



Universitatea POLITEHNICA din București  
Facultatea de Inginerie Chimică și Biotehnologii  
Departamentul de Știința și Ingineria Materialelor Oxidice și Nanomaterialelor



---

*TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT*

---

*Ambalaje biodegradabile antimicrobiene*

**Conducător științific:**  
Prof. Dr. Ing. Anton FICAI

**Doctorand:**  
Ing. Ludmila MOTELICA

**BUCUREȘTI**  
**2022**

**Cuvinte cheie:** Ambalaje antibacterian, biodegradabil, filme din alginat, filme din chitosan, ulei esențial de citronela, nanoparticule de oxid de zinc, nanoparticule de argint

## Cuprins

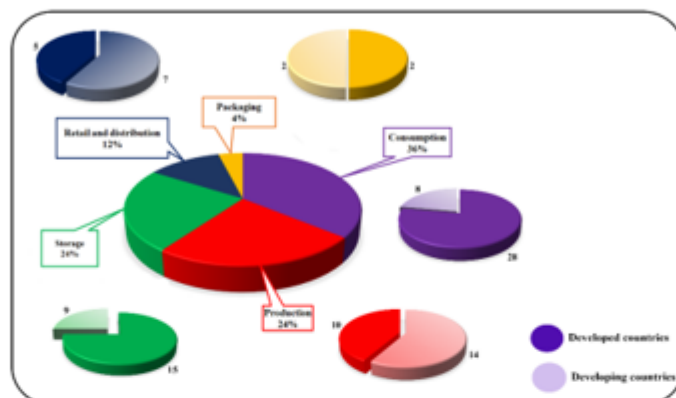
<b>Lista de abrevieri.....</b>	<b>1</b>
<b>MULTUMIRI .....</b>	<b>2</b>
<b>Introducere.....</b>	<b>3</b>
Scopul tezei de doctorat.....	5
<b>I. STUDIUL CRITIC AL DATELOR DIN LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
<b>Capitolul 1. Soluții active și inteligente de ambalare în industria alimentară.....</b>	<b>8</b>
1.1. Ambalarea activă și inteligentă .....	8
1.2. Ambalarea in atmosferă modificată (MAP) .....	11
1.3. Strategii de dezvoltare a ambalajelor antimicrobiene .....	13
1.4. Probleme de toxicitate .....	26
1.5. Concluzii .....	28
<b>II. CONTRIBUTII ORIGINALE .....</b>	<b>29</b>
<b>Capitolul 2. Materiale și Metode.....</b>	<b>30</b>
2.1 Materiale utilizate pentru sinteza nanoparticulelor de ZnO .....	30
2.2 Materiale utilizate pentru sinteza nanoparticulelor de argint .....	30
2.3 Materiale utilizate pentru fabricarea filmelor antimicrobiene pe bază de alginat/chitosan .....	31
2.4 Tehnici de caracterizare a materialelor sintetizate.....	32
<b>Capitolu 3. Obiectivele tezei și originalitatea.....</b>	<b>33</b>
<b>Capitolul 4. Studiu de literatură și articole.....</b>	<b>36</b>
4.1 Proprietăți optice, fotocatalitice și antibacteriene ale ZnO NPs obținute prin metoda solvotermală .....	36
4.2 Ambalaje inteligente pentru alimente concepute prin abordări nanotehnologice și livrarea substanțelor active.....	48
4.3 Ambalaje alimentare biodegradabile, antimicrobiene – tendințe și perspective .....	70
4.4 Ambalaj inovativ antimicrobian nanocompozit pe bază de chitosan/ZnO/Ag NPs/ulei esențial de citronela – potențiale aplicații în ambalarea strugurilor .....	107
4.5 Filme biodegradabile pe bază de alginat cu nanoparticule de ZnO și ulei esențial de citronela – o nouă structură antimicrobiană.....	133
4.6 Filme biodegradabile antimicrobiene pe bază de alginat cu nanoparticule de argint și ulei esențial de lămâiță – ambalaje inovatoare pentru brânză .....	157
<b>Capitolul 5. Concluzii generale .....</b>	<b>180</b>
5.1 Lista de publicații.....	186
5.2 Perspective .....	189
<b>BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>190</b>

## Listă de notații și abrevieri

A-Alginat  
AZ- Alginat/ZnO  
AA- Alginat/Ag  
AAZ- Alginat/Ag/ZnO  
ANOVA – Analiza varianței  
ATR – Atenuarea reflexiei totale  
C-Chitosan  
CZ – Chitosan/ZnO  
CA – Chitosan/Ag  
CZA – Chitosan/ZnO/Ag  
UEC – Ulei esențial de citronela  
CAI – Izocianat  
EDX - Spectroscopia de raze X cu dispersie în energie  
FDA – Agenția pentru alimente și medicamente  
FAO - Organizația pentru Alimentație și Agricultură  
FTIR – Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier  
GPS - Sistem de poziționare globală prin satelit  
GRAS – General recunoscut ca sigur  
HRTEM- Microscopie electronica de transmisie cu înaltă rezoluție  
LDPE – Polietilenă cu densitate mică  
LBL – Strat cu strat  
MAP – Atmosferă modificată  
NPs – Nanoparticule  
PVC – Policlorură de vinil  
PLA – Acid polilactic  
PCL - Policarprolactonă  
PVA – Alcool polivinilic  
PVP – Polivinil pirolidonă  
PET – Polietilenă tereftalată  
PEG – Polietilen glicol  
PE – Polietilenă  
PP – Polipropilenă  
PL – Fotoluminiscentă  
RFID - Identificarea prin radio frecvență  
SPB – Sulfopropil betaină  
SSA - Sulfosuccinic  
SEM – Microscopie electronică de baleiaj  
SAED – Difracție de electroni pe arie selectată  
TTIs - Indicatori de timp și de temperatură  
TEM – Microscopie electronică de transmisie  
TGA – Analiză termogravimetrică  
UV-Vis – Spectroscopie în Ultraviolet și Vizibil  
WVP – Permeabilitatea la vaporii de apă  
XRD – Difracție de raze

## Introducere

Datele statistice ale Organizației pentru Alimentație și Agricultură (FAO) a Națiunilor Unite prezintă o imagine îngrijorătoare cu privire la securitatea alimentară. Datele publicate indică faptul că aproximativ 33% din alimentele produse sunt irosite sau pierdute an de an din cauza expirării, modificărilor organoleptice sau din cauza degradării induse de activitatea bacteriană și fungică. Risipirea alimentelor la toate nivelurile (recoltare, depozitare, procesare și comercializare) este prezentată în Figura 1.



**Figura 1.** Risipă alimentară la toate nivelurile ciclului de viață

Gradul de pierdere a produselor variază în funcție de categoriile de alimente, fructele și legumele conducând cu aproximativ 45%, urmate de pește, fructele de mare și cerealele cu aproximativ o treime apoi de produse lactate și din carne cu o cincime din producția totală. Cauza principală care duce la aceste pierderi este oxidarea și alte procese de degradare generate de prezența diferitelor tulpini microbiene sau de prezența enzimelor. Pierderile nu sunt împărțite în mod egal între țări. Țările mai puțin dezvoltate nu au o infrastructură adecvată și acest lucru duce la pierderi de aproximativ 40% în timpul procesului de recoltare și imediat după. În același timp, aproximativ 40% din pierderi apar în faza de vânzare cu amănuntul în țările dezvoltate [1].

La nivelul consumatorului final se pierde cantități uriașe, deoarece se pune un accent exagerat pe aspectul extern [1]. În general, termenul „pierdere” indică fazele de producție sau procesare, în timp ce termenul de „risipă” implică lanțul de distribuție până la consumator [2, 3].

## Scopul tezei de doctorat

Rolul principal al ambalajelor în industria alimentară este de a proteja conținutul împotriva factorilor de mediu. Aici se pot include praful, vaporii de apă, bacteriile și fungii, dar și alte substanțe chimice nedorite care ar putea fi introduse în faza de procesare sau transport. Ambalajul trebuie să protejeze alimentele mai departe în faza de comercializare sau după cumpărare, la nivelul consumatorului final. În toate aceste etape, ambalajul trebuie să protejeze alimentele și să le păstreze în siguranță, fără o scădere a calității. Din aceste motive, materialele utilizate în industria ambalajelor ar trebui să fie sigure pentru alimente, inerte în condițiile menționate mai sus, cât mai ieftine posibil, ușor de manevrat și reciclat.

Prezenta cercetare aduce câteva soluții simple care oferă proprietățile dorite, cum ar fi activitatea antibacteriană sau antifungică a filmelor de ambalare. Astfel de proprietăți pot fi generate de către amestecurile polimerice utilizate pentru filmele de ambalare sau pot fi induse prin utilizarea suplimentară a unor agenți antimicrobieni. Astfel de agenți pot fi reprezentați de extractele naturale, cum ar fi uleiurile esențiale sau pot fi nanoparticule metalice (e.g. Ag) sau oxidice (e.g. ZnO). Combinarea mai multor agenți antimicrobieni precum nanoparticulele de argint și de oxid de zinc poate genera materiale compozite cu o activitate antimicrobiană mai puternică, datorită sinergismului componentelor. Activitățile antibacteriene și antifungice ale unui material de ambalare pot fi rezultatul unei acoperi de suprafață cu agenți antimicrobieni sau pot fi induse în masă, prin înglobarea substanțelor active în matricea polimerică

Studiile de cercetare care stau la baza acestei teze doctorale au avut ca obiectiv obținerea de ambalaje antimicrobiene, biodegradabile pe bază de chitosan sau alginat, cu activitate antimicrobiană sinergică generată de prezența nanoparticulelor de ZnO sau Ag încărcate cu ulei esențial de citronela (UEC).

Compoziția UEC este complexă și depinde de regiunea de recoltare, dar de obicei conține citronelol și citronelal, care împreună cu geraniolul formează cea mai mare parte a compoziției uleiului [32-34]. Uleiul esențial de citronela este considerat un biopesticid netoxic în SUA [36]. În plus, literatura de specialitate indică prezența unei activități antifungice puternică [37].

Un alt agent antimicrobian binecunoscut este reprezentat de nanoparticulele de argint (Ag NPs). Versatilitatea ridicată a acestor nanoparticule poate fi demonstrată din faptul că peste 600 de tulpini bacteriene sau fungice sunt inhibitate de acestea. Numeroase studii indică faptul că unele caracteristici fizice, cum ar fi forma sau dimensiunea nanoparticulelor de argint, influențează puternic activitatea antimicrobiană [38].

Activitatea antimicrobiană a oxidului de zinc este un subiect de intens dezbătut. Capacitatea antibacteriană este bine stabilită, dar în același timp capacitatea antimicrobicidă nu este foarte studiată [39]. Deoarece oxidul de zinc prezintă o activitate fotocatalitică puternică, capacitatea antimicrobiană este strâns legată de prezența luminii. Aceasta implică existența diferitelor specii reactive ale oxigenului (ROS). Concentrația speciilor și viteza de generare a ROS sunt responsabile pentru alterarea membranei celulare prin inducerea unui stres oxidativ. În afară de acest mod de acțiune, mai există și un alt mod, alternativ, prin care se manifestă activitatea antimicrobiană a ZnO, deoarece acesta prezintă activitate antimicrobiană și în absența luminii. Cel mai probabil această cale alternativă implică alterarea mecanică prin penetrare a membranei, internalizarea nanoparticulelor în celula microorganismului și distrugerea celulei microbiene [40].

Îmbunătățirea proprietăților mecanice ale filmelor de ambalare se obține prin utilizarea plastifiantilor. Glicerolul este una dintre substanțele utilizate pe scară largă ca plastifiant datorită compatibilității sale bune cu polizaharidele (precum alginatul, chitosanul și celuloza) [41]. O îmbunătățire a proprietăților mecanice ale filmelor de ambalare poate fi obținută prin reticularea lanțurilor polimerice cu ajutorul diferitelor nanoparticule, cum ar fi oxidul de zinc sau argintul. În timp ce un plastifiant precum glicerolul va acționa ca un distanțier între lanțurile polimerice și, prin urmare, va permite o trecere mai ușoară a moleculelor de apă, crescând permeabilitatea la vapori de apă (WVP), alte substanțe precum nanoparticulele de oxid de zinc sau extractele naturale uleioase sunt hidrofobe și astfel vor îmbunătăți proprietățile de barieră ale ambalajului [42-44]. Nanoparticulele sunt impermeabile față de apă, prin urmare se comportă ca o barieră solidă, forțând moleculele de apă, CO<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> sau O<sub>2</sub> să adopte o cale sinuoasă, labirintică mai lungă și greoaie [45, 46].

## I. STUDIU CRITIC AL DATELOR DIN LITERATURA

### Capitolul 1. Soluții active și inteligente de ambalare în industria alimentară

#### 1.1. Ambalaje active și inteligente

Rolul tradițional al ambalajului este de a prelungi termenul de valabilitate și de a proteja ca un scut inert alimentele de factorii externi. Următorul pas în evoluția industriei alimentare este ingineria ambalajului activ, care vine ca răspuns la cerințele tot mai mari ale clienților și ale societății moderne. Așadar, pentru a fi clasificat ca tip activ, ambalajul trebuie să îndeplinească unele funcții suplimentare în comparație cu cel tradițional, simplu. [47].



Figura 2. Funcții ale ambalajelor inteligente și active

Aceste tipuri de ambalaje pot fi împărțite în două categorii principale (Figura 2):

- ✚ Ambalajele active sunt cele care încorporează aditivi (sau aditivii sunt atașați ambalajului) care pot menține calitatea și pot prelungi durata de valabilitate a alimentului.
- ✚ Ambalajele inteligente sunt cele care monitorizează proprietățile alimentelor ambalate și aduc informații suplimentare, consumatorilor sau comercianților, cu privire la starea specifică a produsului. De exemplu, etichete RFID și microcipuri sau indicatori timp-temperatură (TTI) – Tabelul 1.

Pe lângă conținutul de apă, un alt factor important în timpul termenului de valabilitate al alimentelor este temperatura de depozitare. Variațiile de temperatură pot induce modificări în alimente și, prin urmare, pot modifica proprietățile și durata de valabilitate a acestora. TTI-urile reprezintă un instrument eficient în monitorizarea variației de temperatură în timp. TTI-urile sunt utilizate în principal pentru produse sensibile, congelate sau refrigerate[52].

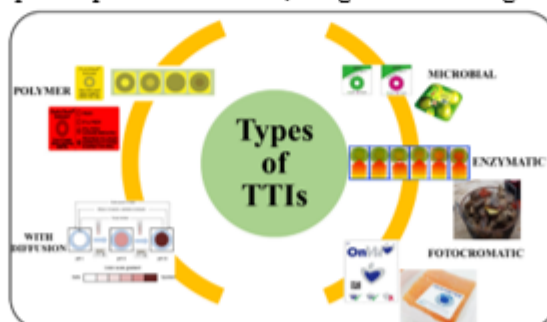


Figura 3. Tipuri de indicatori timp-temperatură (TTI)

TTI-urile oferă o indicație vizuală că istoricul condițiilor de depozitare a fost optim sau că timp produsul a fost expus la temperaturi mai ridicate [53]. Principiile de lucru ale unor astfel

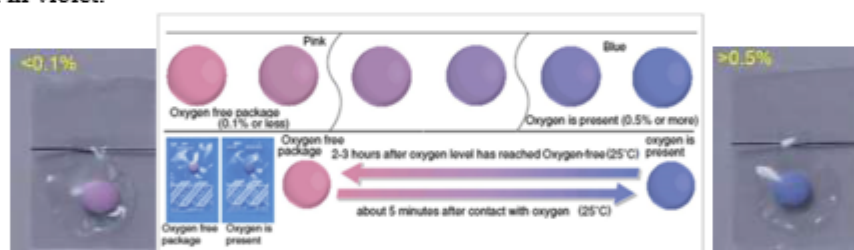
de indicatori se bazează pe identificarea răspunsurilor permanente în formă enzimatică, electronică, chimică, a nanoparticulelor sau generate de modificările sistemelor biologice în timpul expunerii la creșterea temperaturii (Figura 3) [20].

## 1.2. Ambalarea în atmosferă modificată (MAP)

Diverse procese de interacțiune pot modifica compoziția gazului din interiorul ambalajului, ceea ce poate afecta calitatea alimentelor. Producția de molecule gazoase, toxice, în interiorul ambalajului poate fi monitorizată prin diverși indicatori [62]. Monitorizarea modificărilor chimice produse în compoziția gazelor din interiorul ambalajului se realizează prin schimbarea culorii indicatorului înglobat în ambalaj, modificare generată de un proces enzimatic sau chimic. Prin ruperea sigiliului, eticheta devine activă și reacția începe, culoarea schimbându-se în timp [51].

Generarea de CO<sub>2</sub> în interiorul ambalajului este o soluție facilă care poate fi clasificată ca ambalaj activ. Aceasta este, de asemenea, o soluție antimicrobiană. Cantități ridicate de CO<sub>2</sub>, între 10 și 80% pot conserva produsele din carne de orice fel, prin scăderea proliferării bacteriene pe suprafața alimentelor și duce la prelungirea termenului de valabilitate [63].

Indicatorul Ageless-eye™ dezvoltat de Mitsubishi (Figura 5) poate fi utilizat pentru a monitoriza nivelul de oxigen dintr-o incintă. Dacă nivelul de oxigen este sub 0,1%, indicatorul este roz deschis. Dacă concentrația de oxigen crește peste 0,5%, indicatorul își schimbă culoarea în violet.



**Figura 5.** Indicatorul “Ageless-eye” pentru prezența oxigenului (peste nivelul de 0.5%) [66]

În concluzie, standardele din ce în ce mai ridicate, împreună cu progresul semnificativ realizat de oamenii de știință, au făcut posibilă dezvoltarea unor materiale avansate cu costuri reduse și performanțe mai bune. Aceste progrese pot fi observate în domeniul industriei alimentare. Este de remarcă faptul că în mod tradițional, materialele de ambalare a alimentelor au evoluat foarte mult, de la un material de blocare, inactiv, inert, la ambalajul modern, activ. Acest nou tip poate fi încărcat sau acoperit cu diferite nanostructuri sau antioxidanți sau chiar probiotice. Următorul pas natural este dezvoltarea de materiale hibride pentru ambalare, care prezintă mai multe moduri de a interacționa cu alimentele și pot prelungi durata de valabilitate, îmbunătățind în același timp calitatea produselor ambalate.

Prin introducerea în industria ambalajelor a nanomaterialelor, încărcate cu agenți antimicrobieni, se va realiza o optimizare a acestor caracteristici.

### 1.3. Strategii de dezvoltare a ambalajelor antimicrobiene

O clasificare simplă a materialelor antimicrobiene utilizate în industria ambalajelor va identifica două tipuri. Primul tip de materiale intră în contact intim cu suprafața alimentelor, deci există posibilitatea ca substanțele antibacteriene să migreze în alimente. De obicei produsele alimentare care sunt ambalate în vid se pot încadra în această categorie. Un al 2-lea tip de material, folosit pentru ambalarea alimentelor, nu are contact direct cu suprafața alimentului și aici putem da ca exemplu ambalajele cu atmosfera modificată [20, 51, 55].

Pentru cantități mai mari de alimente, vrac, (făină, zahăr, cartofi, fasole etc.) se preferă transportul în saci textili. În consecință, există cercetări pentru a produce țesături cu activitate antibacteriană și antifungică (care pot avea întrebuințări și în afara industriei alimentare, cum ar fi în industria textilă). Una dintre metodele menționate în literatură este tratarea pânzei de bumbac cu compuși care conțin grupări sulfopropilbetaină (SPB) și izocianat (CAI) (sub forma unor săruri de amoniu). Tratarea se realizează prin imersare într-o soluție urmată de un proces de uscare. Ambele grupări se pot lega de fibrele celulozice din pânza de bumbac prin interacțiuni covalente și îi conferă proprietăți bactericide și antifungice excelente (Figura 6).

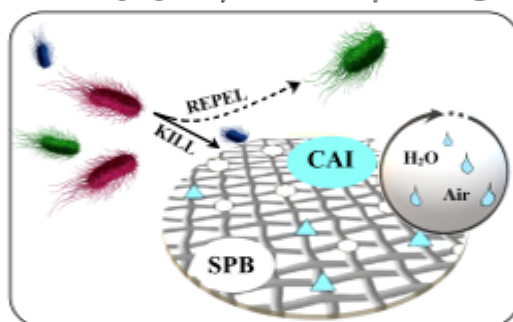


Figure 6. Ambalaj textil din bumbac tratat cu SPB/CAI, cu activitate bactericidă și antifungică bazată pe mecanismul sinergic al efectului „respinge-omoară”

Prin modificarea suprafeței materialelor utilizate în industria ambalajelor, se pot genera proprietăți antibacteriene și antifungice. Spre exemplu filmele din polietilenă (PE) și polipropilenă (PP) utilizate în mod normal în ambalajele alimentare se pot modifica prin depunerea sau încorporarea de agenți cu activitate bactericidă și antifungică.

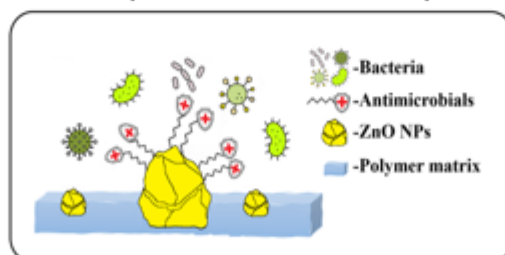
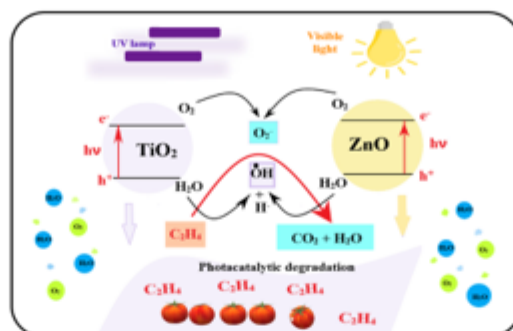


Figura 7. Modificarea unui film PE/PP cu nanoparticule încărcate cu agenți antimicrobieni naturali

Astfel, filmele din polipropilenă pot încorpora nanoparticule de argint sau oxizi metalici. Prin încărcarea nanoparticulelor cu agenți antibacterieni, cum ar fi uleiurile esențiale (Figura 7), se poate obține o activitate sinergică.



Un alt tip de nanoparticule încorporate în filmele din chitosan, care pot îmbunătăți proprietățile antibacteriene, este reprezentat de  $\text{TiO}_2$ .



**Figura 15.** Diagrama activării nanocompozitului CS-TiO<sub>2</sub>-ZnO pentru a oxida etilena prin expunerea la radiații UV și lumina vizibilă

Roșiile ambalate în filmele din CS-TiO<sub>2</sub> au suferit modificări minore față de cele ambalate în chitosan simplu sau față de proba de control (Figura 15). Rezultatele au sugerat că nanoparticulele de  $\text{TiO}_2$  încorporate în filmul de chitosan au activitate fotocatalitică și degradează etilena, întârziind procesul de coacere post-recoltare [97].

#### 1.4. Probleme de toxicitate

Majoritatea biopolimerilor utilizați pentru ambalajele inovatoare antibacteriene și antifungice sunt considerați siguri pentru uz uman, deoarece sunt, de asemenea, biocompatibili, iar unii dintre ei sunt comestibili. Printre aceștia celuloza, alginatul sau chitosanul sunt considerate GRAS de către FDA, la scară de micronică. Cantități mari din polimerii menționați mai sus pot prezenta unele efecte adverse. De exemplu, celuloza poate afecta flora microbiană a sistemului digestiv și poate diminua absorbția nutrienților [113-115].

Prin interacțiunea lor cu membrana celulară, nanoparticulele pot bloca creșterea biofilmului, dar pot fi, de asemenea, transferate în hrană și introduse în corpul uman, unde vor interacționa mai departe cu celulele noastre [116-119]. O anumită toxicitate a nanoparticulelor a fost dovedită pentru diferite organisme, iar îngrijorările legate de mediu își fac loc deja în unele rapoarte din literatură [120-122].

Unele extracte din plante și cu siguranță o mare varietate de uleiuri esențiale, au o puternică activitate antioxidantă și pot fi chiar folosite ca agenți antimicrobieni [32-34, 164]. În literatura de specialitate nu este raportată nicio toxicitate în cazul uleiurilor esențiale, la nivelul cantităților utilizate în ambalaje [165-167]. Singura problemă identificată este că, pe lângă inhibarea bacteriilor patogene, și o parte din flora benefică din sistemul digestiv ar putea fi afectată [168]. Folia de ambalare ar trebui însă să fie ingerată pentru a obține o astfel de concentrație.

În cazul uleiului esențial de citonela (UEC), componentele majore, împreună cu alți constituenți, sunt citronelol, citronelal și citralul [35, 169]. FDA consideră uleiul esențial de citonela un biopesticid, fundamental netoxic [36], cu o puternică activitate antibacteriană și antifungică [37, 170, 171].

## 1.5. Concluzii

În concluzie, diminuarea pierderilor alimentare poate fi realizată printr-o serie de strategii. Pe măsură ce educația și conștientizarea generează o presiune publică, autoritățile de reglementare acționează pentru acceptarea ambalajelor alimentare antibacteriene. Deoarece ne confruntăm și cu problema ecologică generată de utilizarea materialelor plastice, accentul principal cade pe implementarea de noi ambalaje realizate din polimeri biodegradabili. În acest fel se pot aborda ambele probleme, eliminarea poluării cu plastic și obținerea de ambalaje antimicrobiene. Principalii polimeri care se află în atenția cercetătorilor sunt cei care îndeplinesc anumite criterii precum abundență în natură, preț scăzut și lipsă de toxicitate.

Cu toate acestea, viitorul materialelor de ambalare biodegradabile cu proprietăți antibacteriene și antifungice va fi decis de presiunea consumatorilor și de organismele de reglementare. Filmele de ambalare biodegradabile ne vor aduce beneficiile unor alimente de o mai bună calitate și mai sigure.

## II. CONTRIBUȚII ORIGINALE

### Capitolul 2. Materiale și Metode

#### 2.1 Materiale utilizate pentru sinteza ZnO

Zn (Ac)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, puritate 99.9%, a fost achiziționat de la Merck. Butanolul 99,9% a fost obținut de la Sigma și utilizat așa cum a fost primit. Sinteza nanoparticulelor de oxid de zinc a fost realizată prin solvoliză forțată.

Pe scurt, 4,3900 g Zn (Ac)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O s-au dizolvat în 100 mL butanol și s-au menținut la 105°C sub agitare continuă. Precipitatul obținut, după 12 ore, a fost lăsat să se decanteze și apoi a fost spălat cu etanol și centrifugat de trei ori. Nanopulberea albă rezultată a fost uscată în etuva la 100-105°C.

#### 2.2 Materiale utilizate pentru sinteza Ag NPs

AgNO<sub>3</sub>, polivinilpirolidonă (PVP) și sarea de sodiu a acidului citric au fost achiziționate de la Merck. Nanoparticulele de argint au fost sintetizate prin metoda Turkevich.

Pe scurt, o soluție de 0,01 g AgNO<sub>3</sub> în 500 mL H<sub>2</sub>O a fost încălzită și s-a menținut la 70-75°C sub agitare magnetică. Peste această soluție, am adăugat prin picurare o soluție care conține 0,30 g sare de sodiu a acidului citric care a fost agentul de reducere.

O altă soluție care conține 0,1 g PVP a fost adăugată prin picurare după 40 de minute. În final, s-a obținut o soluție galbenă, care conține nanoparticule de argint într-o concentrație de ~100 ppm. Această soluție nu a necesitat o purificare suplimentară.

#### 2.3 Materiale utilizate pentru fabricarea filmelor antimicrobiene din alginat/chitosan

Alginatul de sodiu (CAS 9005-38-3) a fost achiziționat de la Fisher Scientific U.K. Ltd. (Redox Lab Supplies, București, România). Chitosanul (CAS 9012-76-4), soluția salină tamponată cu fosfat (PBS), sarea de sodiu a acidului citric, glicerina, agar și mediul de cultură au fost achiziționate de la Redox. Uleiul esențial de citronela (lămâiță) (UEC) a fost obținut de la Carl Roth.

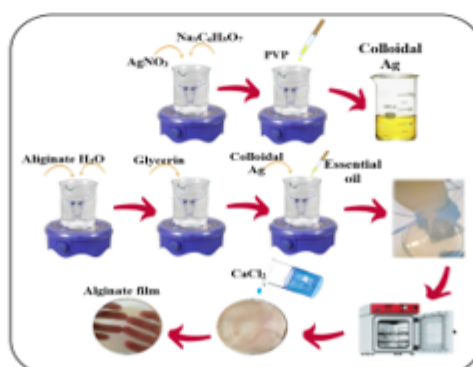


Figura 18. Obținerea filmelor de ambalare pe bază de alginat/Ag/UEC

Nanoparticulele de oxid de zinc au fost suspendate în 15 mL H<sub>2</sub>O și apoi combinate cu 1 mL UEC. Acest amestec a fost ultrasonat 15 min, apoi a fost adăugat la soluția polimerică.

1 mL UEC a fost adăugat la diferite volume de soluție de AgNPs și amestecul a fost supus ultrasonării timp de 30 de minute înainte de a fi utilizat pentru filmele de ambalare.

Pentru obținerea filmelor de ambalare polimerice s-a utilizat metoda turnării în forme. Pentru 0,33 g chitosan dizolvat în soluție de acid acetic 1% (v/v) și s-a adăugat 1 mL de glicerină. Suspensia de oxid de zinc sau soluția cu nanoparticule de argint a fost adăugată la acest amestec sub o agitare puternică.

Metoda de turnare în forme a fost utilizată pentru obținerea ambalajului pe bază de alginat. 1,5 g sare de alginat de sodiu au fost dizolvate în 50 mL H<sub>2</sub>O și lăsate la agitare 24h, împreună cu 1 mL de glicerină. La acest amestec am adăugat prin picurare soluția care conține nanoparticulele de argint/emulsionate cu UEC, sub agitare puternică.

Pentru turnarea filmelor a fost folosită un vas de tip Petri. Fiecare probă a fost ținută la 40°C timp de 24 de ore pentru uscare. Filmele uscate au fost imersate în 100 mL soluție de clorură de calciu 2 % timp de zece minute. La final, filmele polimerice au fost uscate și depozitate la 60 % RH și 20°C în pungi zip-lock.

## 2.4 Tehnici de caracterizare a filmelor obținute

Filmele de ambalare obținute au fost caracterizate folosind tehnici adecvate, acestea fiind prezentate în cele ce urmează:

### I. Spectrometrie -UV-Vis

Pentru înregistrarea spectrelor UV-Vis a fost folosit un spectrofotometru Able&Jasco V560 cu accesoriu pentru probe solide (sferă de integrare). Înregistrările au fost efectuate în intervalul 200-850 nm, cu o viteză de scanare de 200 nm/min.

### II. Spectrometrie de fluorescență

Spectrele de fluorescență au fost obținute cu un fluorimetru Perkin/Elmer LS55, în intervalul 350-600 nm, cu un filtru cut-off 350 nm și o viteză de înregistrare de 200 nm/min. Pentru excitare a fost folosită o lungime de undă de 320 nm de la o lampă Xe.

### III. Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

Spectrele FTIR au fost realizate folosind spectrometrul Nicolet iS50R. Înregistrările au fost făcute în condiții ambientale, folosind modulul ATR (reflexie totală atenuată), fiind efectuate 32 de scanări ale probelor între 4000 și 400 cm<sup>-1</sup>, la o rezoluție de 4 cm<sup>-1</sup>. Prelucrarea datelor au fost realizată folosind programul de lucru Omnic.

### IV. Microscopie FTIR

Hărțile FTIR au fost înregistrate folosind un microscop Nicolet iN10-MX. Acesta este un dispozitiv cu detector DTGS care furnizează informații cu o sensibilitate ridicată în intervalul 4000-100 cm<sup>-1</sup> și o unitate ATR cu cristal de diamant. Spectrele au fost înregistrate în modul iS 50 ATR în intervalul 400-4000 cm<sup>-1</sup>, cu o rezoluție de 4 cm<sup>-1</sup> prin însumarea a 32 de scanări pentru a îmbunătăți calitatea spectrelor.

#### V. Microscopie electronică de baleiaj

Microscopia electronică de baleiaj s-a utilizat pentru a evidenția aspecte legate de morfologia probelor sintetizate, respectiv dimensiunea particulelor. Achiziția de micrografii s-a făcut cu ajutorul unui microscop electronic de baleiaj de înaltă rezoluție, Inspect F50, la 30KeV, pentru diferite mărimi.

#### VI. Spectroscopie de raze X cu dispersie de energie (EDS)

Spectrele de împrăștiere a razelor X caracteristice diferitelor materiale obținute, s-au realizat prin utilizarea unui microscop electronic de transmisie cu înaltă rezoluție model Tecnai G2 F30 S-TWIN, respectiv un microscop electronic de baleiaj cu înaltă rezoluție, Inspect F50, ambele echipate cu detector EDS.

#### VII. Microscopia electronică de transmisie (TEM)

Obținerea imaginilor TEM pentru caracterizarea morfo-structurală a fost posibilă prin utilizarea unui microscop electronic de transmisie cu înaltă rezoluție model Tecnai G2 F30 S-TWIN echipat cu SAED, produs de FEI, utilizat la o tensiune de 300 kV și având rezoluția punctuală și cea de linie de 2 Å, respectiv 1 Å.

#### VIII. Difracția de raze X (XRD)

Analizele de difracție de raze X au fost efectuate folosind echipamente analitice PAN Empyrean în geometrie Bragg-Brentano echipate cu tub de raze X, folosind radiația  $K\alpha$  a Cu ( $\lambda K\alpha = 1,54\text{\AA}$ ) cu focalizare în line, slot divergent programabil pe partea incidentă și distribuitor programabil anti-fisurare montat pe detectorul PIXcel3D pe partea difractată. Difractogramele au fost achiziționate în intervalul de unghiuri  $2\theta$  10-80° cu un pas de achiziție de 0,2° și un timp de achiziție pe pas de 1 s. Analiza XRD a fost efectuată pentru a caracteriza materialele sintetizate din punct de vedere al cristalinității lor, precum și pentru a identifica fazele componente.

#### IX. Analiză termică

Analiza termică (TG/DSC) a fost efectuată cu un echipament Netzsch STA 449 C Jupiter, în intervalul de temperatură 20-900°C, cu o viteză de încălzire de 10 K/min, în atmosferă dinamică de aer (50 mL/min), în creuzeți din alumina deschisă creuzet.

#### X. Activitate biologică

Filmele obținute au fost caracterizate și din punct de vedere microbiologic, aspect important dacă sunt destinate industriei alimentare. Atât filmele obținute, cât și ingredientele au fost testate pe diverse tipuri de microorganisme, atât bacterii Gram-pozitive și Gram-negative, cât și fungi. Pentru testarea activității antimicrobiene s-au folosit tulpini de la Laboratorul de Microbiologie, al Facultății de Biologie, de la Universitatea din București.

#### XI. Permeabilitatea la vapori de apă - WVP

Valorile WVP au fost obținute prin utilizarea unor cupe de permeație cu rază de 25 mm sigilate cu filmele polimerice. Fiecare cupă conține 10 g de clorură de calciu anhidră. O incintă închisă menținută la 75% RH și 25°C a fost folosită pentru depozitarea cupelor. La intervale fixe de timp de 8 ore, cupele au fost cântărite.

### Capitolul 3. Obiectivele tezei și originalitatea

Rolul principal al materialelor de ambalare este protejarea alimentelor de factorii de mediu (umiditatea, praful, oxigenul sau microorganismele) care le pot contamina în timpul lanțului comercial. De-a lungul lanțului de distribuție, ambalajul trebuie să mențină siguranța și calitatea alimentelor. Polimerii utilizați în industria alimentară ar trebui să fie inerti, ieftini și ușor de reciclat.

Oxidul de zinc este unul dintre puținii compuși ai zincului recunoscuți ca siguri (GRAS) de către Administrația SUA pentru Alimente și Medicamente. Sinteza sa este raportată în literatură prin diverse metode, precum descompunerea termică [172], piroliza prin pulverizare [173], reacții solvotermale [174], hidroliză forțată [175], metoda sol-gel sau prin depunere chimică în fază de vapori (CVD) [176]. ZnO are multiple aplicații în diverse domenii, cum ar fi eliberarea țintită a medicamentelor [177, 178], produse cosmetice [179], are proprietăți astringente și antibacteriene ușoare și, prin urmare, este utilizat ca agent topic în eczeme și excoriații ușoare în răni și pentru hemoroizi [180].

Oxidul de zinc prezintă proprietăți antibacteriene binecunoscute, mecanismele de acțiune fiind multiple. Există unele dovezi că activitatea antibacteriană a ZnO depinde de dimensiunea nanoparticulelor și de prezența luminii, dar datele disponibile în literatură sunt contradictorii cu privire la tulpinile mai susceptibile: Gram-pozitive sau Gram-negative. Activitatea antimicrobiană în prezența luminii indică, de asemenea, că activitatea fotocatalitică poate sta la baza efectului antibacterian [153]. În timpul iradierii, nanoparticulele de ZnO produc specii reactive ale oxigenului (ROS) care sunt responsabile pentru activitatea fotocatalitică, dar și pentru stresul oxidativ, care deteriorează membrana bacteriană.

Unul dintre cei mai puternici agenți antibacterieni și antifungici este reprezentat de nanoparticulele de argint (AgNPs) [38, 181, 182]. Peste 600 de microorganisme (tulpini bacteriene, virale și fungice) sunt afectate de AgNP conform rapoartelor din literatură [183-185]. Principalele elemente care influențează activitatea antimicrobiană a AgNP-urilor sunt dimensiunea și forma, deoarece nanoparticulele mai mici, de formă triunghiulară, s-au dovedit mai active [38].

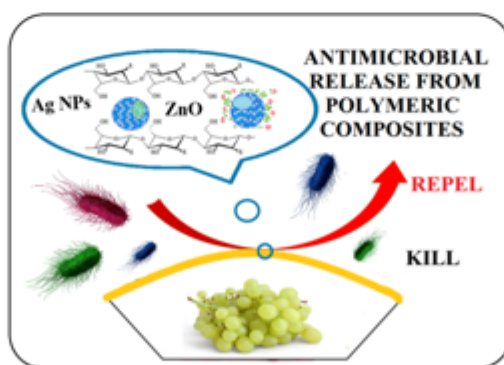


Figura 19. Activitatea combinată a filmului antimicrobian

În ultimii ani, s-a dovedit că extractele naturale, cum ar fi uleiurile esențiale, prezintă activitate antibacteriană, antifungică și antioxidantă, unele acționând chiar și ca insecticide naturale [32, 186-188]. Uleiul esențial de citrionelă –UEC– are o activitate antimicrobiană puternică, iar FDA îl consideră un biopesticid natural, netoxic [36]. Geraniolul, citrionelolul și citrionelalul sunt

constituenții principali [35]. Fiind de natură hidrofobă, adăugarea UEC la amestecul de polimeri va scădea WVP, îmbunătățind performanța ambalajului [42-44].

Prin utilizarea a doi sau trei agenți antimicrobieni, simultan, cum ar fi nanoparticulele de ZnO, Ag NPs și UEC, reprezintă o metodă de a îmbunătăți activitatea antimicrobiană generală a ambalajului, sinergia componentelor făcând necesară adăugarea unor cantități mai mici.

Pentru obținerea filmelor din chitosan a fost utilizată metoda de turnare în forme. 0,66 g chitosan au fost dizolvate în 100 mL soluție de acid acetic (1 %v/v) care a fost amestecată cu 2 mL de glicerină. După solubilizarea chitosanului, s-a adăugat sub agitare puternică o suspensie de oxid de zinc sau/și nanoparticule de argint cu UEC în rapoartele masice din Tabelul 2. După turnarea soluțiilor în vase Petri, acestea au fost introduse în etuvă la 40 °C timp de 24 de ore pentru uscare. Filmele au fost depozitate în pungi PE la 60 % RH și 20 °C.

Cantitățile de ZnO și Ag NPs pentru filmele CZA au fost alese astfel încât să se formeze două serii în care un component este păstrat constant și celalalt are procente variabile. Combinația de nanoparticule și UEC a fost aleasă în urma studierii literaturii de specialitate [189, 190]. Ca atare, cantitatea de oxid de zinc a crescut în seria CZA1-3, în timp ce cantitatea de nanoparticule de argint a fost menținută constantă. Pe de altă parte, oxidul de zinc a fost menținut constant și cantitatea de argint a fost crescută în seriile CZA4, CZA2 și CZA5. Pentru fiecare probă, cantitatea de UEC a fost aceeași, 1 mL.

**Table 2.** The chitosan–nanoparticles–citronella essential oil (CEO) films composition.

Sample Code	Chitosan (g in 100 mL of 1% (v/v) Acetic Acid)	ZnO NPs (g in 15 mL Water)	Ag NPs (mL Solution)	CEO (mL)
CZ1	0.66	0.165	0	1
CZ2	0.66	0.33	0	1
CZ3	0.66	0.66	0	1
CZ4	0.66	0.99	0	1
CA1	0.66	-	10	1
CA2	0.66	-	15	1
CA3	0.66	-	20	1
CA4	0.66	-	30	1
CZA1	0.66	0.33	15	1
CZA2	0.66	0.66	15	1
CZA3	0.66	0.99	15	1
CZA4	0.66	0.66	10	1
CZA5	0.66	0.66	30	1

Prin aceeași metodă de turnare s-au preparat și filmele din alginat cu cantitățile din tabelul 3. Nanoparticulele de oxid de zinc au fost suspendate în 10 mL H<sub>2</sub>O și după amestecarea cu 1 mL ulei de citronela soluția a fost supusă ultrasonării. Suspensia a fost adăugată peste o soluție obținută din 3 g alginat de sodiu în 100 mL H<sub>2</sub>O și s-a menținut sub agitare magnetică timp de o zi. Ca plastifiant s-au adăugat 2 mL de glicerină.

**Table 3.** The alginate–ZnO NPs–citronella essential oil (CEO) films composition.

Sample Code	Alginate (g in 100 mL Water)	ZnO NPs (g in 15 mL Water)	Glycerol (mL Solution)	CEO (mL)
A	3.00	0.00	2	0
AZ1	3.00	0.05	2	1
AZ2	3.00	0.10	2	1
AZ3	3.00	0.25	2	1
AZ4	3.00	0.50	2	1

Similar, s-au obținut filmele de alginat cu Ag NPs (Tabelul 4). O anumită cantitate de soluție care conține Ag NP a fost amestecată cu 1 mL UEC și a fost supusă în continuare ultrasonării timp de 15 minute înainte de a fi utilizată pentru a prepara compozițiile AAg1–AAg4. S-au adăugat 3 g de alginat într-un pahar de 100 mL apă și s-au lăsat să se dizolve timp de 24 de ore sub agitare. După aceea, s-au adăugat 2 mL de glicerol la soluția de alginat. O emulsie preparată anterior din Ag NPs și UEC a fost adăugată peste soluția de alginat, sub agitare puternică.

**Table 4.** The alginate–Ag NPs– citronella essential oil (CEO) films composition.

Sample Code	Alginate (g in 100 mL water)	Ag NPs (mL of 100 ppm Solution)	Glycerol (mL Solution)	CEO (mL)
A	3.00	0	2	0
AAg1	3.00	5.0	2	1.0
AAg2	3.00	10.0	2	1.0
AAg3	3.00	25.0	2	1.0
AAg4	3.00	50.0	2	1.0

Fiecare soluție a fost pusă într-un vas Petri și a fost lăsată să se usuce într-o etuvă timp de 24 de ore la 40 °C. Un film de control fără nanoparticule și UEC a fost pregătit în același mod. După uscarea filmului, s-au adăugat 200 mL soluție de CaCl<sub>2</sub> (0,2 M) la fiecare vas Petri și filmele au fost lăsate scufundate timp de 5 minute. Filmele au fost îndepărtate din vasul Petri și au fost depozitate în pungi de plastic la 20 °C și 60% umiditate relativă (RH).



## Capitolul 4. Studiu de literatură și articole

### 4.1 Filme biodegradabile antibacteriene pe bază de alginat cu nanoparticule de argint și ulei esențial de lămâiță – ambalaje inovatoare pentru brânză



nanomaterials



Article

## Antibacterial Biodegradable Films Based on Alginate with Silver Nanoparticles and Lemongrass Essential Oil–Innovative Packaging for Cheese

Ludmila Motelica <sup>1</sup>, Denisa Ficai <sup>1</sup>, Ovidiu-Cristian Oprea <sup>1,\*</sup>, Anton Ficai <sup>1,2</sup>, Vladimir-Lucian Ene <sup>1</sup>, Bogdan-Stefan Vasile <sup>1</sup>, Ecaterina Andronescu <sup>1,2</sup> and Alina-Maria Holban <sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Applied Chemistry and Material Science, University Politehnica of Bucharest, 060042 Bucharest, Romania; motelica\_ludmila@yahoo.com (L.M.); denisa.ficai@upb.ro (D.E.); anton.ficai@upb.ro (A.F.); vladimir.ene@gmail.com (V.-L.E.); vasile\_bogdan\_stefan@yahoo.com (B.-S.V.); ecaterina.andronescu@upb.ro (E.A.); alina.m.holban@bio.unibuc.ro (A.-M.H.)

<sup>2</sup> Academy of Romanian Scientists, 050045 Bucharest, Romania

<sup>3</sup> Microbiology & Immunology Department, Faculty of Biology, University of Bucharest, 077206 Bucharest, Romania

\* Correspondence: ovidiu.oprea@upb.ro or ovidiu73@yahoo.com; Tel: +40-214-023-986

**Abstract:** Replacing the petroleum-based materials in the food industry is one of the main objectives of the scientists and decision makers worldwide. Biodegradable packaging will help diminish the environmental impact of human activity. Improving such biodegradable packaging materials by adding antimicrobial activity will not only extend the shelf life of foodstuff, but will also eliminate some health hazards associated with food borne diseases, and by diminishing the food spoilage will decrease the food waste. The objective of this research was to obtain innovative antibacterial films based on a biodegradable polymer, namely alginate. Films were characterized by environmental scanning electron microscopy (ESEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and microscopy, complex thermal analysis (TG-DSC-FTIR), UV-Vis and fluorescence spectroscopy. Water vapor permeability and swelling behavior were also determined. As antimicrobial agents, we used silver spherical nanoparticles (Ag NPs) and lemongrass essential oil (LGO), which were found to act in a synergic way. The obtained films exhibited strong antibacterial activity against tested strains, two Gram-positive (*Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*) and two Gram-negative (*Escherichia coli* and *Salmonella Typhi*). Best results were obtained against *Bacillus cereus*. The tests indicate that the antimicrobial films can be used as packaging, preserving the color, surface texture, and softness of cheese for 14 days. At the same time, the color of the films changed (darkened) as a function of temperature and light presence, a feature that can be used to monitor the storage conditions for sensitive food.

**Keywords:** biodegradable; alginate film; antibacterial packaging; lemongrass essential oil; silver nanoparticles; edible packaging; cheese; time-temperature indicator (TTI)



**Citation:** Motelica, L.; Ficai, D.; Oprea, O.-C.; Ficai, A.; Ene, V.-L.; Vasile, B.-S.; Andronescu, E.; Holban, A.-M. Antibacterial Biodegradable Films Based on Alginate with Silver Nanoparticles and Lemongrass Essential Oil–Innovative Packaging for Cheese. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 2377. <https://doi.org/10.3390/nano11092377>

Academic Editor: Sabina Loriga

Received: 15 August 2021

Accepted: 8 September 2021

Published: 13 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

The majority of food packaging materials used at present are based on petrochemical products or cellulose, due to historical factors such as low cost or mechanical and barrier properties [1,2]. The pressure of environmental concerns will phase out the petroleum-based materials, which will increase the need for innovative, biodegradable polymeric packaging materials such as chitosan [3], alginate [4], cellulose [5], starch [6], pullulan [7], polylactic acid [8], etc. The need to decrease the food waste, and the desire to increase the food safety and to prolong the shelf life creates pressure on the food packaging industry to develop and adopt new antimicrobial materials [9–11]. Besides chitosan, none of these biopolymers present antimicrobial activity [12]. Therefore, various antimicrobial agents have to be mixed with the polymeric matrix to obtain the desired antibacterial or antifungal

activities [13]. Such innovative antimicrobial biodegradable materials can diminish the microorganisms' proliferation and thus will reduce the food spoilage, increase the shelf life, and help provide a better food quality [14–18].

Sodium alginate (A) belongs to the polysaccharides class, being the salt of alginic acid [19]. Usually, the source of alginate is the marine algae brown seaweed, which makes it acceptable for people with religious dietary restrictions [20]. Alginate is one of the most versatile polymers, being used in various applications from drug delivery systems [21], to environmental depollution [22], wound healing, and tissue engineering [23]. Alginate is considered GRAS (generally recognized as safe) by the US Food and Drug Administration, therefore is a natural choice for packaging materials [24,25]. It is water-soluble and can be easily functionalized [26]. Mechanical properties are enhanced by adding plasticizers, glycerol being the most common choice due to its superior compatibility with the polymeric matrix [27,28]. Antibacterial activity can be bestowed to the alginate by adding various nanoparticles such as ZnO [29], Ag [30], CuO [31], natural extracts [32–34], or other substances of pharmaceutical interest [35–37].

Silver nanoparticles (Ag NPs) are one of the most potent antimicrobial agents [38–40]. The literature reports at least 650 microorganisms, including viruses, along with bacteria and fungi, affected by Ag NPs [41–43]. The shape and size of Ag NPs are the main factors that influence the antimicrobial activity, the smaller, triangular nanoparticles being more potent [39].

Essential oils and other natural plant extracts present a huge potential as antioxidants, antimicrobials, and even as insect repellants [44–47]. Lemongrass essential oil (LGO) is considered a bio-pesticide in the US [48]. The major constituents are citronellal, geraniol, and citronellol [49]. As a hydrophobic extract, the LGO addition to the alginate film will also improve the water vapor permeability (WVP) performance of the polymeric matrix [50–52].

For the LGO, there is no reported toxicity at concentrations used, but concerns are expressed about the impact on beneficial gut microbiota [53,54]. The introduction of nanomaterials such as Ag NPs into food packaging presents some potential drawbacks, beside advantages such as antimicrobial activity or improved UV-barrier properties. It is mandatory to study the toxicity related to the use of metallic nanoparticles. One way to minimize the impact is to decrease the concentration level of Ag NPs in the packaging films. By combining Ag NPs antimicrobial activity with that of LGO, we demonstrate that very low concentrations of metallic nanoparticles can be used, while still maintaining a strong antibacterial activity.

The objective of this research was to obtain a biodegradable, antibacterial material that can be used as packaging for soft cheese (usually with a shelf life of 4 days at 4–8 °C). The literature presents a couple of alginate-base films, with Ag NPs, used as packaging for meat [55,56] or vegetables [57], but none for cheese. In addition, to the best of our knowledge, here we report for the first time the obtaining of the alginate–Ag NPs–LGO system. We used two antimicrobials, Ag NPs and LGO, in order to enhance the final antibacterial activity of films, while introducing smaller amounts of antibacterial agents. The films were characterized from physico-chemical point of view, and the antibacterial activity was determined against two Gram-positive (*Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*) and two Gram-negative (*Escherichia coli* and *Salmonella Typhi*) bacterial strains. The performed antibacterial test indicates that, while the film with the highest Ag NPs concentration exhibited the best antibacterial activity, the rest of films, with lower concentrations of Ag NPs, were still performing very well against tested bacterial strains. Therefore, combining the antimicrobial agents can be a successful strategy to decrease the amount of used substances, which limits their potential toxic activity against human organism.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Silver nitrate, polyvinylpyrrolidone (PVP), and sodium citrate were obtained from Merck. Sodium alginate (CAS 9005-38-3) was purchased from Fisher Scientific U.K. Ltd. (Redox Lab Supplies, Bucharest, Romania). Phosphate-buffered saline (PBS), sodium citrate, glycerol, nutrient broth, and agar were obtained from Sigma Aldrich (Redox Lab Supplies, Bucharest, Romania). Lemongrass essential oil (LGO) was purchased from Carl Roth (Amex-Lab, Bucharest, Romania). All the chemicals were used without any further purification.

The soft telemea cheese (S.C. Fabrica de lapte Brasov S.A., Halchiu, BV, Romania) was obtained from a local supermarket in Bucharest, Romania.

### 2.2. Synthesis of Silver Nanoparticles

AgNPs were synthesized as described in [58]. Briefly, 0.02 g  $\text{AgNO}_3$  was dissolved in 100 mL water under vigorous stirring at 70 °C. Then, 20 mL solution of 0.35 g sodium citrate was added dropwise as a reduction agent. After 30 min, a third solution (0.1 g PVP in 5 mL) was added dropwise. The yellow solution containing AgNPs (100 ppm) was used without further purifications.

### 2.3. Synthesis of Alginate/Ag/LGO Films

A certain amount of solution containing Ag NPs was mixed with 1 mL LGO and was sonicated further for 15 min before being used to prepare AAg1–AAg4 films (Table 1).

**Table 1.** The alginate–Ag NPs–lemongrass essential oil (LGO) films composition.

Sample Code	Alginate (g in 100 mL Water)	Ag NPs (mL of 100 ppm Solution)	Glycerol (mL Solution)	LGO (mL)
A	3.00	0	2	0
AAg1	3.00	5.0	2	1.0
AAg2	3.00	10.0	2	1.0
AAg3	3.00	25.0	2	1.0
AAg4	3.00	50.0	2	1.0

Alginate films were obtained by casting method. Shortly, 3 g alginate was added to a beaker of 100 mL water and left to dissolve for 24 h under stirring. Afterwards, 2 mL of glycerol was added to the alginate solution. A previously prepared emulsion of Ag NPs and LGO was added to the alginate solution, under vigorous stirring.

Each solution was put in a Petri dish and was left to dry in an oven for 24 h at 40 °C. A control film without Ag NPs and LGO was prepared in the same way. After drying, 200 mL  $\text{CaCl}_2$  solution (2%) was added to each Petri dish, and the films were left submerged for 10 min. Finally, the films were removed from the Petri dish and were stored in zip lock plastic bags at 20 °C and 60% relative humidity (RH) (Figure S1).

### 2.4. Characterization of Alginate Films

In order to investigate the films surface morphology and microstructure, scanning electron micrographs were obtained using an environmental scanning electron microscope VERSA 3D (ESEM, Thermo-Fisher, former FEI Company, Eindhoven, The Netherlands).

Bright Field and High Resolution a Transmission Electron Microscopy (BF-TEM, HR-TEM) images coupled with Selected Area Electron Diffraction (SAED) pattern were recorded using High-Resolution 80-200 TITAN THEMIS transmission microscope FEI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Fourier transform infrared spectra were recorded with a Nicolet iS50 FTIR spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

FTIR 2D maps were recorded with a Nicolet iS50R FTIR microscope (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

A Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) LS55 spectrometer was used to measure the photoluminescence spectrum (PL).

A JASCO V560 spectrophotometer (JASCO Inc., Easton, PA, USA) was used to measure the UV-Vis spectra. The opacity values were calculated as  $A_{600}/x = -\log T_{600}/x$ , where  $A_{600}$  is the absorbance at 600 nm,  $T_{600}$  is the fractional transmittance at 600 nm and  $x$  is the film thickness in mm. A higher opacity value indicates that the film is less transparent [59].

Thermal analysis, TG-DSC (thermogravimetry and differential scanning calorimetry), was performed with a STA 449C F3 apparatus, from Netzsch (Selb, Germany). The evolved gases were analyzed with a FTIR Tensor 27 from Bruker (Bruker Co., Ettlingen, Germany), equipped with a thermostated gas cell.

For the determination of water vapor permeability (WVP), we used permeation cups with a diameter of 30 mm, sealed with a sample film, as described in [60]. In each cup we placed 1 g of dried  $\text{CaCl}_2$ . The permeation cups were placed in a container at a temperature of 25 °C and 100% relative humidity. Their weight was measured at fix intervals (8 h) for four days.

The swelling capacity was determined as described in [61]. Shortly, square samples of  $\sim 3 \times 3$  cm were cut from the fresh films and were dried in a desiccator for 48 h. Once dried, the samples were weighed (0.2 mg) ( $W_0$ ), then placed in 200 mL water or phosphate buffer saline (PBS) to allow swelling. The samples were first weighed at 15 min intervals, then each 30 min for three hours, and finally at 24 h intervals for the next days as the maximum swelling capacities were attained. The Equation (1) formula for degree of swelling (D) was used to calculate the swelling ratio:

$$D = (W_t - W_0)/W_0 \quad (1)$$

The antibacterial activity was evaluated against two model Gram-positive (*Bacillus cereus* ATCC 13061 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) and two Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella enterica* Typhi ATCC 14023) bacteria, which are relevant in food bacterial contamination. The strains were maintained as glycerol stocks at  $-80$  °C. All experiments were designed and performed in triplicate.

To qualitatively screen the antibacterial effect of the obtained materials, we utilized an adapted diffusion assay, respecting the general rules exposed in the CLSI 2020 and in our recent study [62].

Cheese samples ( $\sim$ cubic shape with size of 2–3 cm) were packed in alginate and AAgl-AAg4 films and placed in a refrigerator ( $4$  °C  $\pm 1$  °C and 75% R.H.) for 14 days. Samples were weighed again after 14 days for the mass loss test. Weight loss was monitored by measuring the mass change of each sample, and was calculated as percentage lost from the initial mass. The pH was measured initially and after 14 days.

The results were statistically evaluated using the analysis of variance (ANOVA) performed with Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA), having installed the XLSTAT 2020.5.1 add-on. The Shapiro-Wilk test was used to check the normal distribution of the data; we assessed the homoscedasticity of the residuals by Levene's test; and the results were compared by Tukey's (HSD) test so that the pairs of films that differed in terms of statistical significance were revealed ( $p < 0.05$ ).

More details about specific conditions for each analysis are presented in the Supplementary Materials.

### 3. Results and Discussion

The samples were characterized by transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy and microscopy, UV-Vis and fluorescence spectroscopy, and thermal analysis TG-DSC. Water vapor permeability (WVP) and swelling behavior were also determined.

### 3.1. Transmission Electron Microscopy

The BF-TEM image presented in Figure 1 presents particles existing in the Ag NPs 100 ppm solution. They are round shaped, with a diameter of approximately 5 to 25 nm, having a bimodal distribution. The Ag NPs are highly crystalline, with bigger ones composed of 2–3 crystallites. Therefore, the large nanoparticles can be considered polycrystalline, while the smaller ones are monocrystalline. Similar distribution was reported before, for both laboratory synthesized and commercially available [63,64]. Most probably during grain formation, before adding the capping agent, some crystallites become agglomerate, thus larger nanoparticles grow along smaller ones.

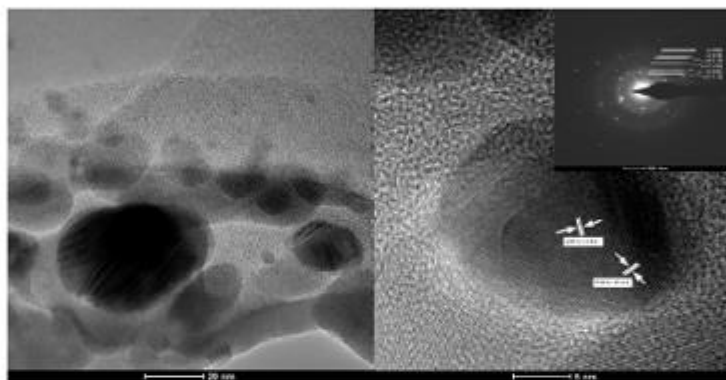


Figure 1. The TEM images for the obtained Ag NPs. Selected area electron diffraction (SAED) pattern in the inset.

The identified Miller indices in HR-TEM are the (111) corresponding to 2.36 Å distance. From SAED pattern, the only phase identified is that of FCC (face-centered cubic) silver, corresponding to the standard data JCPDS File No. 04-0783.

### 3.2. Environmental Scanning Electron Microscopy

According to the pressure–humidity–temperature diagram of the liquid–vapor phase equilibrium for water, the expected pressure in the working chamber at a temperature of 0.5 °C and humidity of ~8% is estimated at ~50 Pa [65]. Thus, the analysis chamber was prepared by performing vacuum purge cycles, between pressures of 30–150 Pa, to avoid contamination of samples with impurities from the atmosphere. In order to capture the microstructure of the specimen, without the detrimental interference of high-vacuum and high-voltage, the image acquisitions are made in low vacuum conditions (50 Pa), a temperature of 0.5 °C, a relative humidity of ~8%, at a beam voltage of 2 kV, with a working distance of about 8.3 mm. The surface of the films is presented in Figure 2.

The ESEM images show that with the increasing content of Ag from AAg1 to AAg4, the surface of the alginate films does not change in either morphology nor pore size distribution. The only noticeable difference resides in the fact that Ag aggregates are more disperse in the specimens that contain a higher amount of nanoparticles, without significantly affecting their size. This observation leads to the idea that during the nucleation and crystal growth of silver nanoparticles, the PVP surfactant is limiting the crystal growth and stabilizing the aggregate size. The alginate polymer in which the Ag NPs were dispersed does not contribute towards further noteworthy agglomeration of nanoparticles due to sterically stabilization of Ag NPs from the synthesis stage [66].

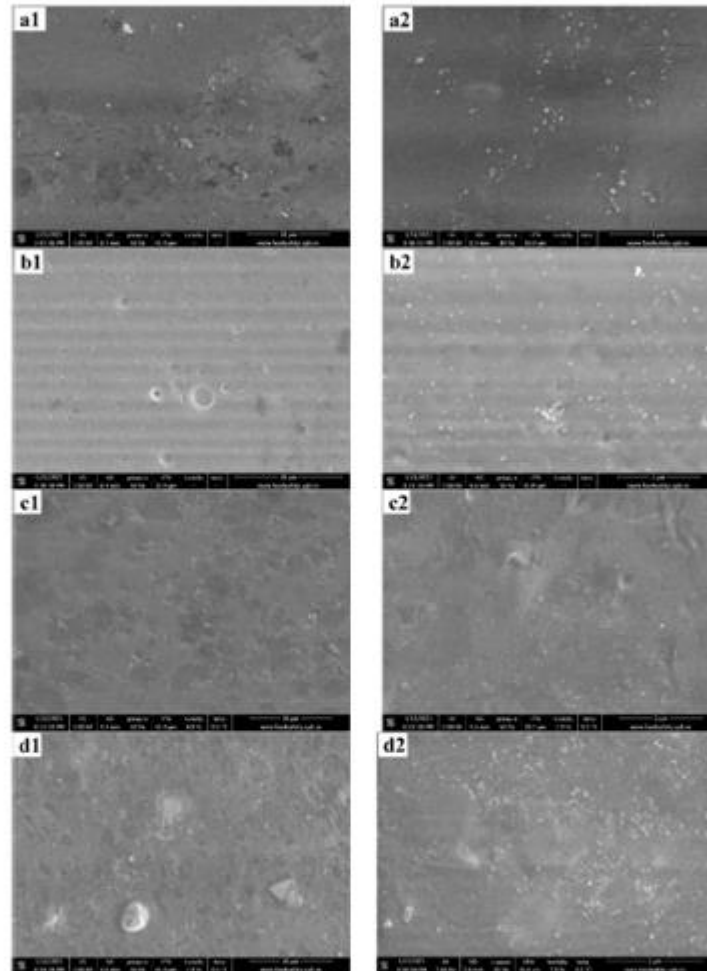


Figure 2. The ESEM micrographs for AA1 (a1,a2); AA2 (b1,b2); AA3 (c1,c2); and AA4 (d1,d2) films.

More insightful information was extracted from a film fracture, presented in Figure 3. The interior of the polymeric film shows spherical micropores of variable sizes. Most probably, their formation is related to the presence of LGO microdroplets dispersion into the alginate matrix. Moreover, inside the polymer pores, Ag NPs agglomerates are found at the surface, suggesting that there is a positioning preference of the agglomerates at the pore-material interface, rather than a homogenous distribution of the latter throughout the material volume.

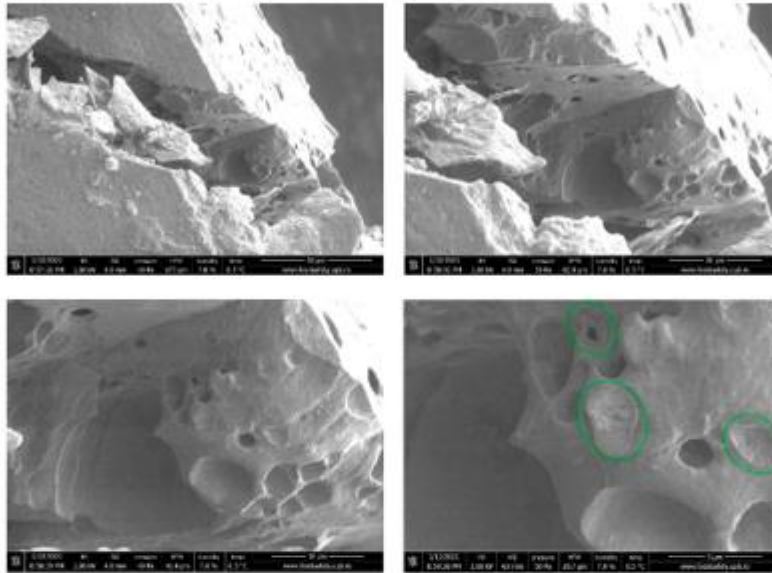


Figure 3. The near-fracture micrographs of AA<sub>g</sub>4 film. Ag NPs agglomerates inside pores.

The presence of such micropores will most probably have an impact on mechanical and barrier properties of the films. Although the extent at which the overall mechanical and barrier properties of the film are affected by the preferred positioning of Ag NPs agglomerates on the pore-material interface is questionable, pores themselves act as points of minimal resistance for the film.

### 3.3. FTIR Spectroscopy and Microscopy

#### 3.3.1. FTIR Spectroscopy

The effects induced by the Ag NPs and LGO addition to the alginate matrix were investigated by FTIR spectroscopy. The peaks corresponding to the main absorption peaks and the associated vibration modes are presented in Table 2. The broad band from the 3270–3287  $\text{cm}^{-1}$  corresponds to the presence of -O-H moiety from alginate and moisture as well.

Table 2. Assignment of relevant IR absorption bands of alginate (A) and AA<sub>g</sub>1–AA<sub>g</sub>4 films.

Sample/Assignment	A	AA <sub>g</sub> 1	AA <sub>g</sub> 2	AA <sub>g</sub> 3	AA <sub>g</sub> 4
$\nu_{\text{as}}\text{C-O-C}$	1031	1028	1027	1026	1027
$\nu_{\text{s}}\text{COO}^-$	1416	1408	1407	1409	1410
$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$	1596	1602	1600	1602	1604
C = O group of LGO [67]		1740	1738	1738	1739
$\nu\text{C-H (sat)}$	2921	2930	2925	2921	2921
$\nu\text{O-H}$	3278	3277	3270	3284	3287

The intense 2921–2930  $\text{cm}^{-1}$  peaks are attributed to the  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$  symmetric vibrations of the alginate, while small 3075  $\text{cm}^{-1}$  peak belongs to  $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$  symmetric vibration from LGO components. The 1027–1031  $\text{cm}^{-1}$  peaks were attributed to the glycosidic bond in the polysaccharide chain. The observed small shifts could indicate interactions between

alginate negative charged  $-COO^-$  groups and uncoated zones of Ag NPs surface or the interaction of Ag NPs with  $-C=O$  moiety of the pyrrolidone cycle from the PVP coating [68].

### 3.3.2. FTIR Microscopy

With the help of FTIR microscopy, we looked at spatial distribution of Ag NPs and LGO into the alginate matrix. The maps corresponding to the  $1740\text{ cm}^{-1}$  and  $1030\text{ cm}^{-1}$  are presented for the AAg1–AAg4 films in Figure 4, together with the microscopic view of the analyzed region.

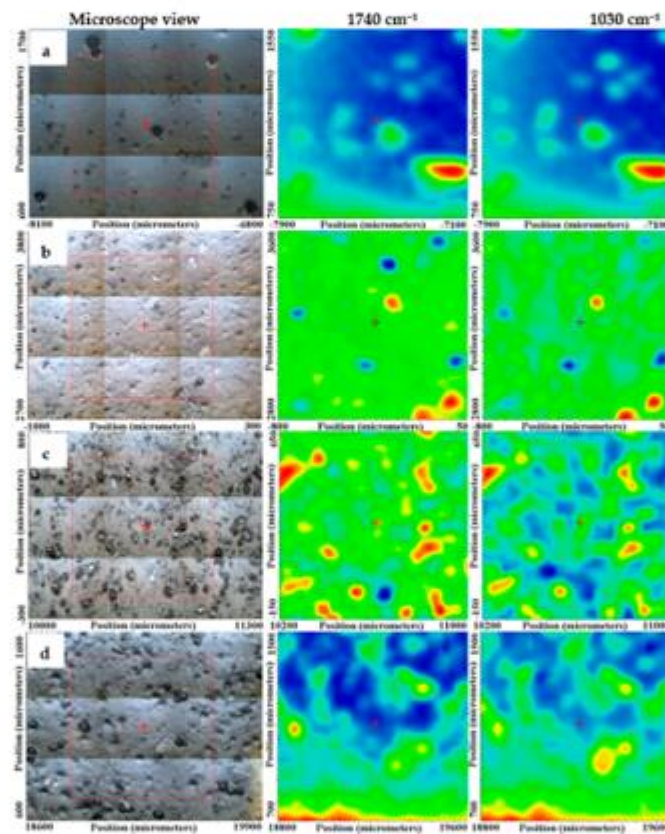


Figure 4. FTIR maps for the AAg1 (a); AAg2 (b); AAg3 (c); and AAg4 (d) films.

The FTIR maps at those two wavenumbers for AAg1 and AAg2 are quite similar, indicating a uniform distribution of the components in the analyzed area. The increase in Ag NPs quantity in AAg3 and AAg4 films generated some local accumulations, clusters, or defects such as pores, which induce a less homogeneous structure for these two samples, at a level of tens of  $\mu\text{m}$ , maximum. Nevertheless, even for these two samples, the FTIR maps are not so different, therefore the samples can be considered as having a good homogeneity.



### 3.4. UV-Vis and Fluorescence Spectroscopy

#### UV-Vis Spectroscopy

The UV-Vis spectroscopy is widely used for the Ag NPs characterization and synthesis monitoring as it is sensible to the presence of nanoparticles and gives information about their morphology and size uniformity. The absorption peak generated by the localized surface plasmon resonance is the main characteristic of the UV-Vis spectrum for Ag NPs [69]. It can be observed at wavelengths starting from 400 nm up to 600 nm depending on Ag NPs shape and size [70–72]. In addition, UV-Vis spectra can be used to monitor the stability of the Ag NPs suspension.

Our Ag NPs solution was proven stable over 3 months' storage, at room temperature, under dark conditions, the spectrum being virtually unchanged, with the band exhibiting the maximum absorption peak at 422 nm (Figure 5). This indicates that the Ag NPs are well capped by the IVP and do not agglomerate [73]. The peak broadness indicates that, although small, the size of nanoparticles varies, as seen also from TEM images, from 5 to 25 nm.

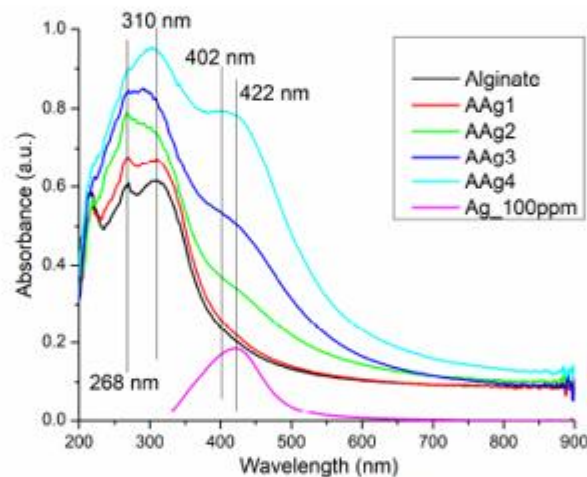


Figure 5. UV-Vis spectra for Ag NPs, alginate, and AAg1–AAg4 films.

The UV-Vis spectra for the alginate and AAg1–AAg4 films, presented in Figure 5, indicates the existence of a darkening effect in correlation with the increase in Ag NPs content. The AAg1 film has a marginally higher absorbance in UV region and is virtually identical with alginate film in the visible domain. For the AAg2–AAg4, the increased absorbance can be observed in the violet-blue region, which starts as a shoulder in the AAg2 sample, and develops into a separate broad band with the peak at 402 nm for AAg4. The presence of the 402 nm band can be assigned to the increasing concentration of Ag NPs (ten times higher in AAg4 than in AAg1).

The UV absorbance is also increasing with the Ag NPs content. Both UV and Vis light barriers are important features for food packaging, as a high absorbance will protect the critical nutrients (vitamins, lipids, or proteins) from photo-oxidation reactions promoted by high-energy photons. Different superscripts (a, b) in the last column are significantly different ( $p < 0.05$ ). Values are given as the mean  $\pm$  SD from triplicate determination.

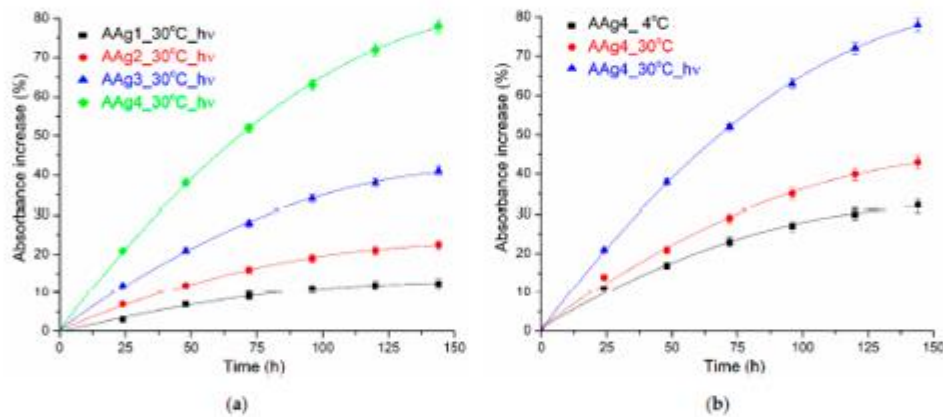
The incorporation of Ag NPs into the alginate film is increasing the opacity, but only marginally (Table 3), from  $0.48 \pm 0.02$  to a maximum of  $0.67 \pm 0.04$ , and therefore the alginate films can be considered transparent [74].

**Table 3.** Thickness and opacity for alginate (A) and alginate/Ag NPs/LGO (AAg1–AAg4) films.

Sample	Alginate	AAg1	AAg2	AAg3	AAg4
Thickness (mm)	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.35 ± 0.02
Opacity	0.48 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.04 <sup>b</sup>

Different superscript letters indicate statistically significant differences between films ( $p < 0.05$ ).

The AAg1–AAg4 films can become less transparent over time, depending on the storage conditions, e.g., temperature or light presence. As expected, a higher Ag NPs content will promote a large absorbance change (Figure 6a). Temperature change (4 °C vs. 30 °C) will also increase the absorbance change, but the presence of light has the highest impact on the film darkening (Figure 6b). The main reason for the changing of color is the oxidation of Ag NPs [75]. As the reaction rate will increase with the temperature, the samples stored at 30 °C will darken quicker than those stored at 4 °C. Similar reports are found in the literature [76,77]. This indicates that such films can be used as a time-temperature indicator (TTI) for storage conditions of food. Cumulative higher temperature and light (which for shelf food translate into exposure time) lead to a change of transparency, and therefore can indicate the freshness of packed food.



**Figure 6.** Color darkening (absorbance increase at 402 nm) for AAg1–AAg4 films: as function of Ag NPs content (a) and as function of temperature and light presence (b).

The Ag NPs are well known for their fluorescent properties. The literature reports different emission peaks in dependence on the excitation wavelength and Ag NPs morphology [78]. Usually, it is reported that the surface plasmon extinction peak is around 400 nm, while the fluorescent emissions at higher wavelengths are attributed to ultra-small Ag NPs (~5 nm) [79]. Here, we report Ag NPs that present the surface plasmon extinction peak at 368 nm, with a second emission band at 446 nm (Figure 7a). Surface plasmon related emission peaks under 400 nm have been reported in the previous literature, e.g., 384 nm [80], 375 nm [81], or 330 nm [78]. The broad visible emission band from 446 nm can be attributed to  $sp \rightarrow d$  radiative transitions due to Ag–Ag interactions. Similar shaped spectra, with surface plasmon emission placed in UV region accompanied by a broad visible emission peak in blue region are reported [78,82].

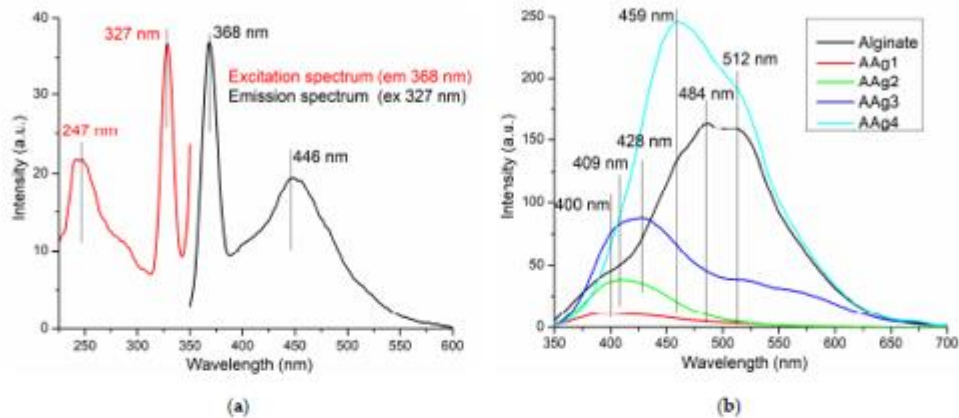


Figure 7. The fluorescence spectra for Ag NPs (a) alginate and AAg1–AAg4 films (b).

The fluorescence spectra for the alginate and AAg1–AAg4 films presented in Figure 7b, indicates the existence of Ag NPs–alginate interactions. The addition of a small quantity of Ag NPs in AAg1 sample leads to an emission band centered on 400 nm, much weaker than those corresponding to the Ag NPs or alginate. The interactions between Ag NPs and alginate polymeric chains are probably responsible for blocking the surface plasmon emission, but also for quenching the alginate fluorescence. Increasing the Ag NPs content of the composite films is generating a stronger and broader visible emission band, while the peaks are red-shifted towards 459 nm, with a shoulder at 512 nm.

This can be attributed to the existence of local Ag NPs agglomerations (as seen in ESEM images), which promotes Ag–Ag interactions, either directly or mediated by moieties of alginate. A similar effect of nanoparticles on alginate fluorescence was reported in [4].

### 3.5. Thermal Analysis TG/DSC–FTIR

The thermal analysis of alginate and AAg1–AAg4 samples indicates that the composite films have a lower thermal stability than the simple alginate one, the mass loss starting at low temperatures, i.e., under 100 °C (Figure 8).

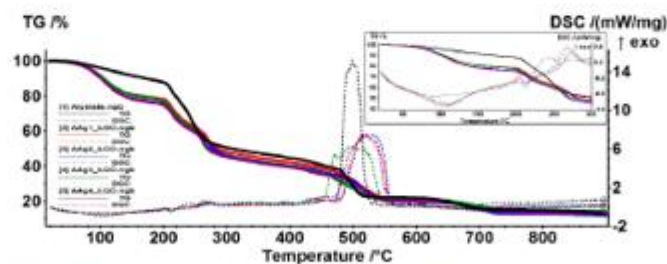


Figure 8. TG/DSC curves for alginate and AAg1–AAg4 films.

The alginate film starts losing mass at about 70 °C, most probably water, the process being accompanied on DSC curve by a weak endothermic effect with minimum at 93.2 °C. Up to 200 °C the sample is losing 12.14% of its initial mass.

The samples AA<sub>g1</sub>–AA<sub>g4</sub> present a larger mass loss up to 200 °C (22–25%), the corresponding endothermic effect being more intense and shifted towards higher temperatures (105–110 °C). This can be attributed to the elimination of various volatile compounds belonging to LGO incorporated into the alginate films, which means that approximately 10% of the sample mass is consisting of LGO. The hypothesis is sustained by the FTIR analysis of evolved gases. Figure 9, FTIR 3D plot vs. T (°C), reveals at low temperatures the presence of absorption bands around 3000 cm<sup>-1</sup> which are attributed to C-H vibration in various hydrocarbons, which can be attributed to elimination of LGO volatile components (Figure 9).

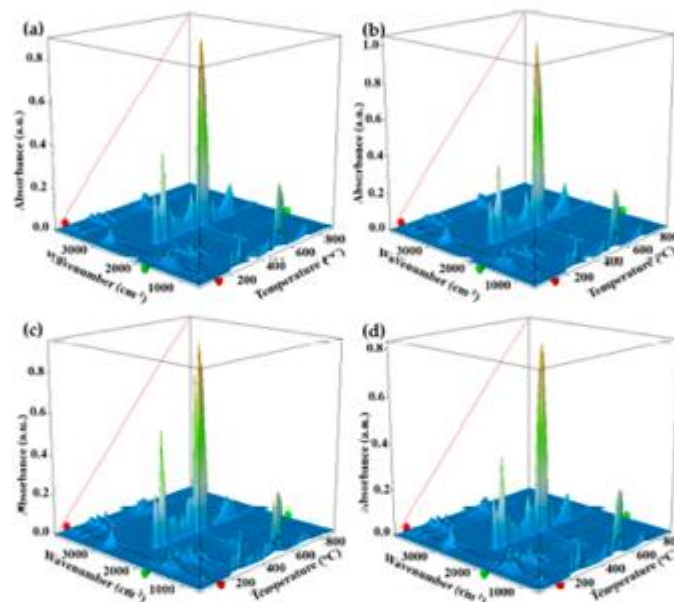


Figure 9. The 3D FTIR plot of evolved gases for AA<sub>g1</sub> (a); AA<sub>g2</sub> (b); AA<sub>g3</sub> (c); and AA<sub>g4</sub> (d).

The oxidation process of alginate matrix starts after 200 °C, when multiple exothermic effects, with low intensity, can be observed on DSC curve (inset of Figure 8). The FTIR profile for the absorption band from 2355 cm<sup>-1</sup>, corresponding to CO<sub>2</sub> elimination from sample (Figure 9), presents multiple peaks after 200 °C. Each peak corresponds to an oxidation process, the most intense being attributed to the burning of residual carbonaceous mass around 500 °C.

### 3.6. Water Vapor Permeability (WVP)

The barrier properties of alginate films are very important, as they must prevent the loss of flavor, water, or other volatile substances from the packed food [83]. The water vapor permeability (WVP) values best describe the moisture capacity to migrate between environment and food, through the packaging film. Microbial spoilage can be related to good moisture permeability. Therefore, it is important to determine the values for WVP (Table 4).

**Table 4.** Water vapor permeability for simple alginate and AAg1–AAg4 films.

Film Code	WVP ( $10^{-10}$ g/Pa·m·s)
A	$5.718 \pm 0.011^a$
AAg1	$2.753 \pm 0.042^b$
AAg2	$2.706 \pm 0.035^b$
AAg3	$2.696 \pm 0.024^b$
AAg4	$2.691 \pm 0.054^b$

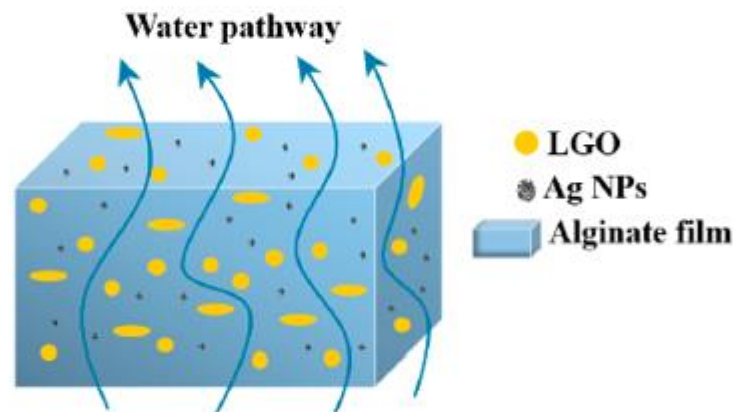
Different superscript letters indicate statistically significant differences between films ( $p < 0.05$ ).

The simple alginate film presented an average value for WVP when compared to similar reports [30,83]. The higher value can be explained by the glycerol addition, which generates hydrogen bonds with alginate and therefore increases the inter-chains distance, allowing moisture to penetrate easier [84].

Smaller values for WVP are obtained for the AAg1–AAg4 films, but they are not statistically different among them. This can indicate that the main cause for this decrease is the presence of LGO rather than the addition of Ag NPs. The clear hydrophobic nature of LGO generates micron and sub-micron drops inside the alginate films.

As thermal analysis data indicates, a large proportion of LGO is trapped inside the polymeric matrix (~10% w/w).

As such, the water molecules pathway becomes longer and obstructed by hydrophobic zones represented by LGO [85], which act as physical barriers [13,83] (Figure 10).

**Figure 10.** The proposed mechanism behind decrease in WVP values for AAg1–AAg4 films.

### 3.7. Swelling Study

The swelling behavior was assessed in PBS (pH = 7.4) and in distilled water. An increase in the swelling capacity with the increase in Ag NPs content can be observed in both cases (Table 5).

As the Ag NPs amount increased, the AAg1–AAg4 films have a higher capacity of water uptake. This increasing capacity can be related to the pores' dimensions at the microscopic level, and with the space between alginate chains at molecular level. The Ag NPs are stabilized with PVP. The presence of more silver nanoparticles and PVP can induce a wider gap between alginate chains, and therefore a higher water retention capacity. The pores can act as traps for water molecules. A higher pore density therefore can trap a larger water quantity (e.g., for AAg4 film).

Table 5. Swelling capacity (as mass increase in %) for the alginate and AAg1–AAg4 films.

Sample	Water PBS					
	0.25 h	0.5 h	1 h	2 h	3 h	24 h
A	42.54%	61.22%	86.14%	101.83%	104.69%	102.76%
	81.99%	182.05%	374.36%	595.63%	659.28%	741.75%
AAg1	61.12%	84.92%	103.67%	108.38%	105.53%	100.43%
	113.94%	276.24%	451.33%	556.02%	596.58%	564.89%
AAg2	82.97%	95.59%	108.65%	114.35%	119.33%	121.06%
	167.42%	347.91%	489.04%	589.77%	623.66%	704.31%
AAg3	110.13%	123.90%	130.79%	126.41%	128.91%	128.53%
	231.88%	454.65%	580.89%	647.52%	691.74%	675.24%
AAg4	136.47%	151.97%	162.90%	167.90%	169.77%	168.81%
	295.55%	549.36%	696.36%	719.23%	857.85%	799.79%

In water, the films were swelling close to maximum capacity in 2 h, with more than half of the water quantity being retained in first 15 min. The swelling increased slowly up to 3 h, further measurements indicating a weight stabilization (the measurement at 24 h is presented in Table 5, but the films were stable for 30 days).

The swelling study in PBS produced larger values for water retention capacity (up to six times higher than those obtained for water study).

This can be explained by the slow replacement of  $\text{Ca}^{2+}$  ions with  $\text{Na}^+$  ones, which leads to the destruction of the Ca-alginate “egg-box” structure. This leads to an increasing gap between polymeric chains and, as such, larger amounts of water can be retained. As the replacement of  $\text{Ca}^{2+}$  ions proceeds, the resulting sodium alginate will start to dissolve, therefore the sample will start to lose mass. At 72 h the films are completely disintegrated in PBS solution.

### 3.8. Antibacterial Activity

The results obtained for the AAg1–AAg4 films against four relevant food born infections bacterial strains, two Gram-positive (*S. aureus*; *B. cereus*) and two Gram-negative (*S. Typhi*; *E. coli*), indicate a strong antibacterial activity (Figure 11).

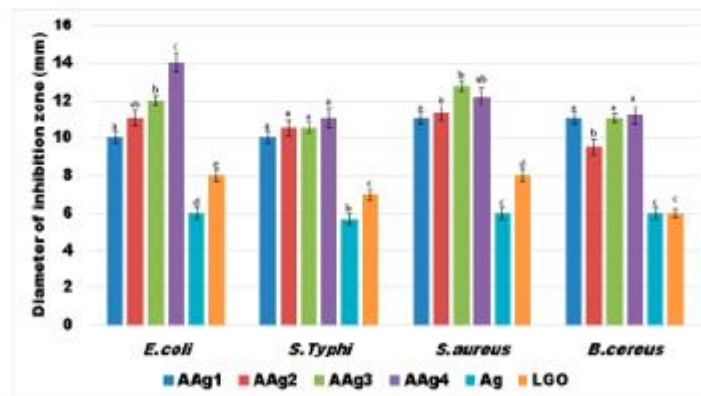


Figure 11. Measured growth inhibition diameters (mm) for the evaluated bacterial strains in the presence of AAg1–AAg4 films. Different small letters indicate statistically significant differences between films ( $p < 0.05$ ).

This suggests a large spectrum of antibacterial activity for the alginate films that contains both Ag NPs and LGO. As the simple alginate film exhibited no antibacterial activity, it is safe to assume that the strong antibacterial effect of AAg1–AAg4 films comes from Ag NPs combined with substances from the essential oil.

The results obtained suggest that growth inhibition is dependent of Ag NPs concentration in case of *E. coli* and *S. aureus*, the largest inhibition zones being observed for AAg3 and AAg4 samples, followed by AAg2 and AAg1 (Figure 11). In the case of *S. Typhi* and *B. cereus* the diameter of inhibition zone does not differ significantly among AAg1–AAg4 samples, but it has a consistently constant high value. This indicates that both Ag NPs and LGO act synergically, conferring a strong antibacterial activity.

LGO alone has a lower antibacterial effect, but in combination with Ag NPs the values for growth inhibition diameters are higher. The Ag NPs solution also presented a modest, constant value for the growth inhibition zone among all four tested strains. Therefore, the high values obtained for the antibacterial activity of AAg1–AAg4 suggest the existence of synergism between Ag NPs and LGO. The probable mechanism is related to the LGO changing the adenosine triphosphate concentration and hyperpolarization of the cell wall, and decreasing of the cytoplasmic pH [86,87], which in turn makes it easier for the silver ions released by the Ag NPs to damage the membrane and bind the proteins and enzymes [88], disrupting vital processes inside the cell.

Strong planktonic growth inhibition was observed in cases of *E. coli* and *B. cereus* (for AAg2–AAg4 films especially) indicating that the antibacterial compounds from LGO and Ag NPs could be released from the alginate polymeric matrix and affect the evolution of free bacterial cells (Figure 12). In cases of *S. Typhi* and *S. aureus* strains, the development of individual cells was also inhibited mostly by AAg3–AAg4 samples, suggesting a susceptibility to the presence of larger amounts of Ag NPs.

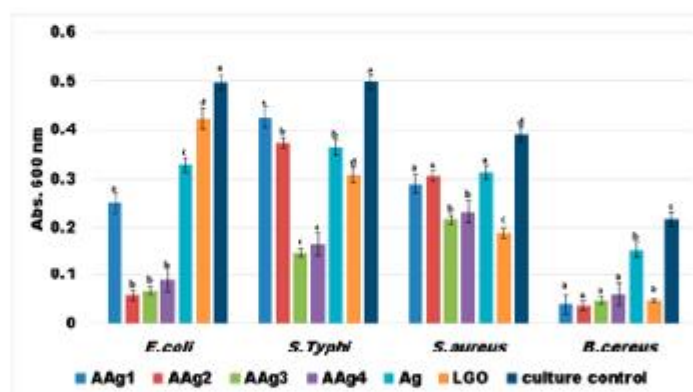


Figure 12. Absorbances at 600 nm indicating growth of planktonic cultures in the presence of AAg1–AAg4 films for 24 h at 37 °C. Different small letters indicate statistically significant differences between films ( $p < 0.05$ ).

Similar results were also obtained for the bacterial biofilm development and its attachment in the presence of AAg1–AAg4 films (Figure 13). The obtained data indicate that biofilm development is significantly reduced in the cases of *E. coli* and *B. cereus*. The *B. cereus* was again the most susceptible strain, as we saw in the case of planktonic growth. In the case of *E. coli* and *S. aureus*, a clear dependence of Ag NPs is evidenced, consistent with the results from growth inhibition diameter measurements.

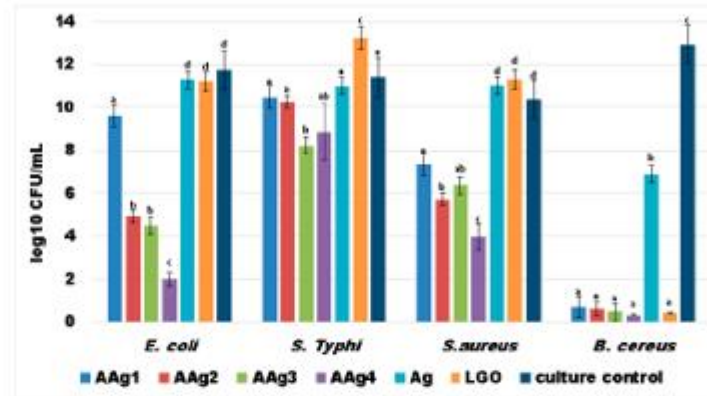


Figure 13. Values of log<sub>10</sub>CFU/mL for the tested bacterial strains, expressing biofilm embedded cells developed on control and AAg1–AAg4 films after 24h incubation. Different small letters indicate statistically significant differences between films ( $p < 0.05$ ).

Biofilm growth inhibition results, presented in Figure 13, indicate that the films are highly efficient towards Gram-positive *B. cereus* strain. A good antibacterial activity can also be observed for the other strains, especially for AAg4 sample. The samples with higher Ag NPs content exhibited best antibacterial activity, so we can state that biofilm growth inhibition is dependent of Ag NPs concentration. The results suggest that these films can be tailored to combat specific pathogens, depending on the desired application and susceptibility of microbial strains.

The literature indicates that Ag NPs present a stronger antibacterial activity against *S. aureus* than *E. coli* [89,90]. For the LGO, as well as the antifungal activity, a strong antibacterial activity against Gram-positive bacterial strains such as *B. cereus* is reported [16,91].

Our study has revealed that combining the two antibacterial agents, Ag NPs and LGO, a strong synergic antibacterial activity is obtained. The AAg1–AAg4 films are efficient against both types of pathogens, Gram-positive and Gram-negative, despite the former being usually more resistant due to its complex cellular wall [91,92].

### 3.9. Evaluation of Potential Use of AAg1–AAg4 Films as Food Packaging

Cheese is an important food made from casein, fat, and water. When it is not salted, uncontrolled and extensive development of microorganisms is contributing to cheese's short shelf life. Different cheese varieties need some bacterial cultures to be produced, and this creates an infection hazard from the cheese-borne species such as *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, or *Staphylococcus aureus* [4]. Samples of soft cheese of approximately 10.00–13.00 g were weighed and packed in alginate or AAg1–AAg4 films. The samples were stored for 14 days at  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 75% RH. After 14 days, the samples were visually checked, weighed, and the pH was measured. The cheese bits appearances (Figure 14), mass loss (Table 6), and pH data suggest that AAg1–AAg4 films can preserve cheese for up to 2 weeks.

The obtained results indicate that the cheese samples stored in AAg1–AAg4 films were better preserved comparatively with the control sample. The white, soft texture was maintained for samples packed in AAg1–AAg4 films, while the control sample changed its color and became harder. The control sample turned dark yellow due to spoilage microorganisms' growth. The sample packed in AAg1 film also presented some minor spoilage coloration on the edge, but the samples packed in AAg2–AAg4 films retained the



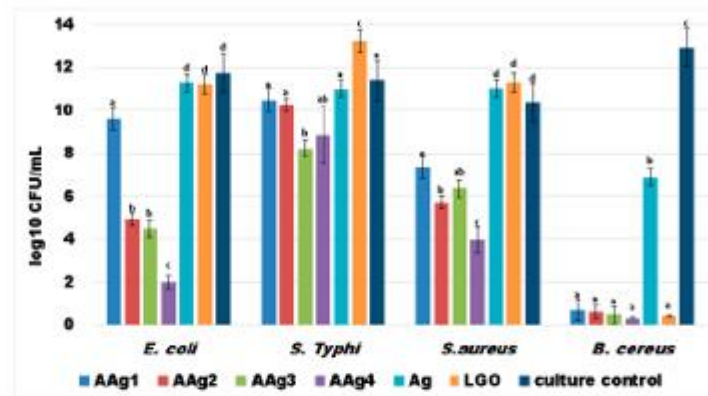


Figure 13. Values of  $\log_{10}$ CFU/mL for the tested bacterial strains, expressing biofilm embedded cells developed on control and AAg1–AAg4 films after 24h incubation. Different small letters indicate statistically significant differences between films ( $p < 0.05$ ).

Biofilm growth inhibition results, presented in Figure 13, indicate that the films are highly efficient towards Gram-positive *B. cereus* strain. A good antibacterial activity can also be observed for the other strains, especially for AAg4 sample. The samples with higher Ag NPs content exhibited best antibacterial activity, so we can state that biofilm growth inhibition is dependent of Ag NPs concentration. The results suggest that these films can be tailored to combat specific pathogens, depending on the desired application and susceptibility of microbial strains.

The literature indicates that Ag NPs present a stronger antibacterial activity against *S. aureus* than *E. coli* [89,90]. For the LGO, as well as the antifungal activity, a strong antibacterial activity against Gram-positive bacterial strains such as *B. cereus* is reported [16,91].

Our study has revealed that combining the two antibacterial agents, Ag NPs and LGO, a strong synergic antibacterial activity is obtained. The AAg1–AAg4 films are efficient against both types of pathogens, Gram-positive and Gram-negative, despite the former being usually more resistant due to its complex cellular wall [91,92].

### 3.9. Evaluation of Potential Use of AAg1–AAg4 Films as Food Packaging

Cheese is an important food made from casein, fat, and water. When it is not salted, uncontrolled and extensive development of microorganisms is contributing to cheese's short shelf life. Different cheese varieties need some bacterial cultures to be produced, and this creates an infection hazard from the cheese-borne species such as *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, or *Staphylococcus aureus* [4]. Samples of soft cheese of approximately 10.00–13.00 g were weighed and packed in alginate or AAg1–AAg4 films. The samples were stored for 14 days at  $4 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and 75% RH. After 14 days, the samples were visually checked, weighed, and the pH was measured. The cheese bits appearances (Figure 14), mass loss (Table 6), and pH data suggest that AAg1–AAg4 films can preserve cheese for up to 2 weeks.

The obtained results indicate that the cheese samples stored in AAg1–AAg4 films were better preserved comparatively with the control sample. The white, soft texture was maintained for samples packed in AAg1–AAg4 films, while the control sample changed its color and became harder. The control sample turned dark yellow due to spoilage microorganisms' growth. The sample packed in AAg1 film also presented some minor spoilage coloration on the edge, but the samples packed in AAg2–AAg4 films retained the

initial aspect, color, surface texture, and softness. This indicates that these antimicrobial films are capable of preserving the soft cheese and extending the shelf life.



Figure 14. Visual appearance of soft cheese bits packaged in alginate control film and AAg1–AAG4 films, initial and after 14 days storage at 4 °C and 75% relative humidity.

Table 6. Weight loss for cheese bits coated with alginate control and AAg1–AAG4 films during storage.

Sample/ Weight Loss (%)	A	AAG1	AAG2	AAG3	AAG4
14 days	39.32 ± 0.51 <sup>a</sup>	2.39 ± 0.21 <sup>b</sup>	2.31 ± 0.17 <sup>b</sup>	2.61 ± 0.26 <sup>b</sup>	2.55 ± 0.24 <sup>b</sup>

Different superscript letters in the same column indicate statistically significant differences between films ( $p < 0.05$ ).

The weight of the cheese samples was measured at the start and after 14 days of storage (Table 6). The samples packed in AAg1–AAG4 films presented a small mass loss, around 2.50% value, while the control sample lost 39.32%. This can be explained by the better barrier properties of the composite films, as seen in Section 3.6. The cheese eliminates water vapors, and with less hindrance from the simple alginate film, they are lost in surrounding environment.

Modification of the pH value for the cheese can indicate the presence of spoilage microorganisms. Therefore, the pH value was measured initially and after 14 days. For the samples packed in AAg1–AAG4 films, the value remained constant at 4.5. Similar constant values are reported in the literature when spoilage is absent [93]. For the control sample, the pH value dropped to 4.3, most probably due to growth and fermentation activity of microorganisms.

Nevertheless, a full study on the migration magnitude of Ag NPs to the food surface to assess the possible toxic effects is mandatory.

#### 4. Conclusions

Novel innovative biodegradable alginate films were obtained and characterized. A strong antibacterial activity was conferred by the addition of Ag NPs and lemongrass essential oil. The antimicrobial agents are shown to act in a synergic fashion, the AAg1–AAG4 samples presenting a large antibacterial activity spectrum, against both Gram-positive and Gram-negative strains, best results being obtained against *E. cereus*. The antibacterial films were tested as packaging for soft cheese, the preliminary test indicating a good capacity to preserve it up to 14 days. The light and water barrier properties of the alginate films were enhanced by the addition of LGO and Ag NPs. The films are transparent, but at 30 °C and in the presence of light they tend to darken, with the

absorbance increasing by up to 78% compared with those stored at 4 °C in the absence of light, where the absorbance increased only with max 32%, in a six day interval. This process can be used to monitor the storage conditions for sensitive food.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/xss/s1>, Materials and Methods. Figure S1: Preparation scheme for the alginate films with Ag NPs and LGO. Figure S2: XRD of obtained Ag NPs (JCPDS 04-0783) (a) and of AA4 film (b). Figure S3: TG / DSC curves for alginate (a); AA1 (b); AA2 (c); AA3 (d) and AA4 (e) films.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.F., A.F. and L.M.; methodology, L.M. and O.-C.O.; formal analysis, V.-L.E., A.-M.H., B.-S.V. and A.F.; investigation, V.-L.E., A.-M.H., B.-S.V. and D.F.; resources, E.A.; data curation, L.M.; writing—original draft preparation, L.M. and O.-C.O.; writing—review and editing, A.F.; supervision, D.F.; project administration, E.A.; and funding acquisition, O.-C.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by a grant of the Romanian Ministry of Research and Innovation, CCCDI—UEFISCDI, project number PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0689/PI. “Lib2Life—Revitalizarea bibliotecilor și a patrimoniului cultural prin tehnologii avansate” within PNCDI III. The APC was funded by University POLITEHNICA of Bucharest.

**Data Availability Statement:** The data is included in the main text and/or the supplementary materials.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

- Motelica, L.; Ficiu, D.; Ficiu, A.; Oprea, O.C.; Kaya, D.A.; Andronesu, E. Biodegradable Antimicrobial Food Packaging: Trends and Perspectives. *Foods* **2020**, *9*, 1438. [\[CrossRef\]](#)
- Motelica, L.; Ficiu, D.; Oprea, O.C.; Ficiu, A.; Andronesu, E. Smart Food Packaging Designed by Nanotechnological and Drug Delivery Approaches. *Coatings* **2020**, *10*, 806. [\[CrossRef\]](#)
- Radulescu, M.; Ficiu, D.; Oprea, O.; Ficiu, A.; Andronesu, E.; Holban, A.M. Antimicrobial Chitosan based Formulations with Impact on Different Biomedical Applications. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2015**, *16*, 128–136. [\[CrossRef\]](#)
- Motelica, L.; Ficiu, D.; Oprea, O.C.; Ficiu, A.; Trusca, R.D.; Andronesu, E.; Holban, A. Biodegradable Alginate Films with ZnO Nanoparticles and Citronella Essential Oil—A Novel Antimicrobial Structure. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1020. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lemnaru, G.-M.; Trusca, R.D.; Ilie, C.-I.; Tiplea, R.D.; Ficiu, D.; Oprea, O.; Stoica-Guzun, A.; Ficiu, A.; Ditu, L.-M. Antibacterial Activity of Bacterial Cellulose Loaded with Bacitracin and Amoxicillin: In Vitro Studies. *Molecules* **2020**, *25*, 4069. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wilpiszewska, K.; Antosik, A.K.; Schmidt, B.; Janik, J.; Rokicka, J. Hydrophilic Films Based on Carboxymethylated Derivatives of Starch and Cellulose. *Polymers* **2020**, *12*, 2447. [\[CrossRef\]](#)
- Li, S.B.; Yi, J.J.; Yu, X.M.; Wang, Z.Y.; Wang, L. Preparation and characterization of pullulan derivative/chitosan composite film for potential antimicrobial applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *148*, 258–264. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Conte, A.; Longano, D.; Costa, C.; Ditaranto, N.; Ancona, A.; Ciolfi, N.; Scrocco, C.; Sabbatini, L.; Conte, F.; Del Nobile, M.A. A novel preservation technique applied to fiordilatte cheese. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2013**, *19*, 158–165. [\[CrossRef\]](#)
- Gherasim, O.; Popescu, R.C.; Grumezescu, V.; Mogoanta, G.D.; Mogoanta, L.; Iordache, E.; Holban, A.M.; Vasile, B.S.; Birca, A.C.; Oprea, O.C.; et al. MAPLE Coatings Embedded with Essential Oil-Conjugated Magnetite for Anti-Biofilm Applications. *Materials* **2021**, *14*, 1612. [\[CrossRef\]](#)
- Dimulescu, I.A.; Nechifor, A.C.; Bardaca, C.; Oprea, O.; Pascu, D.; Totu, E.E.; Albu, P.C.; Nechifor, G.; Bungau, S.G. Accessible Silver-Iron Oxide Nanoparticles as a Nanomaterial for Supported Liquid Membranes. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1204. [\[CrossRef\]](#)
- Vasile, B.S.; Oprea, O.; Voicu, G.; Ficiu, A.; Andronesu, E.; Teodorescu, A.; Holban, A. Synthesis and characterization of a novel controlled release zinc oxide/ gentamicin-chitosan composite with potential applications in wounds care. *Int. J. Pharm.* **2014**, *463*, 161–169. [\[CrossRef\]](#)
- Gingasu, D.; Mindru, I.; Patraru, L.; Ianculescu, A.; Vasile, E.; Marinescu, G.; Preda, S.; Diamandescu, L.; Oprea, O.; Popa, M.; et al. Synthesis and Characterization of Chitosan-Coated Cobalt Ferrite Nanoparticles and Their Antimicrobial Activity. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2018**, *28*, 1932–1941. [\[CrossRef\]](#)
- Motelica, L.; Ficiu, D.; Ficiu, A.; Trusca, R.D.; Ilie, C.I.; Oprea, O.C.; Andronesu, E. Innovative Antimicrobial Chitosan/ZnO/Ag NPs/Citronella Essential Oil Nanocomposite-Potential Coating for Grapes. *Foods* **2020**, *9*, 1801. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhao, L.Y.; Duan, G.G.; Zhang, G.Y.; Yang, H.Q.; He, S.J.; Jiang, S.H. Electrospun Functional Materials toward Food Packaging Applications: A Review. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 150. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

15. Xing, Y.G.; Li, X.L.; Guo, X.L.; Li, W.X.; Chen, J.W.; Liu, Q.; Xu, Q.L.; Wang, Q.; Yang, H.; Shui, Y.R.; et al. Effects of Different TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Concentrations on the Physical and Antibacterial Activities of Chitosan-Based Coating Film. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1365. [CrossRef]
16. Viktorova, J.; Stupak, M.; Rehorova, K.; Dobiasova, S.; Hoang, L.; Hajšlova, J.; Thanh, T.V.; Tri, L.V.; Tuan, N.V.; Ruml, T. Lemon Grass Essential Oil does not Modulate Cancer Cells Multidrug Resistance by Citral-Its Dominant and Strongly Antimicrobial Compound. *Foods* **2020**, *9*, 585. [CrossRef] [PubMed]
17. Fleancu, M.C.; Olteanu, N.L.; Rogozea, A.E.; Crisciu, A.V.; Pincovski, L.; Mihaly, M. Physical-chemical parameters promoting phase changes in non-ionic environmental-friendly microemulsions. *Fluid Phase Equilib.* **2013**, *337*, 18–25. [CrossRef]
18. Sonseca, A.; Madani, S.; Rodriguez, G.; Hevilla, V.; Echeverria, C.; Fernandez-Garcia, M.; Munoz-Borilla, A.; Charef, N.; Lopez, D. Multifunctional PLA Blends Containing Chitosan Mediated Silver Nanoparticles: Thermal, Mechanical, Antibacterial, and Degradation Properties. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 22. [CrossRef]
19. Vizzini, P.; Beltrame, E.; Zanet, V.; Vidic, J.; Manzano, M. Development and Evaluation of qPCR Detection Method and Zn-MgO/Alginate Active Packaging for Controlling *Listeria monocytogenes* Contamination in Cold-Smoked Salmon. *Foods* **2020**, *9*, 1353. [CrossRef]
20. Kontominas, M.G. Use of Alginates as Food Packaging Materials. *Foods* **2020**, *9*, 1440. [CrossRef]
21. Chen, K.Y.; Zeng, S.Y. Preparation and Characterization of Quaternized Chitosan Coated Alginate Microspheres for Blue Dextran Delivery. *Polymers* **2017**, *9*, 210. [CrossRef]
22. Chang, Y.H.; Huang, C.F.; Hsu, W.J.; Chang, F.C. Removal of Hg<sup>2+</sup> from aqueous solution using alginate gel containing chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *104*, 2896–2905. [CrossRef]
23. Paduraru, A.; Ghitulica, C.; Trusca, R.; Surdu, V.A.; Neacsu, I.A.; Holban, A.M.; Birca, A.C.; Iordache, F.; Vasile, B.S. Antimicrobial Wound Dressings as Potential Materials for Skin Tissue Regeneration. *Materials* **2019**, *12*, 1859. [CrossRef] [PubMed]
24. Gheorghita, R.; Amariei, S.; Norocel, L.; Gutt, G. New Edible Packaging Material with Function in Shelf Life Extension: Applications for the Meat and Cheese Industries. *Foods* **2020**, *9*, 562. [CrossRef]
25. Gheorghita, R.; Gutt, G.; Amariei, S. The Use of Edible Films Based on Sodium Alginate in Meat Product Packaging: An Eco-Friendly Alternative to Conventional Plastic Materials. *Coatings* **2020**, *10*, 166. [CrossRef]
26. Gago, C.; Antao, R.; Dores, C.; Guerreiro, A.; Miguel, M.G.; Faleiro, M.L.; Figueiredo, A.C.; Antunes, M.D. The Effect of Nanocoatings Enriched with Essential Oils on 'Rocha' Pear Long Storage. *Foods* **2020**, *9*, 240. [CrossRef] [PubMed]
27. Fahmy, A.; Khafagy, R.M.; Elhaes, H.; Ibrahim, M.A. Molecular properties of polyvinyl alcohol/sodium alginate composite. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2020**, *10*, 4734–4739.
28. Mahcene, Z.; Khelil, A.; Hassi, S.; Akman, P.K.; Bozkurt, F.; Birech, K.; Goudil, M.B.; Tornuk, E. Development and characterization of sodium alginate based active edible films incorporated with essential oils of some medicinal plants. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *145*, 124–132. [CrossRef]
29. Fahmy, A.; Khafagy, R.M.; Elhaes, H.; Ibrahim, M.A. Molecular Modeling Analyses of Polyvinyl Alcohol/ Sodium Alginate/ ZnO Composite. *Egypt. J. Chem.* **2021**, *64*, 1149–1166.
30. Lan, W.T.; Li, S.Y.; Shama, S.; Zhao, Y.Q.; Sameen, D.E.; He, L.; Liu, Y.W. Investigation of Ultrasonic Treatment on Physicochemical, Structural and Morphological Properties of Sodium Alginate/AgNPs/Apple Polyphenol Films and Its Preservation Effect on Strawberry. *Polymers* **2020**, *12*, 2096. [CrossRef]
31. Saravanakumar, K.; Sathiyaseelan, A.; Mariadoss, A.V.A.; Hu, X.W.; Wang, M.H. Physical and bioactivities of biopolymeric films incorporated with cellulose, sodium alginate and copper oxide nanoparticles for food packaging application. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *153*, 207–214. [CrossRef] [PubMed]
32. Luo, Y.; Liu, H.Q.; Yang, S.Z.; Zeng, J.R.; Wu, Z.Q. Sodium Alginate-Based Green Packaging Films Functionalized by Guava Leaf Extracts and Their Bioactivities. *Materials* **2019**, *12*, 2923. [CrossRef] [PubMed]
33. Hammoudi, N.; Cherif, H.Z.; Borsali, E.; Benmansour, K.; Meghezzi, A. Preparation of active antimicrobial and antifungal alginate-montmorillonite/lemon essential oil nanocomposite films. *Mater. Technol.* **2020**, *35*, 383–394. [CrossRef]
34. Shabbazi, Y.; Shavisi, N. Effects of sodium alginate coating containing *Mentha spicata* essential oil and cellulose nanoparticles on extending the shelf life of raw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) filets. *Food Sci. Biotechnol.* **2019**, *28*, 433–440. [CrossRef] [PubMed]
35. Trapani, A.; Corbo, F.; Agrimi, G.; Ditaranto, N.; Cioffi, N.; Perna, F.; Quivelli, A.; Stefano, E.; Lunetti, P.; Musella, A.; et al. Oxidized Alginate Dopamine Conjugate: In Vitro Characterization for Nose-to-Brain Delivery Application. *Materials* **2021**, *14*, 3495. [CrossRef]
36. Sportelli, M.C.; Longano, D.; Bonerba, E.; Tantillo, G.; Torsi, L.; Sabbatini, L.; Cioffi, N.; Ditaranto, N. Electrochemical Preparation of Synergistic Nanoantimicrobials. *Molecules* **2020**, *25*, 49. [CrossRef]
37. Tsirigotis-Manecka, M. Alginate-, Carboxymethyl Cellulose-, and kappa-Carrageenan-Based Microparticles as Storage Vehicles for Cranberry Extract. *Molecules* **2020**, *25*, 3998. [CrossRef]
38. Pica, A.; Guran, C.; Andronescu, E.; Oprea, O.; Ficai, D.; Ficai, A. Antimicrobial performances of some film forming materials based on silver nanoparticles. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* **2012**, *14*, 863–868.
39. Nedelcu, I.A.; Ficai, A.; Sonmez, M.; Ficai, D.; Oprea, O.; Andronescu, E. Silver Based Materials for Biomedical Applications. *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18*, 173–184. [CrossRef]

## Capitolul 5. Concluzii generale

Creșterea bacteriilor și fungilor, specii patogene care strică cantități mari de alimente, poate fi controlată prin crearea și dezvoltarea ambalajelor antibacteriene și antifungice. Un rol important în prelungirea termenului de valabilitate și siguranța alimentelor este rezervat acestor ambalaje active. Rezultatele prezentei teze de doctorat, dar și studiile din literatură susțin concluzia că ambalajele antimicrobiene prelungesc faza de latență și scad viteza de proliferare a microorganismelor, sporind calitatea și îmbunătățind siguranța alimentelor, prelungind și durata de valabilitate. Introducerea de agenți antimicrobieni în filmul polimeric pentru ambalarea alimentelor, inhibă dezvoltarea bacteriilor și fungilor și, în consecință, prelungeste durata de valabilitate a alimentelor.

Stadiul cercetărilor în domeniu a fost documentat pe baza mai multor sute de lucrări din literatura de specialitate. În urma acestui studiu au fost publicate două recenzii extinse, una dintre ele în *Coatings* (Q2) având 148 de referințe și a doua în *Foods* (Q1) având 289 de referințe. Alături de cele două recenzii, au fost publicate 4 lucrări originale în reviste ISI și aceste lucrări au fost susținute de ~290 referințe adiționale. Pe baza unei cercetări atât de cuprinzătoare de literatură, teza de doctorat a continuat cu implementarea informațiilor dobândite și cu dezvoltarea de soluții noi, inovatoare. Filmele compozite de ambalare realizate sunt bazate pe polimeri biodegradabili (de exemplu, alginat sau chitosan). Proprietățile antimicrobiene au fost induse prin adăugarea în mixul polimeric de nanoparticule de oxid de zinc sau/și nanoparticule de argint încărcate cu ulei esențial de citonela.

Numărul de ambalaje antibacteriene și antifungice disponibile pe piață și accesibile comercial este încă scăzut, în ciuda numărului mare de substanțe testate pentru activitatea lor antimicrobiană. Ca o excepție, în țări precum SUA sau Japonia există unele ambalaje pe bază de ioni sau nanoparticule de argint. Previțiunile sunt ca acest tip de soluție, pe bază de argint, pentru filmele de ambalare antimicrobiene să fie introdus și în UE, mai ales că argintul a fost inclus ca aditiv alimentar și ca biocid de suprafață pe lista provizorie cu substanțe permise. Prin urmare, utilizarea nanoparticulelor de argint în ambalajele antimicrobiene vine ca un pas perfect logic. Ingrijorările legate de posibila toxicitate conduc la utilizarea unui nivel scăzut de nanoparticule de argint în ambalaje. Pentru a reduce și mai mult cantitatea de AgNP utilizate în ambalajul antimicrobian, am adoptat o abordare sinergică. Prin urmare, pe lângă nanoparticulele de argint, am folosit și nanoparticule de ZnO - un agent antimicrobian puternic, care este clasificat ca GRAS de FDA. ZnO este potrivit pentru a fi introdus în filmele pentru ambalarea alimentelor, deoarece are proprietăți antibacteriene și antifungice puternice. Atunci când ambele tipuri de nanoparticule sunt prezente în ambalaj, activitatea antimicrobiană este mult îmbunătățită datorită mecanismelor de acțiune sinergică. Fiecare tip de nanoparticulă sensibilizează microorganismele și le face mai susceptibile la următorul atac. Adăugarea mai multor tipuri de nanoparticule în matricea polimerică a îmbunătățit activitatea antimicrobiană.

Extractele de plante și în special uleiurile esențiale au un potențial antimicrobian ridicat și pot acționa și ca agenți antioxidanți, prin urmare multe studii de cercetare sunt concentrate pe acest subiect. Printre alte substanțe, citronelalul, citronelolul și citralul sunt principalii compuși găsiți în uleiul esențial de citonela (UEC). Prin adăugarea unui al treilea agent antimicrobian în filmele de ambalare, cum ar fi un extract natural, uleiul esențial de citonela, se poate realiza diminuarea cantității de nanoparticule utilizate datorită acțiunii sinergice. US-FDA consideră

uleiul esențial de citronela ca un biopesticid, netoxic, care prezintă și proprietăți antimicrobiene puternice.

US-FDA clasifică chitosanul ca un material netoxic și sigur (GRAS) care poate fi utilizat în industria alimentară. În ciuda faptului că chitosanul prezintă proprietăți de barieră scăzute și o rezistență mecanică slabă, este intens studiat pentru obținerea de ambalaje comestibile. De fapt, ca biopolimer, chitosanul este cel mai studiat, deoarece este și foarte abundent. Este o polizaharidă, extrasă din carapacea creveților dar și din tulpinile de ciuperci, care prezintă proprietăți antibacteriene asupra tulpinilor Gram-negative.

Dintre filmele obținute, cele care conțin ambele tipuri de nanoparticule, oxid de zinc și argint, au prezentat cea mai puternică activitate antimicrobiană asupra tulpinilor alese. Acest lucru a fost atribuit capacității de a acționa sinergic pentru toate componentele antimicrobiene ale filmului. Existența căilor multiple de inactivare a microorganismelor este probabil motivul activităților antibacteriene și antifungice ridicate obținute pentru aceste probe. Astfel de mecanisme pot include generarea speciilor reactive ale oxigenului, interacțiunea electrostatică cu peretele celular, efectul de rezonanță plasmonică de suprafață al nanoparticulelor de Ag, ruperea membranei și internalizarea nanoparticulelor, precum și proprietățile antibacteriene și antifungice ale uleiului esențial de citronela. Literatura de specialitate raportează, de asemenea, o activitate antimicrobiană sinergică pentru unele dintre aceste amestecuri.

În concluzie, în primul studiu am obținut filme de ambalare pe bază de chitosan, cu nanoparticule de argint și/sau oxid de zinc și ulei esențial din citronela. Utilizarea a patru agenți antimicrobieni diferiți în compoziția ambalajului a asigurat o acțiune antibacteriană și antifungică puternică, cu un spectru larg, pe toate tulpinile testate. Activitatea antimicrobiană puternică observată pentru compozitele cu ulei esențial de chitosan – ZnO&Ag – citronela le recomandă ca un ambalaj promițător pentru fructe.

În cel de-al doilea studiu, am obținut filme de ambalare pe bază de alginat / ZnO sau nanoparticule de Ag / ulei esențial de citronela. Filmele sunt transparente, cu o nuanță ușoară de galben din cauza interacțiunii dintre UEC, nanoparticulele de ZnO și alginat. Pentru filmele cu ulei esențial de alginat/Ag/citronelă sa observat un efect de închidere a culorii corelat cu creșterea conținutului de Ag NPs. Pentru ambele tipuri de filme pe bază de alginat, absorbanta UV a crescut pe măsură ce cantitatea de nanoparticule este mai mare. Transmitanța pentru peliculele de ulei esențial de alginat/ZnO/citronela este sub 5% în intervalul 200–360 nm și sub 10% în intervalul 360–380 nm, dar crește până la 88% în domeniul vizibil. Proprietățile de barieră față de lumină ale unui film sunt o caracteristică foarte importantă pentru un ambalaj. Cu o transmisie UV scăzută, filmul de ambalare poate proteja unii dintre nutrienții importanți (cum ar fi proteinele, lipidele și vitaminele) față de reacțiile de foto-oxidare induse de fotonii de înaltă energie.

În funcție de condițiile de păstrare (în principal lumina și temperatura), în timp, filmele compuse din alginat/Ag/ ulei esențial de citronela pot deveni mai opace. Nu este surprinzător faptul că în filmele cu o cantitate de argint mai mare, modificarea absorbantei este mai ridicată. În plus, la temperatura camerei filmele de alginat – nanoparticulele de argint sunt transparente, dar au tendința de a se întuneca atunci când sunt depozitate în prezența luminii la 30°C. În acest caz, în comparație cu filmele depozitate la 4°C timp de 6 zile, absorbanta va crește cu încă 46% (de la 32% la 78%). În concluzie, această caracteristică poate fi utilă pentru a monitoriza condițiile de timp și temperatură în care au fost depozitate alimentele, ca un indicator timp-temperatură. Deoarece alimentele de pe raft trebuie să rămână la lumină, ceea ce înseamnă de fapt timpul de expunere, o astfel de caracteristică a ambalajului poate alerta clientul dacă

alimentele au fost expuse prea mult timp sau dacă temperatura de depozitare a fost prea mare (practic un indicator cumulativ de lumină și temperatură). Prospețimea alimentelor poate fi indicată de astfel de filme de ambalare.

Valorile diametrului de inhibare a creșterii bacteriene au fost obținute pentru patru tulpini, relevante pentru infecțiile alimentare: *Staphylococcus aureus* și *Bacillus cereus* ca tulpini model Gram-pozitive și pentru *Salmonella Typhi* și *Escherichia coli* ca tulpini Gram-negative. Cantitatea de oxid de zinc are un impact direct asupra diametrului de inhibare a creșterii pentru toate cele patru tulpini bacteriene, cel mai mare diametru fiind observat pentru cea mai mare cantitate de oxid de zinc. Proba de control de oxid de zinc, a prezentat doar un efect antibacterian modest. Doar în cazul tulpinii *Bacillus cereus* s-a obținut o valoare semnificativă.

Într-un mod similar, uleiul esențial de citronela simplu a prezentat o zonă mai mică de inhibare a creșterii, dar activitatea antibacteriană devine importantă după adăugarea de nanoparticule de oxid de zinc. Ca atare, aceste rezultate sugerează o activitate sinergică, între oxidul de zinc și uleiul esențial de citronela.

Valorile obținute pentru inhibiția creșterii biofilmului au arătat că probele prezintă o activitate puternică împotriva tulpinii *Bacillus cereus*. Pentru filmul cu cel mai mare conținut de argint, se observă o inhibare puternică a creșterii biofilmului. În concluzie, putem emite ipoteza că în cazul biofilmelor inhibarea este în corelație directă cu concentrația nanoparticulelor de ZnO. Conform rezultatelor de mai sus, aceste materiale compozite de ambalare pot fi proiectate pentru aplicații și/sau microorganisme specifice.

În cadrul acestei cercetări au fost obținute, caracterizate și determinate activitățile antimicrobiene pentru 21 de filme inovatoare pe bază de chitosan sau alginat. Filmele compozite pe bază de chitosan și alginat au fost testate ca ambalaje active pentru alimente. Rezultatele testelor antimicrobiene indică faptul că prin combinarea nanoparticulelor de argint cu cele de oxid de zinc și cu uleiul esențial de citronela se obține o activitate antibacteriană și antifungică puternică, prin sinergism. În același timp, prezența nanoparticulelor și a uleiului esențial îmbunătățește proprietățile de barieră ale filmelor polimerice, atât contra vaporilor de apă, cât și împotriva acțiunii radiațiilor luminoase. Pe baza rezultatelor noastre se poate concluziona că nanoparticulele de oxid de zinc (care prezintă activitate slabă împotriva *Candida albicans*) sensibilizează microorganismul, făcându-l mai susceptibil în fața activității antifungice a uleiului esențial de citronela. Prezența nanoparticulelor de argint în ambalajul compozit îmbunătățește și mai mult activitatea antimicrobiană a filmului. Rezultatele au sugerat că există un sinergism între nanoparticulele de oxid de zinc și nanoparticulele de argint, împreună cu uleiul esențial de citronela. Prin urmare, filmele pe bază de chitosan / Ag & ZnO NPs / ulei esențial de citronela prezintă o activitate antimicrobiană puternică împotriva ambelor tipuri de tulpini bacteriene (Gram-negative sau Gram-pozitive), chiar dacă cele Gram-negative sunt de obicei mai greu de combătut din cauza complexității peretelui celular.

Ca o concluzie generală, aceste tipuri de filme au un spectru larg de activitate antibacteriană și antifungică și sunt potrivite pentru a fi utilizate ca ambalaje pentru brânza, fructe sau alte produse alimentare. Strugurii depozitați în filmele pe bază de chitosan cu ambele tipuri de nanoparticule și ulei esențial de citronela și-au păstrat calitatea timp de 14 zile spre deosebire de lotul martor. Testele preliminare pe brânza ambalată în filmele pe bază de alginat au demonstrat de asemenea o bună capacitate de conservare a texturii și culorii probelor timp de două săptămâni. În plus, merită menționat că aroma uleiului esențial de citronela este compatibilă cu astfel de alimente.

Cu toate acestea, viitorul materialelor de ambalare biodegradabile, antibacteriene și antifungice, va fi decis de presiunea consumatorilor și de legislație. Filmele de ambalare biodegradabile ne vor aduce beneficiile unor alimente de mai bună calitate și mai sigure.

Rezultatele noastre dar și studiile din literatură susțin faptul că filmele de ambalare antimicrobiene prelungesc perioada de latentă și scad capacitatea de proliferare a bacteriilor și fungilor, sporind calitatea și siguranța alimentelor, prelungind termenul de valabilitate.

## 5.2 Perspective

În continuare îmi propun să obțin ambalaje pe bază de alginat, atât cu ambele tipuri de nanoparticule (ZnO și Ag), încărcate cu diferite tipuri de uleiuri esențiale.

Pentru viitor, scopul meu este să obțin ambalaje antimicrobiene pe bază de celuloză, cu o cantitate cât mai scăzută de nanoparticule. Conservarea sau intensificarea activității antibacteriene și antifungice va necesita utilizarea directă a componentelor active din uleiurile esențiale, singure sau în diverse amestecuri, în funcție de tipul de aliment ambalat.

În plus pentru a îmbunătăți în continuare proprietățile de barieră și proprietățile mecanice ale filmului de ambalare, intenționez să studiez diferite amestecuri de polimeri (chitosan + alginat; chitosan + celuloză; alginat + celuloză etc.).

De asemenea, nanoparticulele legate covalent pe lanțurile polimerice vor fi luate în considerare și ar putea fi o abordare adecvată pentru a limita migrarea nanoparticulelor, precum și clivajul acestora.

## Lista publicațiilor

### Articole ISI

- 1- **Ludmila MOTELICA**, Luciana MARINOF, Alina HOLBAN, Bogdan Stefan VASILE, Anton FICAI. *Optical, photocatalytic and antibacterial properties of zinc oxide nanoparticles obtained by a solvothermal method*. U.P.B. Sci. Bull., Series B, Vol. 82, Iss. 1, Year 2020
- 2- **Ludmila MOTELICA**, Denisa FICAI, Ovidiu Cristian OPREA, Anton FICAI, Ecaterina ANDRONESCU. *Smart Food Packaging Designed by Nanotechnological and Drug Delivery Approaches*. *Coatings* 2020, 10(9), 806; doi: 10.3390/coatings10090806, Year 2020 **FI 3.236 Q2**
- 3- **Ludmila MOTELICA**, Denisa FICAI, Anton FICAI, Ovidiu Cristian OPREA, Durmis Alpaslan Kaya, Ecaterina ANDRONESCU. *Biodegradable Antimicrobial Food Packaging: Trends and Perspectives*. *Foods* 2020, 9(10), 1438; doi: 10.3390/foods9101438, Year 2020 **FI 5.561 Q1**
- 4- **Ludmila MOTELICA**, Denisa FICAI, Anton FICAI, Roxana-Doina TRUSCA, Cornelia-Ioana ILIE Ovidiu Cristian OPREA, Ecaterina ANDRONESCU. *Innovative Antimicrobial Chitosan/ZnO/Ag NPs/Citronella Essential Oil Nanocomposite Potential Coating for Grapes*. *Foods* 2020, 9(12), 1801, doi: 10.3390/foods9121801, Year 2020 **FI 5.561 Q1**
- 5- **Ludmila MOTELICA**, Denisa FICAI, Anton FICAI, Roxana-Doina TRUSCA, Ovidiu Cristian OPREA, Ecaterina ANDRONESCU, Alina-Maria HOLBAN. *Biodegradable*



*Alginate Films with ZnO Nanoparticles and Citronella Essential Oil—A Novel Antimicrobial Structure.* *Pharmaceutics* **2021**,13(7), 1020; doi: 10.3390/pharmaceutics13071020, Year 2021 **FI 6.525 Q1**

- 6- **Ludmila MOTELICA**, Denisa FICAI, Anton FICAI, Vladimir ENE, Ovidiu Cristian OPREA, Stefan Bogdan VASILE, Ecaterina ANDRONESCU, Alina Maria HOLBAN. *Antibacterial Biodegradable Films Based on Alginate with Silver Nanoparticles and Lemongrass Essential Oil—Innovative Packaging for Cheese.* *Nanomaterials* 2021, 11(9), 2377; <https://doi.org/10.3390/nano11092377>, Year 2021 **FI 5.719 Q1**

### Participarea la Conferințe Naționale

- 1- **Ludmila MOTELICA**, Luciana MARINOF, Alina HOLBAN, Bogdan Stefan VASILE, Anton FICAI. *Optical, photocatalytic, and antibacterial properties of zinc oxide nanoparticles obtained by a solvothermal method.* RICCCCE 21st Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering Constanța - Mamaia Romania 2019
- 2- **Ludmila MOTELICA**, Luciana MARINOF, Alina HOLBAN, Bogdan Stefan VASILE, Anton FICAI. *Study on the optical, photocatalytic and antibacterial properties of zinc oxide nanoparticles (Romanian).* Conferință- Aplicații ale chimiei în nanoștiințe și ingineria bionanomaterialelor, (AOSR), București, 16 July 2020.
- 3- Denisa FICAI, **Ludmila MOTELICA**, Gabriela PETRISOR, Irina FIERESCU, Radu Claudiu FIERESCU, Anton FICAI. *Porous materials in the treatment of microbiota-related diseases, smart functional nanomaterials: from synthesis to advanced applications* (on-line) Rome, Italy 7-8 May 2021.
- 4- **Ludmila MOTELICA**, Denisa FICAI, Ovidiu Oprea, Anton FICAI, Roxana-Doina TRUSCA. Ecaterina Andronescu, Alina Maria HOLBAN. *Alginate films ZnO nanoparticles and citronella essential oil – novel antimicrobial packaging for cheese* International Scientific Conference- Applications of chemistry in nanosciences and biomaterials engineering, (on-line) București, 25-26 June 2021.
- 5- **Ludmila MOTELICA**, Denisa FICAI, Ovidiu Oprea, Anton FICAI, Roxana-Doina TRUSCA. Ecaterina Andronescu, Alina Maria HOLBAN. *Antibacterial Biodegradable Films Based on Alginate with Silver Nanoparticles and Lemongrass Essential Oil—Innovative Packaging for Cheese* International Scientific Conference- Applications of chemistry in nanosciences and biomaterials engineering, (on-line) București, 25-26 November 2021.

### Cereri de brevet

1. Ovidiu Cristian Oprea, Anton FICAI, Denisa FICAI, **Ludmila MOTELICA**, Ecaterina ANDRONESCU, Roxana Doina TRUSCA. *Composition and process for treating paper, parchment or other writing media, for removing pathogens such as fungi, mold or bacteria (Romanian).* Nr. OSIM: A/00798/21.05.2020
2. Ovidiu Cristian Oprea, Anton FICAI, Denisa FICAI, **Ludmila MOTELICA**, Ecaterina ANDRONESCU, Roxana Doina TRUSCA. *Compositions and process for treating leather objects for conferring antibacterial and antifungal activity (Romanian).* Nr. OSIM: A/ 00794/ 24.06.2020.

**Proiect de cercetare – membru al echipei**

- 1- **Lib2Life** - Revitalizarea bibliotecilor și a patrimoniului cultural prin tehnologii avansate” - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0689 / 69PCCDI/2018/Lib2Life/P1 2018-2021.
- 2- **UPB - Proof of Concept 2020** – „Materiale celulozice cu activitate antimicrobiană” – Implementarea proiectului 01.02.2021-31.01.2023.
- 3- **NanoSafePack** - “Ambalaje inovative cu activitate antimicrobiană pentru siguranța alimentară” Nr. 573PED/2022 - PN-III-P2-2.1-PED-2021-3414.; 2022-2024

**Alte documente**

1. **Ludmila MOTELICA**, Luminița CRACIUN, Ioana ARDELEAN, Mădălina Violeta IOANA. “*Non-destructive Analyses of 16th Century Documents*”. Revista de Chimie (București) 70, nr.8, pag. 2798-2802; 2019
2. **Ludmila Motelica**, Aurelian Popescu, Anca-Gabriela Razvan, Ovidiu Oprea, Roxana-Doina Trusca, Bogdan-Stefan Vasile, Florina Dumitru and Alina-Maria Holban. *Facile Use of ZnO Nanopowders to Protect Old Manual Paper Documents*. Materials, 13(23), 5452, 2020, doi:10.3390/ma13235452, ISSN 1996-1944, **Q2 (IF 3.057)**
3. Irina Fierascu, Radu Claudiu Fierascu, Toma Fistos, **Ludmila Motelica**, Ovidiu Oprea, Adrian Nicoara, Anton Ficai, Alexandru Stirban, Maria-Similia Zgarcu. *Non-invasive microanalysis of a written page from the Romanian heritage: The Homiliary of Varlaam (Cazania lui Varlaam)*. Microchemical Journal (2021), doi: 10.1016/j.microc.2021.106345 **Q1 (IF 3.594)**.
4. Alexa-Maria Croitoru, Yasin Karaçelebi, Elif Saatcioglu, Eray Altan, Songul Ulag, Huseyin Kıvanc Aydoğan, Ali Sahin, **Ludmila Motelica**, Ovidiu Oprea, Bianca-Maria Tihauan, Roxana-Cristina Popescu, Diana Savu, Roxana Trusca, Denisa Ficai, Oguzhan Gunduz, Anton Ficai - *Electrically Triggered Drug Delivery from Novel Electrospun Poly (Lactic Acid)/Graphene Oxide/Quercetin Fibrous Scaffolds for Wound Dressing Application*. Pharmaceutics 2021, 13(7), 957, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070957> **Q1 (IF), 4.421**
5. Otilia Chirca, Cornelia Bicleșanu, Anamaria Florescu, **Ludmila Motelica**, Alina Maria Holban, Alexandru Burcea - *Comparative study on adhesion to the dental structure of the total ceramic crown with different adhesive cements*, Revista Română de Materiale / Romanian Journal of Materials 2021, 51 (2), 309 – 318, **(IF), 0.542**
6. Angela Spoială, Cornelia-Ioana Ilie, Georgiana Dolet, Roxana-Doina Trușcă, **Ludmila Motelica**, Ovidiu-Cristian Oprea, Denisa Ficai, Anton Ficai, Ecaterina Andronescu, Lia-Mara Dițu - *The development of antimicrobial chitosan/zno nanocomposite membranes for water purification*, Revista Română de Materiale / Romanian Journal of Materials 2022, 52 (1), 17-25, **(IF), 0.542**
7. Gabriela Petrisor, **Ludmila Motelica**, Luminita Narcisa Craciun, Ovidiu Cristian Oprea Denisa Ficai and Anton Ficai - *Melissa officinalis: Composition, Pharmacological Effects and Derived Release Systems - A Review* Molecular Sciences 2022, 23(7), 3591; <https://doi.org/10.3390/ijms23073591>, **Q1 (IF), 5,924**
8. Gabriela Petrisor Denisa Ficai , **Ludmila Motelica** , Roxana Doina Trusca , Alexandra Cătălina Bircă, Bogdan St,efan Vasile, Georgeta Voicu, Ovidiu Cristian Oprea,

- Augustin Semenescu, Anton Ficai, Mircea Ionut Popitui, Irina Fierascu, Radu Claudiu Fierascu, Elena Lacramioara Radu Lilia Matei, Laura Deisa Dragu, Ioana Madalina Pitica, Mihaela Economescu and Coralia Bleotu - *Mesoporous Silica Materials Loaded with Gallic Acid with Antimicrobial Potential Nanomaterials* 2022, 12(10), 1648; <https://doi.org/10.3390/nano12101648>, **Q1 (IF), 5.076**
9. Alexa-Maria Croitoru, Alina Morosan, Bianca Tihauan, Ovidiu Oprea **Ludmila Motelica**, Roxana Trusca, Adrian Ionut Nicoara, Roxana-Cristina Popescu, Diana Savu, Dan Eduard Mihaiescu and Anton Ficai - *Novel Graphene Oxide/Quercetin and Graphene Oxide/Juglone Nanostructured Platforms as Effective Drug Delivery Systems with Biomedical Applications Nanomaterials* 2022, 12(11), 1943; <https://doi.org/10.3390/nano12111943> - **Q1 (IF), 5.076**



## Bibliografie

1. *Technical Platform on the Measurement and Reduction of Food Loss and Waste*. Available online: <http://www.fao.org/platform-food-loss-waste/en/>. accessed in 01.07.2021.
2. Ishangulyyev, S., S. Kim, and S.H. Lee, *Understanding Food Loss and Waste-Why Are We Losing and Wasting Food?* Foods, 2019. **8**(8): p. 297.
3. Jiang, B., et al., *Reutilization of Food Waste: One-Step Extration, Purification and Characterization of Ovalbumin from Salted Egg White by Aqueous Two-Phase Flotation*. Foods, 2019. **8**(8): p. 286.
4. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/food-packaging-market>. accessed in 26.09.2020.
5. Wohner, B., et al., *Environmental and economic assessment of food-packaging systems with a focus on food waste. Case study on tomato ketchup*. Science of the Total Environment, 2020. **738**.
6. [https://ec.europa.eu/environment/circular-economy/index\\_en.htm](https://ec.europa.eu/environment/circular-economy/index_en.htm). accessed 26.09.2020.
7. Makaremi, M., et al., *Safety Dissolvable and Healable Active Packaging Films Based on Alginate and Pectin*. Polymers, 2019. **11**(10): p. 1594.
8. Kaladharan, P., et al., *Marine plastic litter in certain trawl grounds along the peninsular coasts of India*. Marine Pollution Bulletin, 2020. **157**: p. 111299.
9. Chen, F.Y., et al., *Impact of regulatory focus on express packaging waste recycling behavior: moderating role of psychological empowerment perception*. Environmental Science and Pollution Research, 2019. **26**(9): p. 8862-8874.
10. White, A. and S. Lockyer, *Removing plastic packaging from fresh produce - what's the impact?* Nutrition Bulletin, 2020. **45**(1): p. 35-50.
11. Guo, J.J., et al., *Source, migration and toxicology of microplastics in soil*. Environment International, 2020. **137**: p. 105263.
12. Boz, Z., V. Korhonen, and C.K. Sand, *Consumer Considerations for the Implementation of Sustainable Packaging: A Review*. Sustainability, 2020. **12**(6): p. 2192.
13. Clark, N., R. Trimmingham, and G.T. Wilson, *Incorporating Consumer Insights into the UK Food Packaging Supply Chain in the Transition to a Circular Economy*. Sustainability, 2020. **12**(15): p. 6106.
14. Zemljic, L.F., et al., *Physicochemical Characterization of Packaging Foils Coated by Chitosan and Polyphenols Colloidal Formulations*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(2): p. 495.
15. Esmailzadeh, H., et al., *CuO/LDPE nanocomposite for active food packaging application: a comparative study of its antibacterial activities with ZnO/LDPE nanocomposite*. Polymer Bulletin, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03175-7>.
16. Zia, J., et al., *Low-density polyethylene/curcumin melt extruded composites with enhanced water vapor barrier and antioxidant properties for active food packaging*. Polymer, 2019. **175**: p. 137-145.
17. Habib, S., et al., *Preparation of Progressive Antibacterial LDPE Surface via Active Biomolecule Deposition Approach*. Polymers, 2019. **11**(10).
18. Giannakas, A., et al., *Novel LDPE/Chitosan Rosemary and Melissa Extract Nanostructured Active Packaging Films*. Nanomaterials, 2019. **9**(8): p. 1105.
19. Kuster-Boluda, A., N.V. Vila, and I. Kuster, *Managing international distributors' complaints: an exploratory study*. Journal of Business & Industrial Marketing, 2020. <https://doi.org/10.1108/JBIM-11-2018-0336>.
20. Kerry, J.P., M.N. O'Grady, and S.A. Hogan, *Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review*. Meat Science, 2006. **74**(1): p. 113-130.
21. O' Callaghan, K.A.M. and J.P. Kerry, *Assessment of the antimicrobial activity of potentially active substances (nanoparticled and non-nanoparticled) against cheese-derived micro-organisms*. International Journal of Dairy Technology, 2014. **67**(4): p. 483-489.
22. Rai, M., et al., *Smart nanopackaging for the enhancement of food's shelf life*. Environmental Chemistry Letters, 2019. **17**(1): p. 277-290.
23. Vilas, C., M. Mauricio-Iglesias, and M.R. Garcia, *Model-based design of smart active packaging systems with antimicrobial activity*. Food Packaging and Shelf Life, 2020. **24**: p. 100446.
24. Jayasena, D.D. and C. Jo, *Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review*. Trends in Food Science & Technology, 2013. **34**(2): p. 96-108.
25. Szabo, K., et al., *Active Packaging-Poly(Vinyl Alcohol) Films Enriched with Tomato By-Products Extract*. Coatings, 2020. **10**(2).
26. Souza, V.G.L., et al., *Eco-Friendly ZnO/Chitosan Bionanocomposites Films for Packaging of Fresh Poultry Meat*. Coatings, 2020. **10**(2): p. 110.
27. Shruthy, R., S. Jancy, and R. Preetha, *Cellulose nanoparticles synthesised from potato peel for the development of active packaging film for enhancement of shelf life of raw prawns (*Penaeus monodon*) during frozen storage*. International Journal of Food Science and Technology, 2020. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14551>.



28. Han, J.H., *Antimicrobial food packaging*. Food Technology, 2000. **54**(3): p. 56-65.
29. Surendhiran, D., et al., *Fabrication of high stability active nanofibers encapsulated with pomegranate peel extract using chitosan/PEO for meat preservation*. Food Packaging and Shelf Life, 2020. **23**.
30. Settler-Ramirez, L., et al., *PVOH/protein blend films embedded with lactic acid bacteria and their antilisterial activity in pasteurized milk*. International Journal of Food Microbiology, 2020. **322**.
31. Ramos, M., et al., *Controlled Release of Thymol from Poly(Lactic Acid)-Based Silver Nanocomposite Films with Antibacterial and Antioxidant Activity*. Antioxidants, 2020. **9**(5).
32. Istrati, D., et al., *Phyto-mediated nanostructured carriers based on dual vegetable actives involved in the prevention of cellular damage*. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2016. **64**: p. 249-259.
33. Lacatusu, I., et al., *Lipid nanocarriers based on natural compounds: An evolving role in plant extract delivery*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2014. **116**(12): p. 1708-1717.
34. Caputo, L., et al., *Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from Peels of Three Citrus Species*. Molecules, 2020. **25**(8): p. 1890.
35. Zhang, H.J. and J.Q. Wang, *Constituents of the Essential Oils of Garlic and Citronella and Their Vapor-phase Inhibition Mechanism against S.aureus*. Food Science and Technology Research, 2019. **25**(1): p. 65-74.
36. Francikowski, J., et al., *Commercially Available Essential Oil Formulas as Repellents Against the Stored-Product Pest Alphitobius diaperinus*. Insects, 2019. **10**(4): p. 96.
37. Go, E.J. and K.B. Song, *Effect of java citronella essential oil addition on the physicochemical properties of Gelidium corneum-chitosan composite films*. Food Science and Biotechnology, 2020. **29**(7): p. 909-915.
38. Nedelcu, I.A., et al., *Silver Based Materials for Biomedical Applications*. Current Organic Chemistry, 2014. **18**(2): p. 173-184.
39. Vaja, F., et al., *Effects of ZnO Nanoparticles on the Wet Scrub Resistance and Photocatalytic Properties of Acrylic Coatings*. Revista De Chimie, 2012. **63**(7): p. 722-726.
40. Kumar Santosh, et al., *Biodegradable Hybrid Nanocomposite of Chitosan/Gelatin and Green Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles for Food Packaging*. Foods, 2020. **9**(9): p. 1143.
41. Wang, Y., et al., *Preparation of Chitosan/Corn Starch/Cinnamaldehyde Films for Strawberry Preservation*. Foods, 2019. **8**(9): p. 423.
42. Munteanu, S.B. and C. Vasile, *Vegetable Additives in Food Packaging Polymeric Materials*. Polymers, 2020. **12**(1): p. 28.
43. Valdes, A., et al., *Gelatin-Based Antimicrobial Films Incorporating Pomegranate (Punica granatum L.) Seed Juice by-Product*. Molecules, 2020. **25**(1): p. 166.
44. Becerril, R., C. Nerin, and F. Silva, *Encapsulation Systems for Antimicrobial Food Packaging Components: An Update*. Molecules, 2020. **25**(5): p. 1134.
45. Naidu, D.S. and M.J. John, *Effect of Clay Nanofillers on the Mechanical and Water Vapor Permeability Properties of Xylan-Alginate Films*. Polymers, 2020. **12**(10).
46. Motelica, L., et al., *Innovative Antimicrobial Chitosan/ZnO/Ag NPs/Citronella Essential Oil Nanocomposite - Potential Coating for Grapes*. Foods, 2020. **9**(12): p. 1801.
47. Youssef, A.M. and S.M. El-Sayed, *Bionanocomposites materials for food packaging applications: Concepts and future outlook*. Carbohydrate Polymers, 2018. **193**: p. 19-27.
48. Krepker, M., et al., *Active food packaging films with synergistic antimicrobial activity*. Food Control, 2017. **76**: p. 117-126.
49. Sanches-Silva, A., et al., *Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review*. Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2014. **31**(3): p. 374-395.
50. Damelli, D., et al., *Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns*. Trends in Food Science & Technology, 2008. **19**: p. 10.
51. Realini, C.E. and B. Marcos, *Active and intelligent packaging systems for a modern society*. Meat Science, 2014. **98**(3): p. 404-419.
52. Lee, S.J. and A.T.M.M. Rahman, *Intelligent Packaging for Food Products*. Innovations in Food Packaging, 2nd Edition, 2014: p. 171-209.
53. Galagan, Y. and W.F. Su, *Fadable ink for time-temperature control of food freshness: Novel new time-temperature indicator*. Food Research International, 2008. **41**(6): p. 653-657.
54. Taoukis, P.S. and T.P. Labuza, *Applicability of Time-Temperature Indicators as Shelf-Life Monitors of Food-Products*. Journal of Food Science, 1989. **54**(4): p. 783-788.
55. Fang, Z.X., et al., *Active and intelligent packaging in meat industry*. Trends in Food Science & Technology, 2017. **61**: p. 60-71.
56. Wang, S.D., et al., *Review of Time Temperature Indicators as Quality Monitors in Food Packaging*. Packaging Technology and Science, 2015. **28**(10): p. 839-867.
57. Yoshida, C.M.P., et al., *Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations*. Lwt-Food Science and Technology, 2014. **55**(1): p. 83-89.

58. Safarik, I., et al., *Potential of magnetically responsive (nano)biocomposites*. *Soft Matter*, 2012. **8**(20): p. 5407-5413.
59. Arvanitoyannis, I.S. and A.C. Stratakos, *Fresh and Processed Meat and Meat Products*. *Modified Atmosphere and Active Packaging Technologies*, 2012: p. 223-259.
60. Arvanitoyannis, I.S. and A.C. Stratakos, *Application of Modified Atmosphere Packaging and Active/Smart Technologies to Red Meat and Poultry: A Review*. *Food and Bioprocess Technology*, 2012. **5**(5): p. 1423-1446.
61. Umuhumuza, L.C. and X.L. Sun, *Rapid detection of pork meat freshness by using L-cysteine-modified gold electrode*. *European Food Research and Technology*, 2011. **232**(3): p. 425-431.
62. Matindoust, S., et al., *Food quality and safety monitoring using gas sensor array in intelligent packaging*. *Sensor Review*, 2016. **36**(2): p. 169-183.
63. Vermeiren, L., et al., *Developments in the active packaging of foods*. *Trends in Food Science & Technology*, 1999. **10**(3): p. 77-86.
64. Chaix, E., C. Guillaume, and V. Guillard, *Oxygen and Carbon Dioxide Solubility and Diffusivity in Solid Food Matrices: A Review of Past and Current Knowledge*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014. **13**(3): p. 261-286.
65. Sun, L., et al., *A Practical Multivariable Control Approach Based on Inverted Decoupling and Decentralized Active Disturbance Rejection Control*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2016. **55**(7): p. 2008-2019.
66. Ehsan M and L. M., *Intelligent packaging in meat industry: An overview of existing solutions*. *Food Sci Technol*, 2014.
67. Bolumar, T., M.L. Andersen, and V. Orlien, *Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment*. *Food Chemistry*, 2011. **129**(4): p. 1406-1412.
68. Liu, L., et al., *Development of Time-Temperature Data Collection Program for Frozen Fish in the Cold Chain*. *Sensor Letters*, 2010. **8**(1): p. 47-51.
69. Gomez-Estaca, J., et al., *Advances in antioxidant active food packaging*. *Trends in Food Science & Technology*, 2014. **35**(1): p. 42-51.
70. Feng, K., et al., *Enhancement of the antimicrobial activity of cinnamon essential oil-loaded electrospun nanofilm by the incorporation of lysozyme*. *Rsc Advances*, 2017. **7**(3): p. 1572-1580.
71. Ahmed, J., M. Mulla, and Y.A. Arfat, *Application of high-pressure processing and polylactide/cinnamon oil packaging on chicken sample for inactivation and inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*, and post-processing film properties*. *Food Control*, 2017. **78**: p. 160-168.
72. Gomez-Estaca, J., et al., *Development, properties, and stability of antioxidant shrimp muscle protein films incorporating carotenoid-containing extracts from food by-products*. *Lwt-Food Science and Technology*, 2015. **64**(1): p. 189-196.
73. Bolumar, T., et al., *Rosemary and oxygen scavenger in active packaging for prevention of high-pressure induced lipid oxidation in pork patties*. *Food Packaging and Shelf Life*, 2016. **7**: p. 26-33.
74. He, S.K., et al., *Antimicrobial Efficiency of Chitosan Solutions and Coatings Incorporated with Clove Oil and/or Ethylenediaminetetraacetate*. *Journal of Food Safety*, 2014. **34**(4): p. 345-352.
75. Fratiami, F., et al., *Preservation of Chicken Breast Meat Treated with Thyme and Balm Essential Oils*. *Journal of Food Science*, 2010. **75**(8): p. M528-M535.
76. Mulla, M., et al., *Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging*. *Food Control*, 2017. **73**: p. 663-671.
77. Zhang, S.B., et al., *New insights into synergistic antimicrobial and antifouling cotton fabrics via dually finished with quaternary ammonium salt and zwitterionic sulfobetaine*. *Chemical Engineering Journal*, 2018. **336**: p. 123-132.
78. Singh, S., et al., *Antibacterial and amine scavenging properties of silver-silica composite for post-harvest storage of fresh fish*. *Food and Bioprocesses Processing*, 2018. **107**: p. 61-69.
79. Shankar, S. and J.W. Rhim, *Antimicrobial wrapping paper coated with a ternary blend of carbohydrates (alginate, carboxymethyl cellulose, carrageenan) and grapefruit seed extract*. *Carbohydrate Polymers*, 2018. **196**: p. 92-101.
80. Lu, P., et al., *Application of Nanofibrillated Cellulose on BOPP/LDPE Film as Oxygen Barrier and Antimicrobial Coating Based on Cold Plasma Treatment*. *Coatings*, 2018. **8**(6).
81. Zhu, R.N., et al., *An approach for reinforcement of paper with high strength and barrier properties via coating regenerated cellulose*. *Carbohydrate Polymers*, 2018. **200**: p. 100-105.
82. Zhang, X.M., et al., *One-step coagulation to construct durable anti-fouling and antibacterial cellulose film exploiting Ag@AgCl nanoparticle-triggered photo-catalytic degradation*. *Carbohydrate Polymers*, 2018. **181**: p. 499-505.
83. Shankar, S., A.A. Oun, and J.W. Rhim, *Preparation of antimicrobial hybrid nano-materials using regenerated cellulose and metallic nanoparticles*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018. **107**: p. 17-27.



84. Salari, M., et al., *Development and evaluation of chitosan based active nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles*. Food Hydrocolloids, 2018. **84**: p. 414-423.
85. Srikandace, Y., et al., *Antibacterial activity of bacterial cellulose-based edible film incorporated with Citrus spp essential oil*. 2nd International Symposium on Green Technology for Value Chains 2017 (Greenvc 2017), 2018. **160**.
86. Yousefi, M., M. Azizi, and A. Ehsani, *Antimicrobial coatings and films on meats: A perspective on the application of antimicrobial edible films or coatings on meats from the past to future*. Bali Medical Journal, 2018. **7**(1): p. 87-96.
87. Wang, H.X., J. Qan, and F.Y. Ding, *Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018. **66**(2): p. 395-413.
88. Priyadarshi, R., et al., *Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life*. Carbohydrate Polymers, 2018. **195**: p. 329-338.
89. Yun, Y.H., et al., *Preparation of chitosan/polyvinyl alcohol blended films containing sulfosuccinic acid as the crosslinking agent using UV curing process*. Food Research International, 2017. **100**: p. 377-386.
90. Nancy Robledo1, L.L., Andrea Bunger1, Cristian Tapia1, Lilian Abugoch1, *Effects of Antimicrobial Edible Coating of Thymol Nanoemulsion/Quinoa Protein/Chitosan on the Safety, Sensorial Properties, and Quality of Refrigerated Strawberries (Fragaria × ananassa) Under Commercial Storage Environment*. Food and Bioprocess Technology (2018) 2018. (<https://doi.org/10.1007/s11947-018-2124-3>): p. 1566–1574.
91. Sogut, E. and A.C. Seydim, *Development of Chitosan and Polycaprolactone based active bilayer films enhanced with nanocellulose and grape seed extract*. Carbohydrate Polymers, 2018. **195**: p. 180-188.
92. Jiawei Yan, Z.L., Zhaojun Ban, Hongyan Lu, Dong Li, Dongmei Yang, Morteza Soleimani Aghdam, Li Li *The effect of the layer-by-layer (LBL) edible coating on strawberry quality and metabolites during storage*. 2019. **147**: p. 29-38.
93. Ye, J.S., et al., *Preparation and properties of polylactic acid-tea polyphenol-chitosan composite membranes*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **117**: p. 632-639.
94. Uranga, J., et al., *Citric acid-incorporated fish gelatin/chitosan composite films*. Food Hydrocolloids, 2019. **86**: p. 95-103.
95. Soni, B., et al., *Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan/TEMPO biocomposite packaging films*. Food Packaging and Shelf Life, 2018. **17**: p. 73-79.
96. Yang, W., et al., *Polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels with enhanced antioxidant and antibacterial properties induced by lignin nanoparticles*. Carbohydrate Polymers, 2018. **181**: p. 275-284.
97. Kaewklin, P., et al., *Active packaging from chitosan-titanium dioxide nanocomposite film for prolonging storage life of tomato fruit*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **112**: p. 523-529.
98. Zheng, K.W., et al., *Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films containing hardleaf oatchestnut starch and Litsea cubeba oil*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **118**: p. 707-715.
99. Zhang, Z.J., et al., *Preparation and characterization of biocomposite chitosan film containing Perilla frutescens (L.) Britt. essential oil*. Industrial Crops and Products, 2018. **112**: p. 660-667.
100. Priyadarshi, R., et al., *Chitosan films incorporated with Apricot (Prunus armeniaca) kernel essential oil as active food packaging material*. Food Hydrocolloids, 2018. **85**: p. 158-166.
101. Ojagh, S.M., et al., *Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout*. Food Chemistry, 2010. **120**(1): p. 193-198.
102. Xing, Y.G., et al., *Effect of Chitosan Coating with Cinnamon Oil on the Quality and Physiological Attributes of China Jujube Fruits*. Biomed Research International, 2015: p. 835151.
103. Wang, Q.Y., et al., *Effect of chitosan-carvacrol coating on the quality of Pacific white shrimp during iced storage as affected by caprylic acid*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **106**: p. 123-129.
104. Peretto, G., et al., *Optimization of Antimicrobial and Physical Properties of Alginate Coatings Containing Carvacrol and Methyl Cinnamate for Strawberry Application*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(4): p. 984-990.
105. Borkowski, D., I. Krucinska, and Z. Draczynski, *Preparation of Nanocomposite Alginate Fibers Modified with Titanium Dioxide and Zinc Oxide*. Polymers, 2020. **12**(5): p. 1040.
106. Fahmy, A., et al., *Molecular properties of polyvinyl alcohol/sodium alginate composite*. Biointerface Research in Applied Chemistry, 2020. **10**(1): p. 4734-4739.
107. Senturk Parreidt, T., K. Muller, and M. Schmid, *Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications*. Foods, 2018. **7**(10).
108. Vizzini, P., et al., *Development and Evaluation of qPCR Detection Method and Zn-MgO/Alginate Active Packaging for Controlling Listeria monocytogenes Contamination in Cold-Smoked Salmon*. Foods, 2020. **9**(10).
109. Paduraru, A., et al., *Antimicrobial Wound Dressings as Potential Materials for Skin Tissue Regeneration*. Materials, 2019. **12**(11).

110. Anugrah, D.S.B., et al., *A Review of Polysaccharide-Zinc Oxide Nanocomposites as Safe Coating for Fruits Preservation*. Coatings, 2020. **10**(10).
111. Avramescu, S.M., et al., *Edible and Functionalized Films/Coatings-Performances and Perspectives*. Coatings, 2020. **10**(7): p. 687.
112. Bakil, S.N.A., et al., *Sodium Alginate-Zinc Oxide Nanocomposite Film for Antibacterial Wound Healing Applications*. Biointerface Research in Applied Chemistry, 2020. **10**(5): p. 6289-6296.
113. Khare, S., et al., *Effects of ingested nanocellulose on intestinal microbiota and homeostasis in Wistar Han rats*. Nanoimpact, 2020. **18**.
114. DeLoid, G.M., et al., *Toxicological effects of ingested nanocellulose in in vitro intestinal epithelium and in vivo rat models*. Environmental Science-Nano, 2019. **6**(7): p. 2105-2115.
115. Chen, Y.J., et al., *Subchronic exposure to cellulose nanofibrils induces nutritional risk by non-specifically reducing the intestinal absorption*. Carbohydrate Polymers, 2020. **229**.
116. Dimitrijevic, M., et al., *Safety aspects of nanotechnology applications in food packaging*. 58th International Meat Industry Conference (Meatcon2015), 2015. **5**: p. 57-60.
117. dos Santos, C.A., A.P. Ingle, and M. Rai, *The emerging role of metallic nanoparticles in food*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020. **104**(6): p. 2373-2383.
118. Doskocz, N., et al., *Ecotoxicity of selected nanoparticles in relation to micro-organisms in the water ecosystem*. Desalination and Water Treatment, 2020. **186**: p. 50-55.
119. Noori, A., et al., *Silver nanoparticle detection and accumulation in tomato (Lycopersicon esculentum)*. Journal of Nanoparticle Research, 2020. **22**(6).
120. Dash, S.R. and C.N. Kundu, *Promising opportunities and potential risk of nanoparticle on the society*. Iet Nanobiotechnology, 2020. **14**(4): p. 253-260.
121. Garcia, C.V., G.H. Shin, and J.T. Kim, *Metal oxide-based nanocomposites in food packaging: Applications, migration, and regulations*. Trends in Food Science & Technology, 2018. **82**: p. 21-31.
122. Souza, V.G.L. and A.L. Fernando, *Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food-A review*. Food Packaging and Shelf Life, 2016. **8**: p. 63-70.
123. Istiqola, A. and A. Syafiuddin, *A review of silver nanoparticles in food packaging technologies: Regulation, methods, properties, migration, and future challenges*. Journal of the Chinese Chemical Society, 2020. <https://doi.org/10.1002/jccs.202000179>.
124. Sahoo, R.K., *Packaging: Polymer-Metal-Based Micro- and Nanocomposites*. Encyclopedia of Polymer Applications, Vols I-III, 2019: p. 2021-2040.
125. Morais, L.D., et al., *Critical evaluation of migration studies of silver nanoparticles present in food packaging: a systematic review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019.
126. Ramachandran, R., et al., *In vivo toxicity evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles and gold nanoparticles on adult zebrafish: a comparative study*. 3 Biotech, 2018. **8**(10).
127. Zhou, Q.F., et al., *Determination and characterization of metal nanoparticles in clams and oysters*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020. **198**.
128. Gong, Y., et al., *Bioaccumulation and human health risk of shellfish contamination to heavy metals and As in most rapid urbanized Shenzhen, China*. Environmental Science and Pollution Research, 2020. **27**(2): p. 2096-2106.
129. Shah, N., et al., *Monitoring Bioaccumulation (in Gills and Muscle Tissues), Hematology, and Genotoxic Alteration in Ctenopharyngodon idella Exposed to Selected Heavy Metals*. Biomed Research International, 2020. **2020**.
130. Wu, J., et al., *Foliar versus root exposure of AgNPs to lettuce: Phytotoxicity, antioxidant responses and internal translocation*. Environmental Pollution, 2020. **261**.
131. Becaro, A.A., et al., *Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticle/carboxymethyl cellulose on Allium cepa*. Environmental Monitoring and Assessment, 2017. **189**(7).
132. Ma, C.X., et al., *Dual roles of glutathione in silver nanoparticle detoxification and enhancement of nitrogen assimilation in soybean (Glycine max(L.) Merrill)*. Environmental Science-Nano, 2020. **7**(7): p. 1954-1966.
133. Yang, Z.Z., et al., *Effects of Copper Oxide Nanoparticles on the Growth of Rice (Oryza Sativa L.) Seedlings and the Relevant Physiological Responses*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020. **17**(4).
134. Yusefi-Tanha, E., et al., *Particle size and concentration dependent toxicity of copper oxide nanoparticles (CuONPs) on seed yield and antioxidant defense system in soil grown soybean (Glycine max cv. Kowsar)*. Science of the Total Environment, 2020. **715**.
135. Rajput, V., et al., *ZnO and CuO nanoparticles: a threat to soil organisms, plants, and human health*. Environmental Geochemistry and Health, 2020. **42**(1): p. 147-158.
136. Rajput, V., et al., *Toxicity of copper oxide nanoparticles on spring barley (Hordeum sativum distichum)*. Science of the Total Environment, 2018. **645**: p. 1103-1113.
137. Baskar, V., et al., *A comparative study of phytotoxic effects of metal oxide (CuO, ZnO and NiO) nanoparticles on in-vitro grown Abelmoschus esculentus*. Plant Biosystems, 2020. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1753843>.

138. Jeon, Y.R., J. Yu, and S.J. Choi, *Fate Determination of ZnO in Commercial Foods and Human Intestinal Cells*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(2).
139. Pereira, F.F., et al., *The Effect of ZnO Nanoparticles Morphology on the Toxicity Towards Microalgae Pseudokirchneriella subcapitata*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2020. **20**(1): p. 48-63.
140. Vasile, O.R., et al., *Influence of the size and the morphology of ZnO nanoparticles on cell viability*. Comptes Rendus Chimie, 2015. **18**(12): p. 1335-1343.
141. Voss, L., et al., *Environmental Impact of ZnO Nanoparticles Evaluated by in Vitro Simulated Digestion*. Acs Applied Nano Materials, 2020. **3**(1): p. 724-733.
142. Meng, J., et al., *Exposure to low dose ZnO nanoparticles induces hyperproliferation and malignant transformation through activating the CXCR2/NF-kappa B/ STAT3/ERK and AKT pathways in colonic mucosal cells*. Environmental Pollution, 2020. **263**.
143. Musial, J., et al., *Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products-What Do We Know about Their Safety?* Nanomaterials, 2020. **10**(6).
144. Kurtz, C.C., et al., *Acute high-dose titanium dioxide nanoparticle exposure alters gastrointestinal homeostasis in mice*. Journal of Applied Toxicology, 2020. **40**(10): p. 1384-1395.
145. Hashem, M.M., et al., *The long-term oral exposure to titanium dioxide impaired immune functions and triggered cytotoxic and genotoxic impacts in rats*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2020. **60**.
146. Cao, X.Q., et al., *Foodborne Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Stronger Adverse Effects in Obese Mice than Non-Obese Mice: Gut Microbiota Dysbiosis, Colonic Inflammation, and Proteome Alterations*. Small, 2020. <https://doi.org/10.1002/sml.202001858>.
147. Bettencourt, A., et al., *Analysis of the Characteristics and Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanomaterials Following Simulated In Vitro Digestion*. Nanomaterials, 2020. **10**(8).
148. Shi, L.E., et al., *Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: a review*. Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2014. **31**(2): p. 173-186.
149. McClements, D.J. and H. Xiao, *Is nano safe in foods? Establishing the factors impacting the gastrointestinal fate and toxicity of organic and inorganic food-grade nanoparticles*. Science of Food, 2017. **1**: p. 6.
150. Lee, C.C., et al., *Exposure to ZnO/TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Affects Health Outcomes in Cosmetics Salesclerks*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020. **17**(17).
151. Devab, M.A., A.A. Nada, and A. Hamdy, *Comparative study on the corrosion and mechanical properties of nano-composite coatings incorporated with TiO<sub>2</sub> nano-particles, TiO<sub>2</sub> nano-tubes, and ZnO nano-flowers*. Progress in Organic Coatings, 2017. **105**: p. 245-251.
152. Motelica, L., et al., *Biodegradable Antimicrobial Food Packaging: Trends and Perspectives*. Foods, 2020. **9**(10): p. 1438.
153. Vasile, B.S., et al., *Synthesis and characterization of a novel controlled release zinc oxide/gentamicin-chitosan composite with potential applications in wounds care*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. **463**(2): p. 161-169.
154. Sahu, D., et al., *Nanosized zinc oxide induces toxicity in human lung cells*. ISRN Toxicol, 2013. **2013**: p. 316075.
155. Sruthi, S., J. Ashtami, and P.V. Mohanan, *Biomedical application and hidden toxicity of Zinc oxide nanoparticles*. Materials Today Chemistry, 2018. **10**: p. 175-186.
156. Vandebriel, R.J. and W.H. De Jong, *A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles*. Nanotechnol Sci Appl, 2012. **5**: p. 61-71.
157. El Shemy, M.A., N.I. Azab, and R.F. Salim, *Zinc Oxide Nanoparticles: The Hidden Danger*. International Journal of Biochemistry, Biophysics & Molecular Biology 2017. **2**(1): p. 1-9.
158. Mohammed, Y.H., et al., *Support for the Safe Use of Zinc Oxide Nanoparticle Sunscreens: Lack of Skin Penetration or Cellular Toxicity after Repeated Application in Volunteers*. Journal of Investigative Dermatology, 2019. **139**(2): p. 308-315.
159. Wright, P. and N. Jackson, *Safety of engineered nanomaterials and occupational health and safety issues for commercial scale production*, in *Handbook of clinical nanomedicine: law, business, regulation, safety, and risk*, R. Bawa, G. Audette, and B. Reese, Editors. 2016, Pan Stanford Publishing: Singapore. p. 569-619.
160. Reshma, V.G. and P.V. Mohanan, *Cellular interactions of zinc oxide nanoparticles with human embryonic kidney (HEK 293) cells*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2017. **157**: p. 182-190.
161. Feltis, B.N., et al., *Independent cytotoxic and inflammatory responses to zinc oxide nanoparticles in human monocytes and macrophages*. Nanotoxicology, 2012. **6**(7): p. 757-765.
162. Alaraby, M., et al., *A comprehensive study of the harmful effects of ZnO nanoparticles using Drosophila melanogaster as an in vivo model*. Journal of Hazardous Materials, 2015. **296**: p. 166-174.
163. Wright, P.F.A., *Realistic Exposure Study Assists Risk Assessments of ZnO Nanoparticle Sunscreens and Allays Safety Concerns*. Journal of Investigative Dermatology, 2019. **139**(2): p. 277-278.



164. Radulescu, M., et al., *Antimicrobial coatings based on zinc oxide and orange oil for improved bioactive wound dressings and other applications*. Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2016. **57**(1): p. 107-114.
165. Najnin, H., et al., *Biochemical and toxicological analysis of Cinnamomum tamala essential oil in Wistar rats*. Journal of Food Processing and Preservation, 2020. **44**(2).
166. Costa, W.K., et al., *Essential oil from Eugenia stipitata McVaugh leaves has antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities without showing toxicity in mice*. Industrial Crops and Products, 2020. **144**.
167. Bonin, E., et al., *Baccharis dracunculifolia: Chemical constituents, cytotoxicity and antimicrobial activity*. Lwt-Food Science and Technology, 2020. **120**.
168. Abou Baker, D.H., M. Al-Moghazy, and A.A.A. ElSayed, *The in vitro cytotoxicity, antioxidant and antibacterial potential of Satureja hortensis L. essential oil cultivated in Egypt*. Bioorganic Chemistry, 2020. **95**.
169. Tadtong, S., R. Watthanachaiyingcharoen, and N. Kamkaen, *Antimicrobial Constituents and Synergism Effect of the Essential Oils from Cymbopogon citratus and Alpinia galanga*. Natural Product Communications, 2014. **9**(2): p. 277-280.
170. Budiati, T., et al., *Antimicrobial activity of essential oil from Indonesian medicinal plants against food-borne pathogens*. 1st International Conference on Food and Agriculture 2018, 2018. **207**.
171. De Silva, B.C.J., et al., *Comparative in vitro efficacy of eight essential oils as antibacterial agents against pathogenic bacteria isolated from pet-turtles*. Veterinarni Medicina, 2018. **63**(7): p. 335-343.
172. Serb, M.D., et al., *Study of thermal decomposition of a zinc(II) monomethyl terephthalate complex, [Zn(CH3O-CO-C6H4COO)(2)(OH2)(3)]center dot 2H(2)O*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2015. **121**(2): p. 691-695.
173. Vasile, O.R., et al., *Synthesis and characterization of nanostructured zinc oxide particles synthesized by the pyrolysis method*. Journal of Nanoparticle Research, 2012. **14**(12).
174. Oprea, O., et al., *The Influence of the Thermal Treatment on Luminescence Properties of ZnO*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2013. **8**(2): p. 747-756.
175. Oprea, O., et al., *Synthesis and characterization of ZnO nanostructures obtained in mixtures of ionic liquids with organic solvents*. Central European Journal of Chemistry, 2014. **12**(7): p. 749-756.
176. Oprea, O., et al., *Photoluminescence, Magnetic Properties and Photocatalytic Activity of Gd3+ Doped ZnO Nanoparticles*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2012. **7**(4): p. 1757-1766.
177. Voicu, G., et al., *Antibacterial Activity of Zinc Oxide - Gentamicin Hybrid Material*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2013. **8**(3): p. 1191-1203.
178. Radulescu, M., et al., *Advances in Drug Delivery Systems, from 0 to 3D Superstructures*. Current Drug Targets, 2018. **19**(4): p. 393-405.
179. Ficai, D., et al., *Metal Oxide Nanoparticles: Potential Uses in Biomedical Applications*. Current Proteomics, 2014. **11**(2): p. 139-149.
180. Oprea, O., et al., *ZnO Applications and Challenges*. Current Organic Chemistry, 2014. **18**(2): p. 192-203.
181. Pica, A., et al., *Antimicrobial performances of some film forming materials based on silver nanoparticles*. Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, 2012. **14**(9-10): p. 863-868.
182. Vasile, B.S., et al., *Wound Dressings Coated with Silver Nanoparticles and Essential Oils for The Management of Wound Infections*. Materials, 2020. **13**(7): p. 1682.
183. Khalir, W.K.A.W.M., et al., *In-Situ Biofabrication of Silver Nanoparticles in Ceiba pentandra Natural Fiber Using Entada spiralis Extract with Their Antibacterial and Catalytic Dye Reduction Properties*. Nanomaterials, 2020. **10**(6): p. 1104.
184. Nechifor, A.C., et al., *Removing of the Sulfur Compounds by Impregnated Polypropylene Fibers with Silver Nanoparticles-Cellulose Derivatives for Air Odor Correction*. Membranes, 2021. **11**(4): p. 256.
185. Kukushkina, E.A., et al., *Ag-Based Synergistic Antimicrobial Composites. A Critical Review*. Nanomaterials, 2021. **11**(7): p. 1687.
186. Lacatusu, I., et al., *New cosmetic formulations with broad photoprotective and antioxidative activities designed by amaranth and pumpkin seed oils nanocarriers*. Industrial Crops and Products, 2018. **123**: p. 424-433.
187. Mihaly, M., I. Lacatusu, and A. Meghea, *Sulphonephthalein chromophore as molecular probe in micelle systems*. Revista De Chimie, 2007. **58**(9): p. 929-932.
188. Niculae, G., et al., *Coencapsulation of Butyl-Methoxydibenzoylmethane and Octocrylene into Lipid Nanocarriers: UV Performance, Photostability and in vitro Release*. Photochemistry and Photobiology, 2013. **89**(5): p. 1085-1094.
189. Ipe, D.S., et al., *Silver Nanoparticles at Biocompatible Dosage Synergistically Increases Bacterial Susceptibility to Antibiotics*. Frontiers in Microbiology, 2020. **11**: p. 1074.
190. Mazur, P., et al., *Synergistic ROS-Associated Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles and Gentamicin Against Staphylococcus epidermidis*. International Journal of Nanomedicine, 2020. **15**: p. 3551-3562.