram negativas. Esta distinción fue esencial para

examinar la conducta del sistema vectorizado ante barreras de permeabilidad celular contrastantes, en particular la pared celular gruesa y rica en peptidoglicano de los microorganismos Gram positivos, frente a la pared celular más fina, pero con una membrana externa abundante en lipopolisacáridos que caracteriza a los Gram negativos. Se incorporó la cepa de *Staphylococcus aureus* como modelo representativo del grupo Gram positivo y a *Escherichia coli* como un modelo del grupo Gram negativo, en el marco de este criterio poblacional.

La muestra completa fue igual a la población seleccionada, dado que no se emplearon procedimientos de muestreo probabilístico o aleatorio, porque el uso de materiales de referencia demanda la inclusión cuidadosa de las cepas patrón certificadas. Por lo tanto, las cepas de la American Type Culture Collection fueron elegidas con sumo cuidado: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Las dos bacterias constituyen patrones estándar que las guías internacionales, como las normas CLSI, han aceptado globalmente para corroborar y normalizar nuevos agentes antibacterianos.

La unidad de análisis estuvo constituida por cada una de las cepas bacterianas ATCC reactivadas, estandarizadas al patrón 0,5 de la escala de McFarland e inoculadas en las réplicas experimentales expuestas a los distintos tratamientos y concentraciones del sistema zeolita–aceite esencial de Thymus vulgaris, bajo condiciones de ambiente y tiempo controladas.

Las cepas bacterianas se encontraban en crioconservación a −80 °C, en caldo tripticasa con 20 % de glicerol. Para su reactivación, se retiró el criovial del congelador y se realizó un descongelamiento parcial, procurando evitar la descongelación completa de la muestra. Posteriormente, se tomó una pequeña porción del material con un asa bacteriológica y se realizó la siembra mediante la técnica de estría por agotamiento en agar sangre. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 35–37 °C, bajo las condiciones establecidas por el laboratorio, con el propósito de favorecer la recuperación y el crecimiento de las cepas bacterianas.

Una vez obtenido el crecimiento bacteriano, se procedió a preparar el inóculo y estandarizarlo al patrón 0,5 de la escala de McFarland, previo a su utilización en los ensayos experimentales. La respuesta de cada unidad de análisis ante la exposición a los diferentes tratamientos se determinó cualitativamente mediante la presencia o ausencia de turbidez visible en la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y, para la Concentración Mínima Bactericida (CMB), mediante el conteo directo de las colonias desarrolladas en las placas, expresado como colonias/placa.

Los datos correspondientes a la procedencia y condiciones de conservación de las cepas fueron proporcionados por el QF. David Villalta, responsable del área de Cepario de la Facultad de Ciencias de la Salud, Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Católica de Cuenca.

II.2.2. Muestreo y muestra

Se utilizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, ya que las unidades experimentales fueron elegidas en función de su disponibilidad y pertinencia para los ensayos de actividad antimicrobiana. En este estudio se recurrió a cepas bacterianas de referencia certificadas, obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), elegidas por su uso estandarizado en pruebas microbiológicas y que representan grupos bacterianos con características estructurales dispares.

La muestra estuvo conformada por las siguientes cepas:

- *Escherichia coli* ATCC 25922, como representante de las bacterias gramnegativas. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, como representante de las bacterias grampositivas.

Las cepas fueron tratadas con el sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris*, lo que hizo posible poder determinar y comparar los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) para los diferentes microorganismos.

II.3.- Definición y clasificación de las variables

II.3.1- Variable independiente

Tipo de tratamiento aplicado: zeolita sola, aceite esencial de *Thymus vulgaris* solo, zeolita cargada con aceite esencial de *Thymus vulgaris,* y diferentes concentraciones del sistema zeolita–aceite esencial.

II.3.2- Variable dependiente

Variable dependiente: Actividad antimicrobiana, determinada mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (evaluada cualitativamente por la presencia o ausencia de turbidez) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) (evaluada cuantitativamente por el recuento de unidades formadoras de colonias - Colonias/placa) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

II.4.- Procedimientos, técnicas e instrumentos para la obtención de datos.

A fin de garantizar la estabilidad de los parámetros fisicoquímicos junto con su capacidad de reproducirse, se llevó a cabo el procedimiento experimental de modificación mineral y evaluación biológica bajo condiciones estrictamente controladas en el laboratorio. La fase inicial contempló la preparación integral de la matriz inorgánica de aluminosilicato tipo mordenita por medio de un tamizaje mecánico de gran precisión; este proceso es determinante para eliminar impurezas insolubles, partículas con tamaños no homogéneos y agregados voluminosos.

El material purificado fue sometido a un cuidadoso ciclo de entre 4 y 5 lavados consecutivos con agua destilada de alta pureza; en cada ciclo el material se dejó en reposo después de cada lavado, para facilitar la sedimentación gravitacional de la fase sólida dejando al fluido sobrenadante (que quedaba superficialmente) con los coloides y finos en suspensión. Tras la purificación acuosa, la mordenita fue tratada en proceso de secado térmico continuo a estufa, eliminado el agua residual intercristalina, y desorbiendo las moléculas que estaban atrapadas así desde la porosidad.

La funcionalización química de la mordenita se llevó a cabo mediante reacciones de intercambio iónico en fase líquida, empleando soluciones acuosas independientes de cloruro de calcio ($CaCl_2$) y cloruro de zinc ($ZnCl_2$), previamente estandarizadas a una concentración molar de 0,1 M. La interacción heterogénea entre la fase sólida y el medio líquido se ajustó estrictamente a una relación volumétrica sólido-ión de 1:10, asegurando un exceso estequiométrico de los cationes sustituyentes en la solución. Esta mezcla trifásica permaneció en agitación mecánica constante a velocidad moderada durante un lapso continuo de aproximadamente 12 horas, favoreciendo los fenómenos de difusión intraporosa y facilitando el reemplazo topotáctico de los cationes compensadores nativos (Na^+, K^+) por los cationes bivalentes Ca^{2+} y Zn^{2+} en la estructura tridimensional de los canales del aluminosilicato.

Para la construcción del sistema híbrido hospedador-huésped (zeolita–aceite esencial), se pesaron analíticamente 100 mg de la zeolita previamente modificada e intercambiada, los cuales se suspendieron en 1 mL de etanol al 96 % v/v utilizado como agente solubilizante y vehículo de dispersión de alta volatilidad. Inmediatamente después, se incorporaron 50 µL de aceite esencial puro de *Thymus vulgaris*. La suspensión se sometió a una agitación intensa mediante equipo vórtice durante un periodo continuo de 15 minutos para romper aglomerados, uniformar la suspensión y forzar el contacto íntimo entre los componentes bioactivos del aceite y la porosidad del soporte mineral.

Después, la mezcla fue trasladada a un horno de convección que se mantuvo a una temperatura estrictamente controlada entre 45 °C y 50 °C durante un lapso de 15 a 16 horas. Este tratamiento térmico gradual favoreció la evaporación lenta y total del disolvente orgánico, lo cual propició la estabilización física, adsorción y oclusión del aceite esencial en los macroporos y en la superficie exterior de la matriz zeolítica.

Como consiguiente, las suspensiones celulares se ajustaron con solución salina estéril mediante espectrofotometría y comparación visual hasta alcanzar una densidad equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland, lo que garantizó una

densidad celular estandarizada del inóculo ($\approx 1{,}5 \times 10^8$ Colonias/placa) para asegurar la comparabilidad entre los ensayos.

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria, se implementó el método de diluación en tubo utilizando Caldo Müller-Hinton no ajustado en cationes (NutriSelect® Plus, Millipore / Merck, Lote: BCC09010,

Los sistemas zeolíticos cargados se ensayaron preliminarmente en concentraciones relativas seriadas del 100 %, 50 % y 25 %, enfrentándolos directamente contra un inóculo bacteriano estandarizado con una concentración final de aproximadamente 5×10^5 Colonias/placa (obtenida tras ajustar la suspensión al patrón 0.5 de McFarland y realizar la correspondiente dilución $1{:}\,100$ en el medio de ensayo), e incluyendo controles directos de crecimiento bacteriano (sin agente antimicrobiano) y controles de esterilidad del medio.

Tras un periodo de incubación a 37 ± 1 °C durante 24 horas, se realizó la inspección macroscópica de los tubos. Debido a que la dispersión e insolubilidad de las partículas de zeolita otorgan una opacidad e interferencia óptica intrínseca al caldo, la lectura visual de turbidez se consideró una orientación cualitativa del rango de inhibición y no una CMI definitiva ni exacta. Para superar esta limitación del soporte inorgánico en medio líquido y no disponer de reveladores de viabilidad, la confirmación de la efectividad y la determinación del valor crítico de inhibición/muerte celular se respaldaron rigurosamente mediante el recuento cuantitativo de viabilidad celular en medio sólido (CMB).

La confirmación de la capacidad microbicida y la posterior determinación de la Concentración Mínima Bactericida se llevaron a cabo transfiriendo alícuotas del ensayo de CMI hacia medios de cultivo sólidos, utilizando de forma paralela Agar Müller-Hinton y Agar para Recuento en Placa. El uso de MHA responde al cumplimiento del estándar internacional para ensayos de susceptibilidad antimicrobiana, mientras que la inclusión paralela de PCA se justificó como un medio no selectivo y altamente nutritivo para asegurar la máxima recuperación de las bacterias que sufrieron daño celular o metabólico subletal pero reversible.

Para controlar el posible efecto de arrastre del antimicrobiano (*carryover*) hacia la placa y evitar falsos resultados bactericidas por inhibición residual, se inocularon alícuotas de pequeño volumen (10 μL en MHA y 10 μL en PCA) inoculadas por diseminación en superficie. Esta técnica genera una dilución física inmediata del agente en la matriz sólida del agar (reduciendo más de 1000 veces la concentración efectiva del composite sólido-líquido arrastrado), garantizando que los constituyentes activos (volátiles del aceite esencial y cationes Zn^{2+}) queden por debajo de sus concentraciones mínimas efectivas, permitiendo así el crecimiento exclusivo de las células bacterianas genuinamente viables.

Se tomaron 10 µL de las diluciones que no mostraron turbidez macroscópica y se inocularon por triplicado empleando la técnica de extensión en superficie mediante espátula de Drigalski, dividiendo equitativamente la muestra sobre las placas de cultivo (10 µL en PCA y 10 µL en Müller-Hinton).

Se añadió al ensayo una nueva ronda de incubación a 37 °C durante 24 h, tras la cual se observó la evidencia de la posible presencia de colonias viables donde se había sembrado; la total ausencia de unidades formadoras de colonias confirmaba que las células estaban, de modo irreversible, muertas y, por tanto, establecía la concentración bactericida efectiva del sistema

El registro pormenorizado de todos los resultados experimentales obtenidos en las fases de síntesis, caracterización microbiológica, recuentos de CMB y lecturas de MCI, se realizó en una ficha de recolección de datos elaborada de forma sistemática para la investigación. Esta se consolidó, codificó y tabuló en una base de datos estructurada para llevar a cabo el análisis descriptivo estadístico formal e interpretar el comportamiento antimicrobiano del material ensayado.

II.5.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos

Para el procesamiento y sistematización de los datos obtenidos en los ensayos microbiológicos, se empleó el software Microsoft Excel. La evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se llevó a cabo mediante el método de macrodilución en tubo, mientras que la concentración mínima bactericida (CMB) se

determinó a partir del sembrado en placas de agar tras la exposición a las diferentes concentraciones del sistema híbrido evaluado.

Para determinar el análisis descriptivo, los datos obtenidos en la Concentración Mínima Bactericida (CMB) se registraron mediante el conteo directo de las colonias desarrolladas en cada placa, los mismos fueron expresados como colonias/placa. Estos valores nos sirvieron para describir el crecimiento bacteriano observado en las diferentes concentraciones evaluadas. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la CMB se analizaron mediante frecuencias relativas y medidas de tendencia central, específicamente la media aritmética y su correspondiente desviación estándar (media ± DE), cuando correspondió.

Dado que los ensayos se realizaron mediante réplicas técnicas dentro de un modelo *in vitro* y los resultados de la CMI y CMB fueron nominados como “presencia o ausencia de turbidez” y “crecimiento bacteriano”, respectivamente, los datos se presentan únicamente con carácter descriptivo. Por lo cual, no se realizaron pruebas de importancia estadística ni inferencias sobre reproducibilidad biológica independiente o extrapolación clínica más allá de las condiciones experimentales evaluadas.

II.6.- Aspectos éticos

La investigación se realizó con estrictos estándares de precisión en los métodos, integridad académica y responsabilidad científica. El estudio no incluyó a seres humanos ni a animales de laboratorio porque fue un experimento que se llevó a cabo *in vitro*. Las cepas bacterianas ATCC se administraron en el laboratorio bajo condiciones controladas, de acuerdo con los protocolos de bioseguridad adecuados para prevenir riesgos vinculados a su manejo, tratamiento y eliminación.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. *Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) del sistema ZZnAEtom frente a Escherichia coli ATCC 25922*

Réplica del Tratamiento	**% Disolución**	**CMI (Turbidez)**	**CMB (Colonias/Placa)**
1.ZZnAEtom, ZCaAEtom	100%	Sin turbidez	0
2.ZZnAEtom, ZCaAEtom	100%	Sin turbidez	0
3.ZZnAEtom, ZCaAEtom	100%	Sin turbidez	0
1.ZZnAEtom, ZCaAEtom	50%	Sin turbidez	0
2.ZZnAEtom, ZCaAEtom	50%	Sin turbidez	0
3.ZZnAEtom, ZCaAEtom	50%	Sin turbidez	0
1.ZZnAEtom, ZCaAEtom	25%	Ligero turbio	>300
2.ZZnAEtom, ZCaAEtom	25%	Turbio	>300
3.ZZnAEtom¸ ZCaAEtom	25%	Turbio	>300

Fuente: Elaboración propia

Los resultados expuestos en la Tabla 1 reflejan la eficacia antibacteriana del sistema híbrido zeolita-zinc/aceite; como también del sistema híbrido zeolita-calcio/aceite esencial de *Thymus vulgaris* (*ZZnAEtom, ZCaAEtom*) sobre la cepa Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922. Se observó inhibición del crecimiento en la evaluación en caldo (sin turbidez) y ausencia total de colonias (0 colonias/placa) en las evaluaciones sobre agar para las concentraciones del 100 % y el 50 % en las tres réplicas estudiadas.

En la dilución al 25 % se evidenció una pérdida de la eficacia antibacteriana con un crecimiento masivo catalogado como colonias incontables (>300 colonias/placa). Según Radka Hulankova aún no existe CLSI determinado para aceites esenciales (82); por lo tanto, de acuerdo con las guías internacionales para el examen microbiológico en agar, los recuentos superiores a 300 colonias por placa se consideran fuera del rango de conteo lineal confiable, lo que confirma la pérdida de la actividad bactericida del composite a estas concentraciones.

La ausencia de colonias observada en el ensayo de CMB a las concentraciones del 50 % y 100 % evidencia actividad antimicrobiana del sistema frente a *E. coli* bajo las condiciones *in vitro* evaluadas. Este comportamiento podría relacionarse con mecanismos descritos en la literatura para los componentes del sistema. Los monoterpenos fenólicos presentes en el aceite esencial, como *carvacrol* y *timol*, pueden interactuar con componentes de la envoltura bacteriana y alterar la integridad de las membranas, favoreciendo cambios en su permeabilidad y la pérdida de componentes celulares (26,45).

La literatura nos indica que la presencia de cationes divalentes incorporados a la zeolita mediante intercambio iónico podría contribuir a la actividad observada. En particular, se ha descrito que los iones metálicos pueden interactuar con componentes de la membrana bacteriana y modificar las interacciones electrostáticas asociadas con los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas (60,65).

La turbidez del caldo y los elevados recuentos (más de 300 colonias/placa) indican, en contraposición, que la bioactividad ha disminuido bastante a una concentración del 25 %. Este comportamiento marca el límite de la concentración crítica o dependiente de la dosis, a partir del cual cada uno de los bioactivos no consigue el número necesario para ocupar las posiciones de las uniones lipídicas o para sobrepasar los mecanismos de reparación celular que puede poner en marcha *E. coli.* La cantidad de aceite liberada no es capaz de provocar el colapso de la homeostasis osmótica del microorganismo a tal ritmo de difusión (18,68).

La capacidad de la mordenita para modular la volatilización del aceite esencial es de gran importancia; debido a que, a estructura microporosa actúa como un reservorio protector que previene la degradación prematura por oxidación de los fenoles terpenoides (62).

Tabla 2. *Frecuencia Relativa de Inhibición y Efectividad Bactericida de Escherichia coli ATCC 25922*

% Disolución	Réplicas Evaluación	Eficiencia CMI (Sin turbidez)	Eficiencia CMB (Colonias/placa)	Tasa de Éxito Microbicida (%)
100%	3	3 / 3	3 / 3	100%
50%	3	3 / 3	3 / 3	100%
25%	3	0 / 3	0 / 3	0%

Fuente: Elaboración propia

La Tabla 2 presenta el comportamiento cualitativo y cuantitativo de la respuesta biológica de *Escherichia coli* ATCC 25922 ante las diluciones de los sistemas híbridos. En las concentraciones del 100 % y 50 %, se obtuvo una frecuencia observada de inactivación del 100 % (3/3 réplicas técnicas), mostrando una concordancia total entre el ensayo de inhibición en caldo (CMI) y la evaluación en agar sólido (CMB).

Cabe precisar que las evaluaciones se realizaron por triplicado mediante réplicas técnicas desarrolladas bajo idénticas condiciones operativas, lo que explica la nula

variabilidad entre las observaciones (0 colonias/placa en él 100 % y 50 %). Dada la naturaleza descriptiva del estudio y el tamaño muestral de réplicas ($n = 3$), esta respuesta refleja la consistencia interna del ensayo *in vitro*, pero no debe interpretarse como una estimación probabilística o de eficacia poblacional absoluta.

La caída abrupta hacia un 0 % de éxito microbicida en la dilución del 25 % demuestra la existencia de un perfil de respuesta no lineal. Este fenómeno sugiere que el colapso de la membrana bacteriana requiere alcanzar un potencial de saturación de superficie; podría indicar que las moléculas de *timol* y cationes Zn^{2+} desciende por debajo de un punto crítico, las bombas de eflujo y las respuestas al estrés de la pared Gram-negativa logran neutralizar el daño celular, permitiendo la reanudación del crecimiento exponencial (26,27,60,65).

La concordancia observada entre las tres réplicas técnicas en las concentraciones del 100 % y 50 % refleja la consistencia interna del ensayo en las condiciones evaluadas. La siembra en medio sólido (agar) permitió verificar la viabilidad celular bacteriana de forma independiente a la interferencia óptica del caldo, atenuando la limitación que la opacidad y la eventual sedimentación de las partículas de zeolita imponen sobre la lectura macroscópica en fase líquida.

Sin embargo, la coincidencia en tres réplicas operativas no descarta por completo los sesgos metodológicos inherentes a la insolubilidad del soporte mineral, la heterogeneidad de la suspensión o el posible efecto de arrastre (*carryover*) del antimicrobiano a la superficie del agar. Por tanto, estos resultados deben interpretarse estrictamente dentro de los límites del modelo *in vitro* utilizado, constituyendo una descripción de los puntos finales del ensayo y no una demostración de reproducibilidad biológica independiente o ausencia total de artefactos de medición.

Tabla 3. *Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) del sistema $ZZnAEtom$, $ZCaAEtom$ frente a Staphylococcus aureus ATCC 25923*

Réplica del Tratamiento	% Disolución	CMI (Turbidez)	CMB (Colonia Colonias/placa)
1.ZZnAEtom, ZCaAEtom	100%	Sin turbidez	0
2.ZZnAEtom, ZCaAEtom	100%	Sin turbidez	0
3.ZZnAEtom, ZCaAEtom	100%	Sin turbidez	0
1.ZZnAEtom, ZCaAEtom	50%	Sin turbidez	0
2.ZZnAEtom, ZCaAEtom	50%	Sin turbidez	0
3.ZZnAEtom, ZCaAEtom	50%	Sin turbidez	0
1.ZZnAEtom, ZCaAEtom	25%	Ligero turbio	>300
2.ZZnAEtom, ZCaAEtom	25%	Turbio	>300
3.ZZnAEtom, ZCaAEtom	25%	Turbio	>300

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados presentados en el Cuadro 3 la sensibilidad de la cepa Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente a la acción del sistema zeolita-zinc/aceite esencial de tomillo, tal como se mostró en el modelo Gram-negativo.

Soluciones al 100 % y además al 50 % mostraron la misma inhibición visual del cultivo, cuyo recuento presentó una reducción absoluta de la concentración de colonias viables (0 Colonias/placa) en las tres réplicas ejecutadas.

Dado que *S. aureus* era sensible a estas concentraciones, se justifica su susceptibilidad por el tipo de morfología que posee esta bacteria. Rajagopal y Yuan G creen que una estructura porosa, con cierta porosidad, es una de las características de ser activo. Aunque está formada por una capa de peptidoglucano compacto no tiene membrana externa lipídica que represente una barrera a la difusión hidrofóbica. Los fitoquímicos lipofílicos presentes en el aceite de tomillo cruzan sin problemas la red de mureína, atraviesan la membrana plasmática y alteran la organización del empaquetamiento de los fosfolípidos. Las proteínas del complejo respiratorio de transporte pierden también su actividad (75,80).

La acción de los cationes divalentes que se liberan de la matriz de mordenita produce una toxicidad centrada en la superficie del *S. aureus*. Según Guaya D los grupos carboxilo y fosfato, que poseen una gran negatividad, de los ácidos lipoteicoicos y teicoicos de la pared se enlazan electrostáticamente con el zinc divalente. Esta combinación modifica la rigidez de la cubierta celular y produce especies reactivas de oxígeno localizadas que oxidan los lípidos de membrana y fomentan la despolarización electroquímica (60).

La turbidez intensa y los conteos superiores a 300 Colonias/placa en el tratamiento de dilución al 25 % indican que la malla gruesa de peptidoglucano tuvo suficiente capacidad amortiguadora frente a dichas concentraciones. *S. aureus* puede activar procesos de defensa, como la modificación de la carga neta de sus ácidos teicoicos, cuando se encuentra con un flujo bajo de cationes y compuestos volátiles. Esto evita que los cationes penetren e incrementa la estabilidad de la membrana (60,81).

Que los valores de CMB y CMI sean equivalentes para *S. aureus* indica que la mordenita modificada como vehículo de liberación presentaría una buena efectividad. El encierro del aceite esencial en las cavidades del aluminosilicato evitaría la volatilización contundente desde el principio.

Tabla 4. *Frecuencia Relativa de Inhibición y Efectividad Bactericida de Staphylococcus aureus ATCC 25923.*

% Disolución	Réplicas Evaluación	Eficiencia CMI (Sin turbidez)	Eficiencia CMB (0 Colonias/placa)	Tasa de Éxito Microbicida (%)
100%	3	3 / 3	3 / 3	100%
50%	3	3 / 3	3 / 3	100%
25%	3	0 / 3	0 / 3	0%

Fuente: Elaboración propia

La Tabla 4 resume la respuesta biológica de la cepa Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente a las diluciones evaluadas del sistema híbrido. En las concentraciones del 100 % y 50 %, se obtuvo una frecuencia observada de inactivación del 100 % (3/3 réplicas técnicas), mostrando una concordancia total entre la ausencia de turbidez en la evaluación en caldo (CMI) y la ausencia de colonias en el recuento sobre medio sólido (0 colonias/placa en CMB). Por el contrario, la dilución al 25 % mostró pérdida de la efectividad inhibidora y bactericida en el total de los triplicados evaluados.

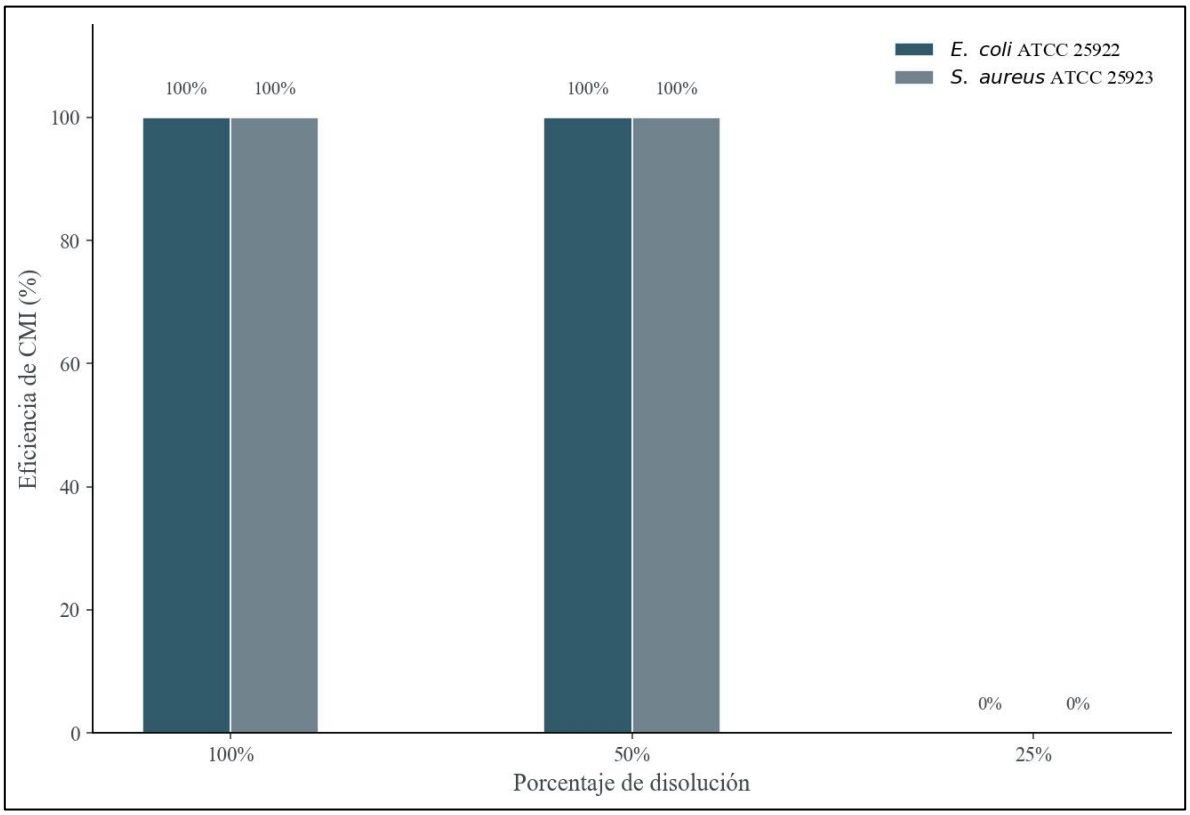
La coincidencia en los perfiles de respuesta observados a las concentraciones del 50 % y 100 % tanto en *S. aureus* (Tabla 4) como en *E. coli* (Tabla 2) refleja que el material híbrido ejerce una actividad antibacteriana efectiva frente a microorganismos con distintas configuraciones de envoltura celular.

Los datos permiten inferir que la integración de la zeolita cargada con zinc y el aceite esencial de *Thymus vulgaris* no genera un efecto antagónico, conservando la capacidad microbicida de sus constituyentes en las concentraciones efectivas evaluadas.

La pérdida de la actividad antibacteriana observada en la dilución al 25 % ($0/3$ réplicas con inhibición o inactivación) delimita el rango operativo de respuesta del sistema bajo las condiciones de ensayo utilizadas. Estos resultados indican que, en

el modelo *in vitro* evaluado, la concentración del 50 % constituye la mínima concentración efectiva observada frente a los microorganismos de estudio.

Figura 1. *Eficiencia de inhibición por concentración del sistema*



Fuente: Elaboración propia

La Figura 1 ilustra de forma gráfica la dinámica de inhibición del crecimiento bacteriano en función de la concentración del *ZZnAEtom y ZCaAEtom*, destacando la marcada gradación de su eficacia. La meseta del 100 % de inhibición sostenida en las diluciones al 100 % y 50 % evidencia una alta efectividad el sistema pues indica que se logró bloquear completamente crecimiento bacteriano en ambas especies evaluadas.

La marcada pérdida de la efectividad observada al descender al 25 % de concentración evidencia la presencia de un umbral de respuesta dosis-dependiente en el sistema evaluado. Este comportamiento sugiere que, a concentraciones del 25 % o inferiores, la masa disponible de los principios activos resulta insuficiente

para mantener la inhibición o inactivación bacteriana frente a la tasa de proliferación del microorganismo bajo las condiciones del ensayo.

La misma trayectoria de la curva para *E. coli* como para *S. aureus* que se observó en la gráfica reafirmó que el mecanismo inhibitorio era transversal (conforma la estructura de envoltura celular muy diferente entre bacterias gram positiva y gram negativa). La aportación generacional que hace el sistema híbrido, en la forma de una adecuada penetración y, por ende, inhibición, es un atributo muy apreciado en la búsqueda de desinfectantes de espectro amplio (77).

El comportamiento observado en la Figura 1 podría atribuirse hipotéticamente a los mecanismos de desorción y liberación descritos en la literatura para aceites esenciales soportados en matrices porosas inorgánicas. Se teoriza que, a concentraciones del 50 % y 100 %, la cantidad disponible de los componentes lipofílicos (como el *timol* y *carvacrol*) en la interfaz del sistema sería suficiente para mantener la actividad antibacteriana en la fase acuosa. Por el contrario, en la dilución al 25 %, la menor masa de composite en el sistema sugiere un posible descenso en la disponibilidad efectiva de dichos compuestos monoterpénicos libres, lo cual podría dificultar su interacción con la envoltura celular bacteriana bajo las condiciones del ensayo (62).

Tabla 5 *Controles experimentales y de sensibilidad microbiana para E. coli y S. aureus*

Parámetro de Control	*E. coli*	*S. aureus*	Observación del Ensayo
Esterilidad del medio	Sin turbidez (0)	Sin turbidez (0)	Ausencia de contaminación en el medio base
Crecimiento bacteriano	Turbio (>300)	Turbio (>300)	Viabilidad comprobada del inóculo patrón
Sensibilidad antibiótica.	Sin turbidez (0) *	Sin turbidez (0) **	Control farmacológico (*Imipenem / **Cefotaxima)

Sensibilidad ZZn sin tratamiento	Sin turbidez (0)	Sin turbidez (0)	Efecto inhibitorio del soporte con zinc
Sensibilidad ZCa sin tratamiento	Ligero turbio (>300)	Ligero turbio (>300)	Menor inhibición directa del soporte con calcio
Sensibilidad AE Tomillo	Sin turbidez (0)	Sin turbidez (0)	Actividad antimicrobiana del aceite puro

Fuente: Elaboración propia.

El control de calidad experimental y la verificación técnica de los ensayos microbiológicos de CMI y CMB se sustentan en los controles de idoneidad del sistema. La ausencia de crecimiento observada en el control de esterilidad del medio (sin turbidez en caldo y 0 colonias/placa en agar) confirmó la asepsia del caldo Mueller-Hinton, descartando contaminación externa durante el proceso de incubación. Por su parte, el control de viabilidad del inóculo evidenció turbidez macroscópica en caldo y un crecimiento masivo de colonias incontables (> 300 colonias/placa) en medio sólido, verificando que las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mantuvieron la densidad celular y viabilidad metabólica requeridas durante la prueba.

Asimismo, se utilizó controles con antibióticos de referencia, empleando Cefotaxima para *Staphylococcus aureus* e Imipenem para *Escherichia coli*, de acuerdo con los criterios de sensibilidad establecidos en la norma CLSI M100. Los controles coincidieron con los criterios de aceptación, evidenciándose ausencia de turbidez en el caldo y ausencia de crecimiento en la siembra posterior en agar. Estos resultados permitieron confirmar la susceptibilidad de las cepas de referencia y comprobar el correcto desarrollo del procedimiento microbiológico.

La utilización de estos antibióticos permitió contar con un punto de comparación para evaluar la respuesta de las cepas frente al sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

La aportación individual de cada soporte inorgánico es un aspecto fundamental. La zeolita que solo fue tratada con zinc sin aceite mostró una inhibición total por sí sola; es decir, sin turbidez, 0 Colonias/placa en las dos cepas, lo que podría indicar que tiene efecto antibacteriano inherente. En cambio, la zeolita que contiene calcio (ZCa sin aceite) presentó una inhibición ineficaz (>300 Colonias/placa, levemente turbio), lo que puede demostrar que quizá el ion Ca^{2+} tiene un papel más importante como modulador de carga y estabilizador de la red cristalina, pero no como microbicida.

Con la finalidad de demostrar que el efecto antibacteriano declarado puede considerarse como proveniente, únicamente, de los principios activos del sistema híbrido y no de potenciales restos del procedimiento de síntesis, las zeolitas modificadas con zinc y calcio fueron objeto de sucesivos ciclos de lavado con agua desionizada. La eliminación de los iones cloruro indeseados, resultantes del precursor ($ZnCl_2$) se probó cualitativamente a través de una prueba de precipitación con nitrato de plata ($AgNO_3$ 0.1 M), continuando con los ciclos de lavado hasta conseguir la desaparición del precipitado blanco (AgCl) en el sobrenadante.

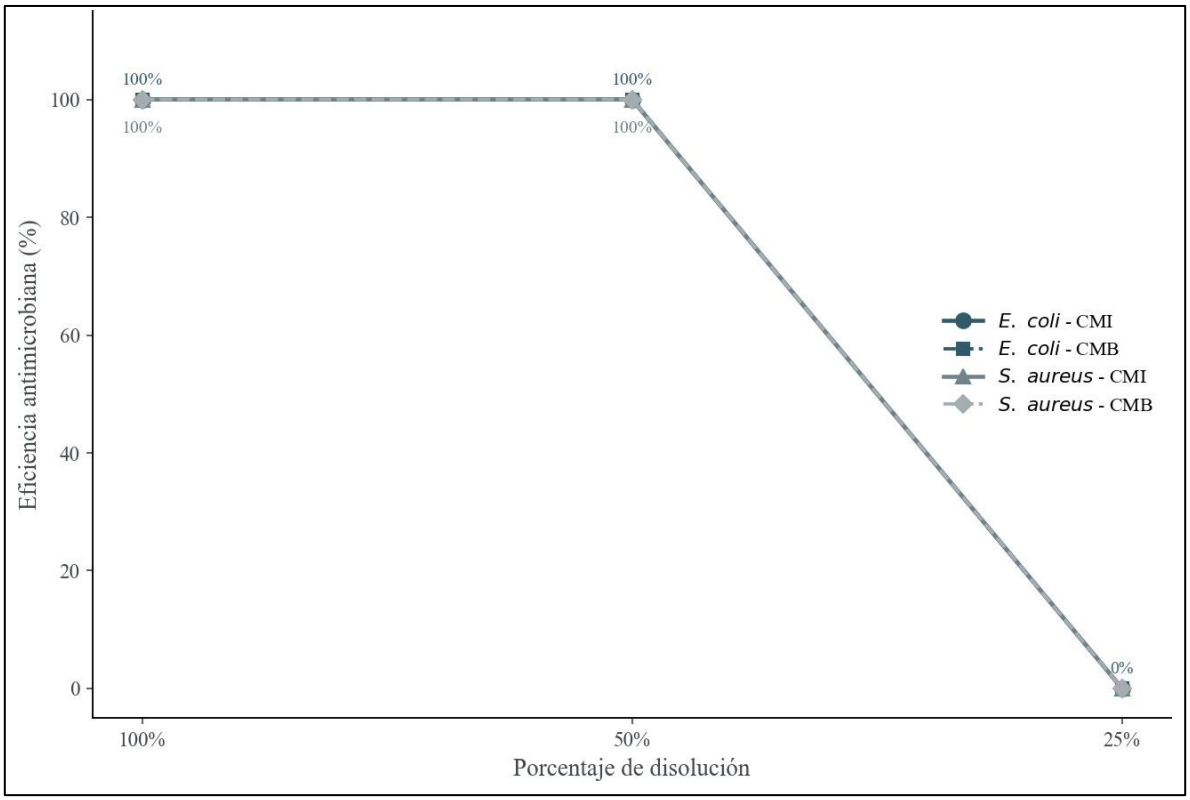
Las condiciones de esterilidad del sistema se aseguraron mediante el autoclavado previo de los medios de cultivo y del material de soporte a 121 °C durante 15 minutos, ejecutando todas las manipulaciones en un ambiente aséptico bajo flujo laminar y en la zona de bioseguridad generada por lámparas de alcohol. Para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida, se tomó una alícuota exacta de 10 μL de cada una de las diluciones evaluadas en la macrodilución en caldo y se sembró por estría/goteo en placas de agar Mueller-Hinton.

Adicionalmente, se incluyeron controles de esterilidad del medio y del material vegetal/mineral aislado en placas. Los resultados obtenidos en la siembra en agar permitieron evidenciar que, a pesar de la sedimentación física de las partículas de zeolita en la fase líquida durante la incubación, el agente antimicrobiano mantuvo

su efectividad o presentó una liberación progresiva en el medio, logrando la inactivación de la viabilidad celular en las concentraciones efectivas evaluadas.

El control del aceite esencial de tomillo puro, por otro lado, mostró una inhibición total de 0 Colonias/placa, lo que confirma la gran potencia intrínseca de los monoterpenos fenólicos libres. Sin embargo, según literatura la ventaja competitiva de incorporar el aceite en la matriz de ZZn o ZCa es que se resuelven las restricciones físicas del compuesto vegetal puro: su volatilidad alta, inestabilidad oxidativa y solubilidad en agua (58,62,66).

Figura 2. *Perfil de respuesta antimicrobiana según concentración*



Fuente: Elaboración propia.

La Figura 3 nos indica el comportamiento de la actividad antimicrobiana *in vitro* del sistema *ZZnAEtom y ZCaAEtom* frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en las diferentes concentraciones evaluadas. En ambas cepas no se observó

crecimiento en las concentraciones del 100 % y 50 %, mientras que a la concentración del 25 % fue lo contrario. Este comportamiento fue similar para ambas especies bajo las condiciones experimentales establecidas.

El comportamiento de la actividad antimicrobiana in vitro frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de las diferentes concentraciones a evaluar de los preparados *ZZnAEtom* y de *ZCaAEtom* fue el que muestra la Figura 3. En ambas cepas no se registró crecimiento a las concentraciones de 100 % y 50 % pero sí a la de 25 %; es decir, se construyó un perfil análogo para ambas especies según las condiciones experimentales que adoptamos para el trabajo.

La actividad que se considera que se ha desarrollado corresponde a la actividad *in vitro del* sistema formulado por los objetos experimentales en circunstancia de que, al mismo tiempo, los objetos experimentales evaluados por separado también mostraron actividad antimicrobiana en los controles, por lo que no se atribuye a la interacción entre la zeolita modificada con Zn^{2+} o Ca^{2+}y el aceite esencial de Thymus vulgaris el efecto observado.

La incorporación de aceites esenciales en matrices zeolíticas modifica la disponibilidad de sus componentes volátiles y favorece su retención dentro de la estructura microporosa (74,77). Esta posibilidad no fue evaluada mediante determinaciones cuantitativas de volatilidad o liberación, por lo que se considera una interpretación sustentada en la literatura y no un efecto demostrado experimentalmente.

La Figura 3 evidencia actividad antimicrobiana *in vitro* del sistema *ZZnAEtom y ZCaAEtom* frente a las dos cepas evaluadas, bajo las condiciones experimentales determinadas en este estudio.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

IV.1.- CONCLUSIONES

- - La actividad antimicrobiana in vitro del sistema híbrido zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* (*ZZnAEtom, ZCaAETom*) se determinó frente a las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. A las concentraciones del 100 % y 50 %, el material mostró una frecuencia observada de inhibición del 100 % en caldo (3/3 réplicas técnicas) mientras que, en la siembra sobre medio sólido, el volumen sembrado no mostró el desarrollo de colonias (10 μL, estableciendo el límite de detección del ensayo en 0 colonias/placa.
- Se elaboró el sistema híbrido mediante el intercambio catiónico de una zeolita tipo mordenita con Ca^{2+} y Zn^{2+}, seguido de la incorporación del aceite esencial de *Thymus vulgaris* mediante evaporación lenta. El procedimiento permitió obtener el material empleado en los ensayos antimicrobianos *in vitro*. Bajo las condiciones experimentales evaluadas, el sistema presentó actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- Se evaluó la respuesta biológica del sistema híbrido frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, situando el intervalo de inhibición observado entre el 25 % y el 50 % de concentración del sistema, dado que a la dilución del 25 % se reestableció la turbidez en el caldo. La siembra en agar actuó como una evaluación complementaria necesaria para verificar con claridad la inactivación bacteriana, permitiendo superar la limitación que la interferencia de la zeolita impone sobre la lectura macroscópica de la turbidez.
- La valoración en medio sólido proporcionó un registro cualitativo y descriptivo más fidedigno de la respuesta biológica que la lectura en caldo, al eliminar la confusión visual provocada por las partículas del soporte mineral. A 100 % y

50 % de concentración, no se evidenció crecimiento bacteriano en el volumen sembrado ($10\ \mu$L por placa, 0 colonias/placa) y la dilución al 25 % presentó un desarrollo masivo de colonias (> 300 colonias/placa).

IV.2.- RECOMENDACIONES

- Es importante escalar la evaluación de la actividad antimicrobiana del sistema *ZZnAEtom y ZCaAEtom*, mediante ensayos in vivo o en matrices aplicadas (tales como películas activas para el envasado de alimentos o recubrimientos de uso biomédico), evaluando su comportamiento frente a aislamientos clínicos patógenos con perfiles comprobados de multirresistencia a los antibióticos (por ejemplo, *S. aureus* resistente a meticilina - MRSA o *E. coli* productora de BLEE).
- Es importante profundizar en la caracterización fisicoquímica y estructural del sistema elaborado mediante técnicas analíticas avanzadas como Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y cromatografía de gases, con el propósito de cuantificar con precisión la eficiencia de carga del aceite, el porcentaje de desorción del Zn^{2+} y la cinética de liberación controlada de los monoterpenos en el tiempo.
- Cómo recomendación se debería preparar una suspensión madre de partida adecuadamente cuantificada (expresada en unidades de masa/volumen, como mg/mL) y aplicar un esquema estandarizado de diluciones seriadas dobles bajo norma internacional (CLSI/ISO) para establecer con precisión el rango de inhibición del sistema. A partir de este rango inicial, se podrá refinarse la gradación de concentraciones si el objetivo de optimización lo requiere, evitando la selección de porcentajes arbitrarios y garantizando la reproducibilidad metodológica del ensayo.
- Resulta conveniente llevar a cabo estudios de cinética de muerte bacteriana en el tiempo e imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido sobre las

células expuestas a las concentraciones efectivas evaluadas, con el fin de analizar la velocidad de inactivación celular en el tiempo y observar de forma directa las posibles alteraciones morfológicas sobre la pared y membrana celular producidas por el efecto del tratamiento combinado del zinc y el aceite esencial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Giono-Cerezo S, Santos-Preciado JI, Morfín-Otero M del R, Torres-López FJ, Alcántar-Curiel MD. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. Gac Med Mex. 2020 Feb 19;156(2). doi:10.24875/GMM.20005624

2. Allel K, García P, Labarca J, Munita JM, Rendic M, Grupo Colaborativo de Resistencia Bacteriana, et al. Socioeconomic factors associated with antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli in Chilean hospitals (2008–2017). Revista Panamericana de Salud Pública. 2020 Sep 23;44:1. doi:10.26633/RPSP.2020.30

3. Sosa Flores JL, Chapoñan Mendoza JF. Resistencia antibiótica de Escherichia coli, según producción de beta lactamasas de espectro extendido, en urocultivos. Hospital III-1. Chiclayo, Perú 2020. Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo. 2022 Dec 30;15(4):598–603. doi:10.35434/rcmhnaaa.2022.154.1627

4. Caycedo Lozano L, Corrales Ramírez LC, Trujillo Suárez DM. Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. Nova. 2021 Sep 20;19(36):49–94. doi:10.22490/24629448.5293

5. Patil SM, Ramu R, Shirahatti PS, Shivamallu C, Amachawadi RG. A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of Thymus vulgaris Linn. Heliyon. 2021 May;7(5):e07054. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07054

6. Wirtu SF, Ramaswamy K, Maitra R, Chopra S, Mishra AK, Jule LT. Isolation, characterization and antimicrobial activity study of Thymus vulgaris. Sci Rep. 2024 Sep 16;14(1):21573. doi:10.1038/s41598-024-71012-2

7. Derakhshankhah H, Jafari S, Sarvari S, Barzegari E, Moakedi F, Ghorbani M, et al. Biomedical Applications of Zeolitic Nanoparticles, with an Emphasis on Medical Interventions. Int J Nanomedicine. 2020 Jan;Volume 15:363–86. doi:10.2147/IJN.S234573

8. Yu J. Chemical Composition of Essential Oils and Their Potential Applications in Postharvest Storage of Cereal Grains. Molecules. 2025 Feb 4;30(3):683. doi:10.3390/molecules30030683

9. Micucci M, Protti M, Aldini R, Frosini M, Corazza I, Marzetti C, et al. Thymus vulgaris L. Essential Oil Solid Formulation: Chemical Profile and Spasmolytic and Antimicrobial Effects. Biomolecules. 2020 Jun 4;10(6):860. doi:10.3390/biom10060860

10. Tardugno R, Serio A, Purgatorio C, Savini V, Paparella A, Benvenuti S. Thymus vulgaris L. essential oils from Emilia Romagna Apennines (Italy): phytochemical composition and antimicrobial activity on food-borne pathogens. Nat Prod Res. 2022 Feb 1;36(3):837–42. doi:10.1080/14786419.2020.1798666

11. Galgano M, Pellegrini F, Mrenoshki D, Capozza P, Omar A, Salvaggiulo A, et al. Assessing Contact Time and Concentration of Thymus vulgaris Essential Oil on Antibacterial Efficacy In Vitro. Antibiotics. 2023 Jun 29;12(7):1129. doi:10.3390/antibiotics12071129

12. Alcívar Bazurto MC, Vargas Zambrano PA, Cuenca Nevárez G, Talledo Solórzano V. Determinación de propiedades antimicrobianas y termofísicas en un producto cárnico con adición del hidrolato de romero (Rosmarinus officinalis L.) y tomillo (Thymus vulgaris)". Polo del Conocimiento: Revista científico - profesional, ISSN-e 2550-682X, Vol 6, Nº 3, 2021, págs 1493-1512. 2021;6(3).

13. Astudillo OJA, Bermeo MJE, Ortiz GCP, Pozo SCG. Evaluación de la Capacidad Conservante de los Aceites Esenciales de Thymus Vulgaris y Salvia Officinalis en una Formulación Cosmética [Internet]. [Cuenca]: Grupo de Investigación de Inteligencia Artificial y Tecnologías de Asistencia (GI-IATA); 2023 [cited 2026 Sep 6]. Available from: https://pure.ups.edu.ec/es/publications/evaluation-of-the-preservative-capacity-of-thymus-vulgaris-and-sa/

14. Guo C, Xu S, Guo X. Metabolic Engineering of Terpenoid Biosynthesis in Medicinal Plants: From Genomic Insights to Biotechnological Applications. Curr Issues Mol Biol. 2025 Sep 5;47(9):723. doi:10.3390/cimb47090723

15. Cheng R, Yang S, Wang D, Qin F, Wang S, Meng S. Advances in the Biosynthesis of Plant Terpenoids: Models, Mechanisms, and Applications. Plants. 2025 May 10;14(10):1428. doi:10.3390/plants14101428

16. Álvarez-Martínez FJ, Barrajón-Catalán E, Herranz-López M, Micol V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. Phytomedicine. 2021 Sep;90:153626. doi:10.1016/j.phymed.2021.153626

17. El-Sakhawy MA, El Raheim Mohammed Donia A, Juraybi TN, El-Sherbiny Ateya AA, Osman W, Abd-Elghany AA, et al. Action Mechanism of Essential Oils or Their Components Against Pathogenic Bacteria: Literature Review. Int J Microbiol. 2026 Jan 21;2026(1). doi:10.1155/ijm/7468450

18. de Sousa DP, Damasceno ROS, Amorati R, Elshabrawy HA, de Castro RD, Bezerra DP, et al. Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. Biomolecules. 2023 Jul 18;13(7):1144. doi:10.3390/biom13071144

19. He Q, Zhang L, Yang Z, Ding T, Ye X, Liu D, et al. Antibacterial mechanisms of thyme essential oil nanoemulsions against Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus: Alterations in membrane compositions and characteristics. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2022 Jan;75:102902. doi:10.1016/j.ifset.2021.102902

20. Yang SK, Tan NP, Chong CW, Abushelaibi A, Lim SHE, Lai KS. The Missing Piece: Recent Approaches Investigating the Antimicrobial Mode of Action of Essential Oils. Evolutionary Bioinformatics. 2021. doi:10.1177/1176934320938391

21. Angane M, Swift S, Huang K, Butts CA, Quek SY. Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. Foods. 2022 Feb 4;11(3):464. doi:10.3390/foods11030464

22. E Silva RC, Da Costa JS, De Figueiredo RO, Setzer WN, Da Silva JKR, Maia JGS, et al. Monoterpenes and sesquiterpenes of essential oils from Psidium species and their biological properties. Molecules. 2021;26(4). doi:10.3390/molecules26040965

23. Da Silveira E Sá RDC, Andrade LN, De Sousa DP. Sesquiterpenes from essential oils and anti-inflammatory activity. Natural Product Communications. 2015. doi:10.1177/1934578x1501001033

24. Li Z, Howell K, Fang Z, Zhang P. Sesquiterpenes in grapes and wines: Occurrence, biosynthesis, functionality, and influence of winemaking processes. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2020;19(1). doi:10.1111/1541-4337.12516

25. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. Current Research in Food Science. 2021. doi:10.1016/j.crfs.2021.03.011

26. Radocchia G, Giammarino A, Barberini S, Verdolini L, De Angelis M, Simonetti G, et al. *Carvacrol* and Thymol, a Synergistic Antimicrobial Activity Against Bacterial and *Candida* Species. Microbiologyopen. 2025 Oct 22;14(5). doi:10.1002/mbo3.70089

27. Liu T, Kang J, Liu L. Thymol as a critical component of Thymus vulgaris L. essential oil combats Pseudomonas aeruginosa by intercalating DNA and inactivating biofilm. LWT. 2021;136. doi:10.1016/j.lwt.2020.110354

28. Ben Miri Y. Essential Oils: Chemical Composition and Diverse Biological Activities : A Comprehensive Review. Natural Product Communications. 2025. doi:10.1177/1934578X241311790

29. Pandu W E, Mutmainnah Musa I, Lestari Daeng Kanang I, Muchtar A. Efikasi Herba Timi (Thymus Vulgaris L.) Sebagai Antibiotik Terhadap Klebsiella Pneumoniae. Innovative: Journal Of Social Science Research. 2023;3(6).

30. Galovičová L, Borotová P, Valková V, Vukovic NL, Vukic M, Štefániková J, et al. Thymus vulgaris essential oil and its biological activity. Plants. 2021;10(9). doi:10.3390/plants10091959

31. Niksic H, Becic F, Koric E, Gusic I, Omeragic E, Muratovic S, et al. Cytotoxicity screening of Thymus vulgaris L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines. Sci Rep. 2021;11(1). doi:10.1038/s41598-021-92679-x

32. Capatina L, Todirascu-Ciornea E, Napoli EM, Ruberto G, Hritcu L, Dumitru G. Thymus vulgaris essential oil protects zebrafish against cognitive dysfunction by regulating cholinergic and antioxidants systems. Antioxidants. 2020;9(11). doi:10.3390/antiox9111083

33. Baj T, Biernasiuk A, Wróbel R, Malm A. Chemical composition and in vitro activity of Origanum vulgare L., Satureja hortensis L., Thymus serpyllum L. And Thymus vulgaris L. essential oils towards oral isolates of Candida albicans and Candida glabrata. Open Chem. 2020;18(1). doi:10.1515/chem-2020-0011

34. Popa CL, Lupitu A, Mot MD, Copolovici L, Moisa C, Copolovici DM. Chemical and biochemical characterization of essential oils and their corresponding hydrolats from six species of the Lamiaceae family. Plants. 2021;10(11). doi:10.3390/plants10112489

35. Ferreira AP, Almeida-Aguiar C, Costa SPG, Neves IC. Essential Oils Encapsulated in Zeolite Structures as Delivery Systems (EODS): An Overview. Molecules. 2022 Dec 3;27(23):8525. doi:10.3390/molecules27238525

36. Aldosary SK, El-Rahman SNA, Al-Jameel SS, Alromihi NM. Antioxidant and antimicrobial activities of Thymus vulgaris essential oil contained and synthesis thymus (Vulgaris) silver nanoparticles. Brazilian Journal of Biology. 2023;83. doi:10.1590/1519-6984.244675

37. Abdelhamed FM, Abdeltawab NF, ElRakaiby MT, Shamma RN, Moneib NA. Antibacterial and Anti-Inflammatory Activities of Thymus vulgaris Essential Oil Nanoemulsion on Acne Vulgaris. Microorganisms. 2022;10(9). doi:10.3390/microorganisms10091874

38. Zanotto AW, Kanemaru MYS, de Souza FG, Duarte MCT, de Andrade CJ, Pastore GM. Enhanced antimicrobial and antioxidant capacity of Thymus vulgaris, Lippia sidoides, and Cymbopogon citratus emulsions when combined with mannosylerythritol a lipid biosurfactant. Food Research International. 2023;163. doi:10.1016/j.foodres.2022.112213

39. Bakó C, Balázs VL, Kerekes E, Kocsis B, Nagy DU, Szabó P, et al. Flowering phenophases influence the antibacterial and anti-biofilm effects of Thymus vulgaris L. essential oil. BMC Complement Med Ther. 2023;23(1). doi:10.1186/s12906-023-03966-1

40. Park SY, Raka RN, Hui XL, Song Y, Sun JL, Xiang J, et al. Six Spain Thymus essential oils composition analysis and their in vitro and in silico study against Streptococcus mutans. BMC Complement Med Ther. 2023;23(1). doi:10.1186/s12906-023-03928-7

41. Chahboun N, Barrahi A, Koursaoui L, Mortada S, Fahsi K, Flouchi R, et al. Chemical composition, biological activities, and anti-corrosion performance of Moroccan essential oil Thymus vulgaris from the Oued Amlil region, Taza.

International Journal of Electrochemical Science . 2024;19(12). doi:10.1016/j.ijoes.2024.100859

42. Laftouhi A, Slimani M, Elrherabi A, Bouhrim M, Mahraz MA, Idrissi AM, et al. Effect of Temperature and Water Stress on the Antioxidant and Antidiabetic Activities of Thymus vulgaris Essential Oil. Tropical Journal of Natural Product Research. 2024;8(1). doi:10.26538/tjnpr/v8i1.11

43. Moazeni M, Davari A, Shabanzadeh S, Akhtari J, Saeedi M, Mortyeza-Semnani K, et al. In vitro antifungal activity of Thymus vulgaris essential oil nanoemulsion. J Herb Med. 2021;28. doi:10.1016/j.hermed.2021.100452

44. Ahmad A, Van Vuuren S, Viljoen A. Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils - the case of thymus vulgaris (Thyme). Molecules. 2014;19(3). doi:10.3390/molecules19032896

45. Rahman MdM, Rahaman MdS, Islam MdR, Hossain MdE, Mannan Mithi F, Ahmed M, et al. Multifunctional Therapeutic Potential of Phytocomplexes and Natural Extracts for Antimicrobial Properties. Antibiotics. 2021 Sep 6;10(9):1076. doi:10.3390/antibiotics10091076

46. Hijazi N, Bavykina A, Yarulina I, Shoinkhorova T, Ramos-Fernandez E V., Gascon J. Chemical engineering of zeolites: alleviating transport limitations through hierarchical design and shaping. Chem Soc Rev. 2025;54(13):6335–84. doi:10.1039/D5CS00169B

47. Hart A, Wood J. Methodological review of zeolite synthesis from industrial waste and natural clays and the fabrication of hierarchical pore structures. Next Materials. 2025 Oct;9:101113. doi:10.1016/j.nxmate.2025.101113

48. Khaleque A, Alam MM, Hoque M, Mondal S, Haider J Bin, Xu B, et al. Zeolite synthesis from low-cost materials and environmental applications: A review. Environmental Advances. 2020. doi:10.1016/j.envadv.2020.100019

49. Zhang W, Zhang T, Lv Y, Jing T, Gao X, Gu Z, et al. Recent Progress on the Synthesis and Applications of Zeolites from Industrial Solid Wastes. Catalysts. 2024 Oct 20;14(10):734. doi:10.3390/catal14100734

50. Ibrahim AIO, Moodley D, Maboza E, Olivier A, Petrik L. Zeolite-Y-Loaded Chitosan Nanoparticles as Endodontic Antimicrobial Agent: An In vitro Study. Eur J Dent. 2026;20(1). doi:10.1055/s-0045-1802947

51. Oheix E, Daou TJ, Pieuchot L. Antimicrobial zeolites and metal–organic frameworks. Mater Horiz. 2024;11(24):6222–56. doi:10.1039/D4MH00259H

52. Kordala N, Wyszkowski M. Zeolite Properties, Methods of Synthesis, and Selected Applications. Molecules. 2024 Feb 29;29(5):1069. doi:10.3390/molecules29051069

53. Alotaibi AM. An Overview of Zeolites: From Historical Background to Diverse Applications. Molecules. 2025 Oct 10;30(20):4036. doi:10.3390/molecules30204036

54. Morante-Carballo F, Montalván-Burbano N, Carrión-Mero P, Espinoza-Santos N. Cation Exchange of Natural Zeolites: Worldwide Research. Sustainability. 2021 Jul 12;13(14):7751. doi:10.3390/su13147751

55. Król M. Natural vs. Synthetic Zeolites. Crystals (Basel). 2020 Jul 17;10(7):622. doi:10.3390/cryst10070622

56. Margeta K, Zabukovec N, Siljeg M, Farkas A. Natural Zeolites in Water Treatment – How Effective is Their Use. In: Water Treatment. InTech; 2013. doi:10.5772/50738

57. Lankapati HM, Lathiya DR, Choudhary L, Dalai AK, Maheria KC. Modification and characterization of Mordenite zeolite derived from waste coal fly ash and its application as a heterogeneous catalyst for the n-butyl levulinate synthesis. Catal Commun. 2023 Oct;183:106772. doi:10.1016/j.catcom.2023.106772

58. Lai DQ, Nguyen HT, Nguyen LQ, Tran VTK. Synthesis and Evaluation of Mordenite Zeolite (MOR Zeolite) for Selective Caffeine Adsorption From

Green Tea Extract. J Food Sci. 2025 Nov 7;90(11). doi:10.1111/1750-3841.70602

59. Narayanan S, Tamizhdurai P, Mangesh VL, Ragupathi C, Santhana krishnan P, Ramesh A. Recent advances in the synthesis and applications of mordenite zeolite – review. RSC Adv. 2021;11(1):250–67. doi:10.1039/D0RA09434J

60. Guaya D, Espinoza LC, Jaramillo-Fierro X, Gualotuña Campoverde D, Sosa L, Calpena AC. Zinc-Modified Mordenite Zeolite as a Molecular Carrier for Donepezil: A Framework for Drug Delivery Applications. Molecules. 2025 Oct 24;30(21):4174. doi:10.3390/molecules30214174

61. Neolaka YAB, Darmokoesoemo H, Adu AA, Lawa Y, Naat J, Riwu AAP, et al. Study of mordenite natural zeolite type modified by Cu(II) cation as an oral safe drug carrier for ibuprofen and meloxicam. J Mol Liq. 2022 Apr;352:118734. doi:10.1016/j.molliq.2022.118734

62. Komandin AA, Medvedev YuN. Zeolites: History and Modernity. Chemistry at School. 2024;(4). doi:10.62709/0368-5632-2024-4-10-18

63. Schulman E, Wu W, Liu D. Two-Dimensional Zeolite Materials: Structural and Acidity Properties. Materials. 2020 Apr 12;13(8):1822. doi:10.3390/ma13081822

64. Pérez-Botella E, Valencia S, Rey F. Zeolites in Adsorption Processes: State of the Art and Future Prospects. Chemical Reviews. 2022. doi:10.1021/acs.chemrev.2c00140

65. Sánchez-López P, Hernández-Hernández KA, Fuentes Moyado S, Cadena Nava RD, Smolentseva E. Antimicrobial and Virus Adsorption Properties of Y-Zeolite Exchanged with Silver and Zinc Cations. ACS Omega. 2024 Feb 7. doi:10.1021/acsomega.3c06462

66. Cometa S, Bonifacio MA, Bellissimo A, Pinto L, Petrella A, De Vietro N, et al. A green approach to develop zeolite-thymol antimicrobial composites:

analytical characterization and antimicrobial activity evaluation. Heliyon. 2022 May;8(5):e09551. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09551

67. Grifasi N, Ziantoni B, Fino D, Piumetti M. Fundamental properties and sustainable applications of the natural zeolite clinoptilolite. Environmental Science and Pollution Research. 2024 May 23;32(48):27805–40. doi:10.1007/s11356-024-33656-5

68. Whyms SE, Sheridan H, Walsh JJ. Design Considerations for Essential Oil Formulations: Emulsification, Encapsulation and Stabilisation Strategies. Pharmaceutics. 2026 Aug 1;18(8):953. doi:10.3390/pharmaceutics18080953

69. Lim XY, Li J, Yin HM, He M, Li L, Zhang T. Stabilization of Essential Oil: Polysaccharide-Based Drug Delivery System with Plant-like Structure Based on Biomimetic Concept. Polymers (Basel). 2023 Aug 8;15(16):3338. doi:10.3390/polym15163338

70. Hettmann K, Monnard FW, Melo Rodriguez G, Hilty FM, Yildirim S, Schoelkopf J. Porous Coatings to Control Release Rates of Essential Oils to Generate an Atmosphere with Botanical Actives. Materials. 2022 Mar 15;15(6):2155. doi:10.3390/ma15062155

71. Rajput P, Nahar KS, Rahman KM. Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Positive Bacteria. Antibiotics. 2024 Dec 8;13(12):1197. doi:10.3390/antibiotics13121197

72. Zhydzetski A, Głowacka-Grzyb Z, Bukowski M, Żądło T, Bonar E, Władyka B. Agents Targeting the Bacterial Cell Wall as Tools to Combat Gram-Positive Pathogens. Molecules. 2024 Aug 27;29(17):4065. doi:10.3390/molecules29174065

73. Jubeh B, Breijyeh Z, Karaman R. Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches. Molecules. 2020 Jun 23;25(12):2888. doi:10.3390/molecules25122888

74. Tonco DC, Gavrilovici C, Lupu A, Pertea LI, Ioniuc I, Grudnicki A, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria - a narrative review. Front Cell Infect Microbiol. 2026 Aug 10;16. doi:10.3389/fcimb.2026.1877136

75. Rajagopal M, Walker S. Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. In. 2015. p. 1–44. doi:10.1007/82_2015_5021

76. Gauba A, Rahman KM. Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria. Antibiotics. 2023. doi:10.3390/antibiotics12111590

77. Ruhal R, Kataria R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. Microbiological Research. 2021. doi:10.1016/j.micres.2021.126829

78. Virolle C, Goldlust K, Djermoun S, Bigot S, Lesterlin C. Plasmid transfer by conjugation in gram-negative bacteria: From the cellular to the community level. Genes. 2020. doi:10.3390/genes11111239

79. Zhou G, Wang Q, Wang Y, Wen X, Peng H, Peng R, et al. Outer Membrane Porins Contribute to Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. Microorganisms. 2023. doi:10.3390/microorganisms11071690

80. Yuan G, Xia X, Guan Y, Yi H, Lai S, Sun Y, et al. Antimicrobial Quantitative Relationship and Mechanism of Plant Flavonoids to Gram-Positive Bacteria. Pharmaceuticals. 2022 Sep 27;15(10):1190. doi:10.3390/ph15101190

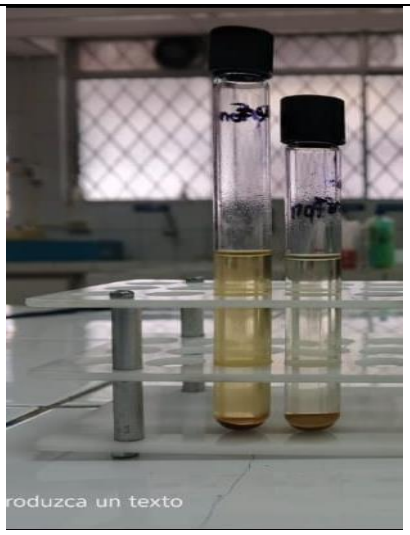
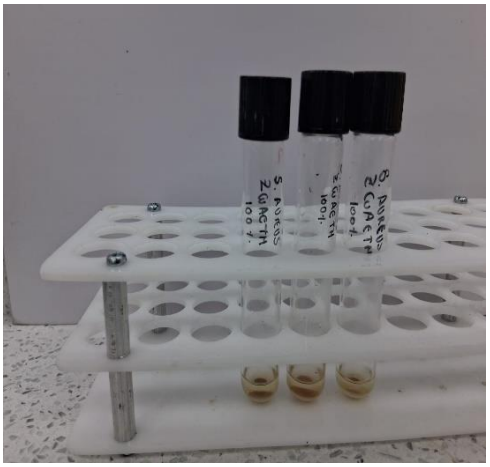
81. Guaya D, Espinoza LC, Jaramillo-Fierro X, Gualotuña Campoverde D, Sosa L, Calpena AC. Zinc-Modified Mordenite Zeolite as a Molecular Carrier for Donepezil: A Framework for Drug Delivery Applications. Molecules. 2025 Oct 24;30(21):4174. doi:10.3390/molecules30214174

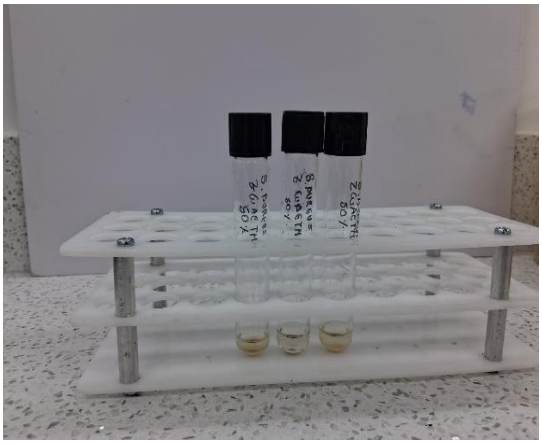
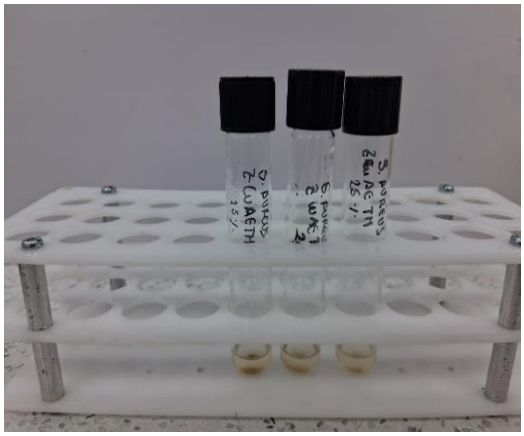
82. Hulankova R. Methods for determination of antimicrobial activity of essential oils in vitro-A review. Plants [Internet]. 2024;13(19):2784. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/plants13192784

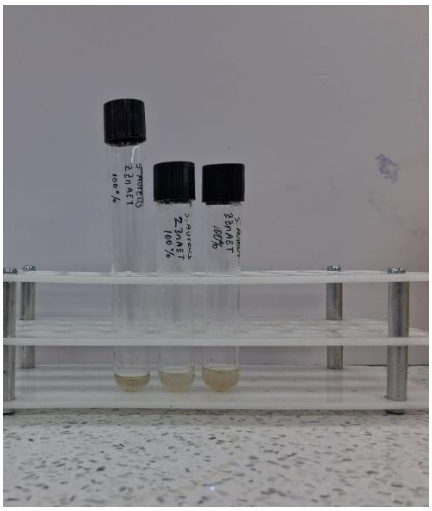
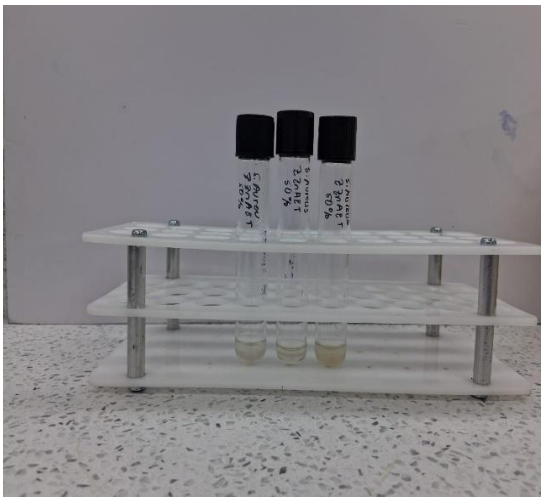
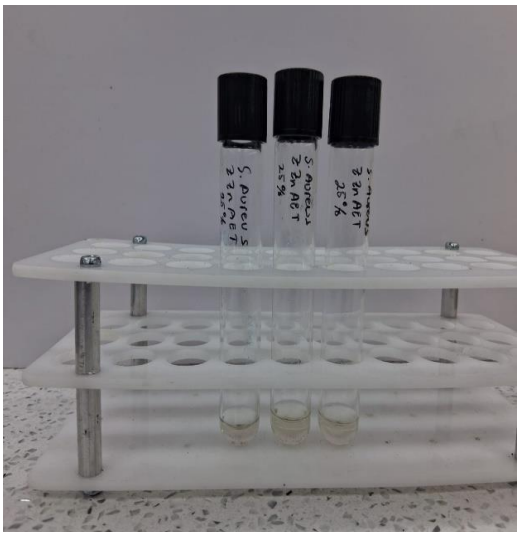
ANEXOS

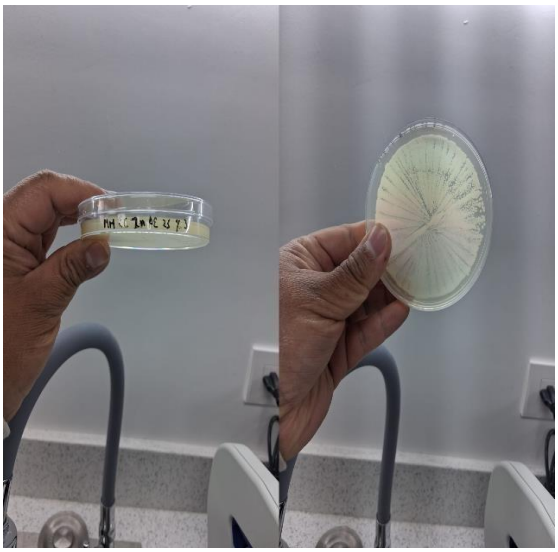
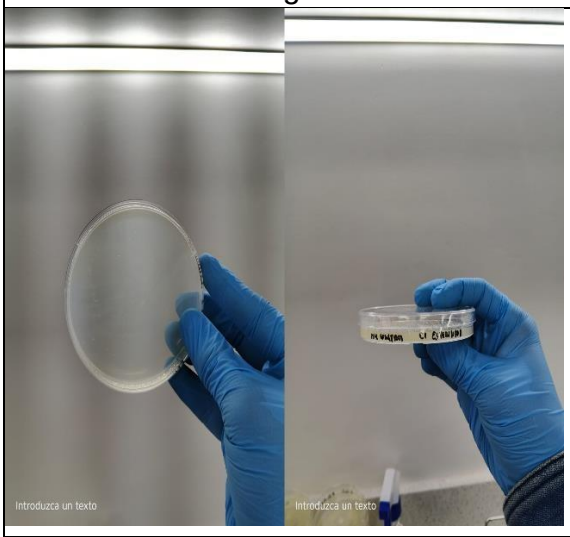
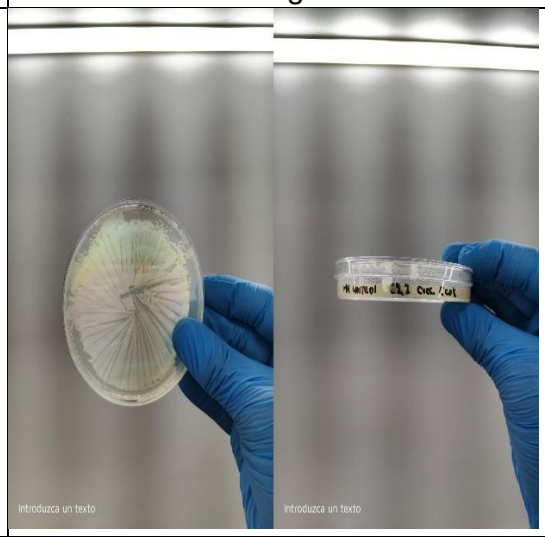
ANEXOS REQUERIDOS

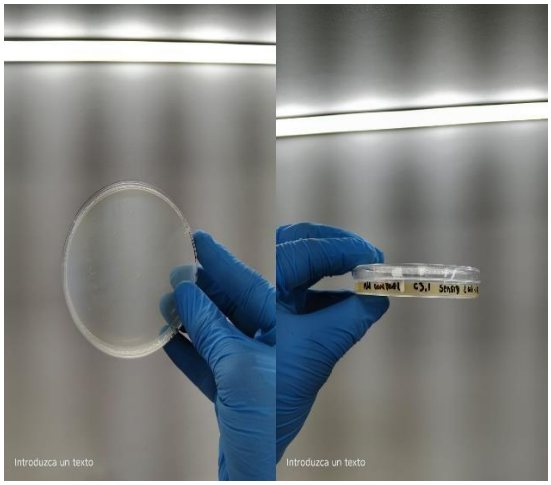
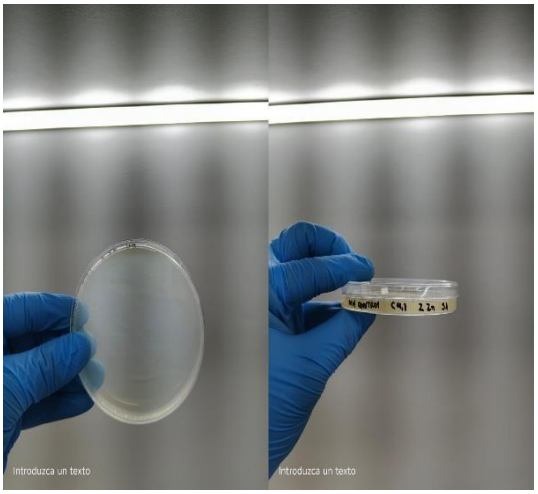
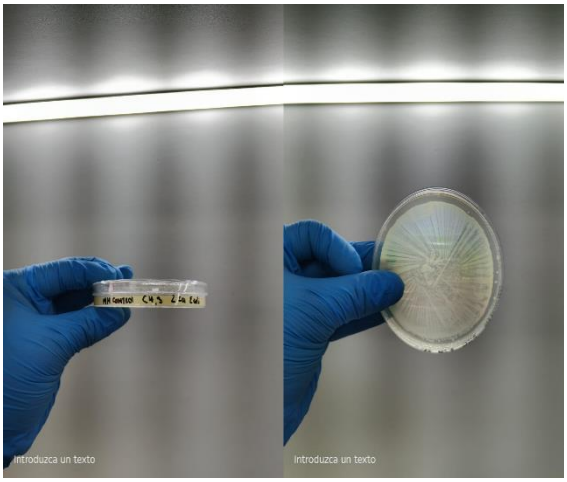
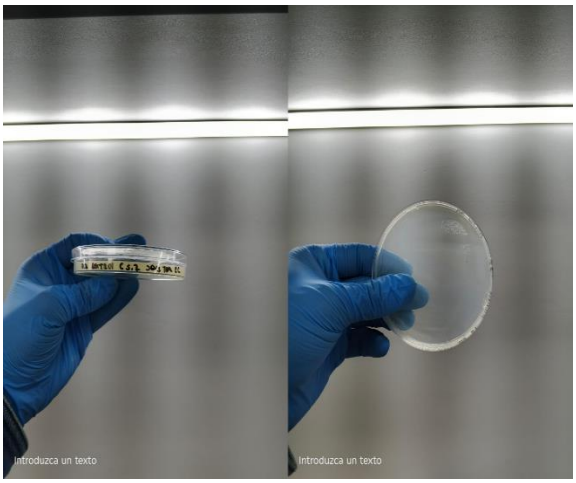
Procedimiento experimental

	
Anexo 1. *Tamización de zeolita (mordenita).*	**Anexo 2.** *Cargado de zeolita con aceite esencial.*
Autor: Leonardo Tigre. O	Autor: Leonardo Tigre. O
	
Anexo 3. *Preparación de escalas McFarland.*	**Anexo 4.** *CMI Resultado sin turbidez 100% del sistema sin turbidez, zeolita Ca++ con aceite de tomillo.*
Autor: Leonardo Tigre. O	Autor: Leonardo Tigre. O

	
Anexo 5. *CMI Resultado sin turbidez 50% del sistema sin turbidez, zeolita Ca++ con aceite de tomillo.*	**Anexo 6.** *CMI Resultado sin turbidez 25% del sistema con turbidez, zeolita Ca++ con aceite de tomillo.*
Autor: Leonardo Tigre. O	Autor: Leonardo Tigre. O

	
Anexo 7. *CMI Resultado sin turbidez 100% del sistema sin turbidez, zeolita Zn++ con aceite de tomillo.*	**Anexo 8.** *CMI Resultado sin turbidez 50% del sistema sin turbidez, zeolita Zn++ con aceite de tomillo.*
Autor: Leonardo Tigre. O	Autor: Leonardo Tigre. O
	
Anexo 9. *CMI Resultado sin turbidez 25% del sistema con turbidez, zeolita Zn++ con aceite de tomillo.*	**Anexo 10.** *CMB, zeolita al 100% con aceite esencial de tomillo, ausencia total de colonias.*
Autor: Leonardo Tigre. O	Autor: Leonardo Tigre. O

	
Anexo 11. *CMB, zeolita al 50% con aceite esencial de tomillo, ausencia total de colonias.*	**Anexo 12.** *CMB, zeolita al 25% con aceite esencial de tomillo, colonias incontables.*
Autor: Leonardo Tigre. O	Autor: Leonardo Tigre. O
	
Anexo 13. *Control esterilidad del medio.*	**Anexo 14.** *Control crecimiento de colonias.*
Autor: Leonardo Tigre. O	Autor: Leonardo Tigre. O

	
Anexo 15. *Control sensibilidad de bacterias frente a antibióticos.*	**Anexo 16.** *Control sensibilidad de bacterias frente a zeolitas cargadas cationicamente (Zn++) sin aceite esencial.*
Autor: Leonardo Tigre. O	Autor: Leonardo Tigre. O
	
Anexo 17. *Control sensibilidad de bacterias frente a zeolitas cargadas cationicamente (Ca++) sin aceite esencial.*	**Anexo 18.** *Control sensibilidad de bacterias frente a aceite esencial de tomillo solo.*
Autor: Leonardo Tigre. O	Autor: Leonardo Tigre. O

Universidad Católica de Cuenca

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Leonardo Fabian Tigre Orozco portador(a) de la cédula de ciudadanía N.º **0106631542**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **"Desarrollo y evaluación in vitro de un sistema zeolita–aceite esencial de *Thymus vulgaris* con actividad antimicrobiana frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*"** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **14 de octubre de 2026**

F: .....

Leonardo Fabian Tigre Orozco

C.I. **0106631542**

www.ucacue.edu.ec