

Titre: Élaboration de nouveaux matériaux nanocomposites antibactériens
Title: à base de nanoparticules d'oxyde de zinc

Auteur: Hajer Rokbani
Author:

Date: 2018

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Rokbani, H. (2018). Élaboration de nouveaux matériaux nanocomposites antibactériens à base de nanoparticules d'oxyde de zinc [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/3042/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/3042/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Abdellah Ajji
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉLABORATION DE NOUVEAUX MATÉRIAUX NANOCOMPOSITES ANTIBACTÉRIENS
À BASE DE NANOPARTICULES D'OXYDE DE ZINC

HAJER ROKBANI

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE CHIMIQUE)

MARS 2018

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

ÉLABORATION DE NOUVEAUX MATÉRIAUX NANOCOMPOSITES ANTIBACTÉRIENS
À BASE DE NANOPARTICULES D'OXYDE DE ZINC

présentée par : ROKBANI Hajer

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Mme DESCHÊNES Louise, Ph. D., présidente

M. AJJI Abdellah, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. VIRGILIO Nick, Ph. D., membre

Mme KARBOUNE Salwa, Ph. D., membre externe

DÉDICACE

A mes précieux parents

À mon cher mari

À notre adorable fils

À mon cher frère et mes chères sœurs

À la mémoire des personnes chères qui nous ont quitté

REMERCIEMENTS

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il ! Alors j'y cède en disant un grand Merci aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Avant tout, je tiens tout particulièrement ma gratitude à mon directeur de recherche, le professeur Abdellah Ajji pour m'avoir accordé la chance de réaliser mon projet de doctorat au sein de son équipe. J'aimerais particulièrement le remercier pour ses précieux conseils et son soutien tout au long de mon parcours. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur. Je tiens également à le remercier pour tout le temps qu'il m'a consacré ainsi que l'environnement agréable de travail et l'atmosphère propice à l'entraide, à la collaboration et à l'échange scientifique, le tout dans la joie et la bonne humeur.

J'aimerais exprimer ma sincère reconnaissance aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer ce travail, à savoir Pr. Louise Deschênes, Pr. Nick Virgilio et Pr. Salwa Karboune .

Je suis très reconnaissante au Dr. Hesam Tabatabaei pour son aide, les longues discussions entretenues et ses précieux commentaires et suggestions durant les premières années de mon doctorat, qui ont contribué à fournir une base solide pour cette étude.

Je remercie amplement la professeure France Daigle du département de microbiologie, infectiologie et immunologie de l'Université de Montréal, pour son implication dans ce projet et pour son aide précieuse dans l'encadrement et la réalisation des essais microbiologiques. Je me dois aussi de remercier son associée de recherche, Dr. Ève-Lyne Quévillon, pour les formations et la supervision des analyses microbiologiques.

Je tiens aussi à remercier Pr. Marie Claude Heuzey et Pr. Basil Favis qui ont cru en mes compétences et m'ont donné la chance d'exercer dans les activités de leurs cours. Ceci m'a énormément aidé et m'a permis de conquérir une confiance et force additionnelle qui a abouti à l'achèvement du cursus.

Un grand merci à nos associés de recherche, Mélina Hamdine, Matthieu Gautier, Richard Silverwood, Redouane Boutrouka et notre irremplaçable Claire Cerclé, sans oublier les

techniciens Martine Lamarche et Gino Robin. Grâce au travail remarquable de tout ce beau monde, les interminables expérimentations auront été plus drôles et moins solitaires. Merci à Mariia Kopach, Valérie Baudart, Carmen Membreno Aguilar, Hélène Chatillon Évelyne Rousseau et Kalonji Gauthier pour leur aide et leur soutien continu.

J'adresse mes sincères remerciements à mes chères amies pour la vie Mounia, Hanan, et Nury pour tout leur soutien et leur incommensurable amitié.

Je sais tout particulièrement gré à mon amie, Mounia, pour sa relecture et ses conseils toujours très pertinents. Ses encouragements continus, sa motivation durant la rédaction de cette thèse et les discussions scientifiques entretenues durant les années de doctorat ne faisaient que rendre notre amitié encore plus sincère.

Je remercie aussi mon amie Hanan pour sa sincère amitié, et sa présence continuelle à mes côtés.

Merci à mes amies du groupe de la chaire 3S Pack Hoda, Shiva, Fatma, Jamal, Ramin, Omar, Ibrahim, Zahra, Raziye, Amir, Zohreh, Nusrat pour leurs suggestions et leurs analyses critiques pendant les réunions de la chaire.

Je dédie ce mémoire à ma chère famille, à savoir mon cher père, mon adorable mère, ainsi que mon frère, sa femme, et sans oublier bien sûr mon adorable sœur. Un très grand merci à cette famille en or qui m'a gratifié de son amour et fourni les motivations qui ont permis l'aboutissement de ce travail. C'est grâce à eux que je me suis parvenu à se hisser à ce niveau. Je vous serais reconnaissante toute au long de ma vie.

Je remercie mon cher mari pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général, ainsi que mon adorable fils qui est ma fierté et ma plus belle réussite. C'est eux qui étaient confrontés directement et vivaient les hauts et bas avec moi. Sans leur compréhension et patience, je ne saurais jamais comment faire pour en arriver.

La réalisation de cette thèse a été rendue possible grâce au financement octroyé par la chaire industrielle 3S Pack NSERC/Saputo/Prolamina. Qu'elle soit vivement remercié pour le support financier qu'elle m'a apporté durant ces années.

RÉSUMÉ

Il y a de plus en plus d'intérêt dans l'utilisation d'emballages intelligents ou actifs capables de répondre aux demandes des producteurs et des consommateurs pour des produits plus sûrs, avec une durée de conservation plus longue et une qualité supérieure. Les nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) sont apparues comme des candidates prometteuses pour une nouvelle génération de systèmes d'emballage alimentaire actif avec des propriétés antimicrobiennes. Ceci est dû à leur forte activité antibactérienne contre un large spectre de microorganismes d'origine alimentaire. Le ZnO est stable dans des conditions de mise en forme exigeantes, rentable et est reconnu comme un matériau sûr (GRAS) par la FDA (Food and Drug Administration).

Cette thèse vise à développer des matériaux polymères antibactériens à base de ZnO par deux procédés différents qui sont le procédé d'électrofilage et le revêtement ainsi que l'évaluation des propriétés antibactériennes des nanocomposites développés.

La première partie de ce travail s'est intéressée à l'étude de l'activité antibactérienne (AAB) des suspensions de nanoparticules de ZnO pures et de silice mésoporeuse dopée au ZnO (ZnO-UVM-7) ainsi que celle des nanofibres électrofilées contenant ces nanoparticules. Les propriétés antibactériennes ont également été évaluées en termes de concentration minimale inhibitrice (CMI) et de concentration minimale bactéricide (CMB) en présence de certains prétraitements (stérilisation et vibrations ultrasonores). La morphologie des nanofibres développées a été analysée par microscopie électronique à balayage (MEB), et la quantité de nanoparticules contenue dans les nanofibres a été analysée par analyse thermogravimétrique (ATG). L'activité antibactérienne des nanofibres d'acide polylactique (PLA) a été évaluée par la méthode dynamique selon la norme ASTM E2149 contre une bactérie à Gram-négatif (*Escherichia coli* (*E. coli*)). Les résultats ont indiqué un effet dépendant de la concentration sur la viabilité d'*E. coli*. Par ailleurs, la combinaison des vibrations ultrasonores et de la stérilisation a considérablement amélioré l'activité antibactérienne des suspensions de ZnO. Les nanofibres de PLA ont montré une morphologie fibreuse, avec un diamètre moyen allant de 350 à 450 nm, et leur activité antibactérienne a été réduite au-dessus d'une concentration seuil. La diminution de leur efficacité antibactérienne s'explique par la perte et l'agglomération de nanoparticules de ZnO lors du procédé de fabrication des nanofibres.

La deuxième partie a examiné les propriétés rhéologiques des solutions de PLA utilisées dans le procédé d'électrofilage et l'évaluation morphologique des nanofibres produites. En effet, l'effet des nanoparticules de ZnO, ZnO-UVM-7, SiO₂ et TiO₂ a été étudié pour différentes solutions et solvants (2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) et chloroforme) de PLA pour comprendre la morphologie des nanofibres. Les résultats ont montré que les solutions de PLA et de TFE avec une faible teneur en ZnO présentaient une viscosité plus élevée que celle du PLA pur, mais montraient une valeur maximale à 3 % (p/p). Une teneur plus élevée en ZnO a provoqué une diminution notable de la viscosité des solutions qui a été attribuée à la dégradation du PLA. Alors qu'en présence de chloroforme, la viscosité des solutions de PLA augmentait en augmentant la teneur en ZnO. Les autres nanoparticules analysées formaient des suspensions stables en présence de TFE. Un mécanisme de dégradation plausible du PLA dans les solutions a également été présenté.

Dans la troisième et dernière partie, une nouvelle approche simple pour enduire des films de polyéthylène à basse densité (LDPE) avec des nanoparticules de ZnO a été présentée. L'activité antibactérienne des films de LDPE a été évaluée vis-à-vis des bactéries Gram-positif et Gram-négatif. Les tests antibactériens ont prouvé que les films enduits de ZnO présentaient une inhibition considérable contre *E. coli* et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Les images MEB ont montré que l'utilisation de résine de LDPE modifiée par l'anhydride maléique (LDPE-g-AM) a permis d'améliorer la distribution des nanoparticules de ZnO sur la surface des films de LDPE, réduire la taille des agglomérats et renforcer la liaison de ZnO à la surface du film de LDPE. Les résultats ont également prouvé que les films recouverts conservaient leur efficacité antibactérienne envers *E. coli* même après 8 mois avec un taux de réduction supérieur à 99.9 %. Pour conserver une activité antibactérienne considérable, il est recommandé de laminer les films enduits avec une couche de polymère pur dont l'épaisseur ne dépasse pas 8 µm. Cette approche de revêtement a permis d'obtenir une efficacité antibactérienne considérable des nanoparticules de ZnO qui était totalement absente dans le cas où les nanoparticules de ZnO étaient mélangées avec le polymère à l'état fondu.

ABSTRACT

Interest has been growing recently in the use of intelligent or active packaging that can meet producers and consumers demands for safer products with longest shelf lives and higher quality. Zinc oxide (ZnO) nanoparticles have emerged as promising candidates for a new generation of active food packaging systems with antimicrobial properties particularly due to their strong antibacterial activity against a broad spectrum of food-borne microorganisms. ZnO is stable under harsh processing conditions, cost-effective and is generally recognized as safe materials (GRAS) by the FDA (The Food and Drug Administration).

This thesis aims at developing ZnO-based antibacterial materials by two different processes which are the electrospinning process and coating, as well as the evaluation of the antibacterial properties of the nanocomposites developed.

The first part of this work focused on the investigation of the antibacterial activity (ABA) of suspensions of pure ZnO nanoparticles and mesoporous silica doped with ZnO (ZnO-UVM-7) as well as electrospun polylactic acid (PLA) nanofibers containing those nanoparticles. The antibacterial properties were also evaluated in terms of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) with some pretreatments (sterilization and ultrasound vibrations). The morphology of the developed nanofibers mats was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and the amount of nanoparticles contained in the mats was analyzed by thermogravimetric analysis (TGA). The ABA of the PLA mats was assessed by the dynamic method according to the ASTM standard E2149 against a Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* (*E. coli*)). The results indicated a concentration-dependent effect on the viability of *E. coli*. Besides, the combination of the ultrasound stimulations and sterilization has considerably enhanced the ABA of the ZnO suspensions. PLA mats showed a fibrous morphology, with an average diameter ranging from 350 to 450 nm and their ABA was reduced above an optimal concentration. The decrease in their antibacterial efficiency was explained by the loss and agglomeration of ZnO nanoparticles.

The second part examined the rheological properties of PLA solutions used in the electrospinning of the PLA nanofibrous mats and their morphological evaluation. In fact, the effect of ZnO, ZnO-

UVM-7, SiO₂ and TiO₂ nanoparticles was investigated for various PLA solutions and solvents (2,2,2-trifluoroethanol (TFE) and chloroform) to understand the achieved morphology of the nanofibers. The results showed that PLA and TFE solutions with low loading level of ZnO nanoparticles exhibited higher viscosity than neat PLA ones, with a maximum value at 3 wt %. Higher content of ZnO caused a notable decrease in solutions viscosity which was attributed to PLA degradation. In the presence of chloroform, the viscosity of the PLA solutions increased always by increasing ZnO content. The others nanoparticles analyzed formed stable suspensions in the presence of TFE. A plausible degradation mechanism of PLA in TFE solutions was also presented.

In the third and last part, a new and simple approach to coat linear low density polyethylene (LDPE) films with ZnO nanoparticles was presented. The ABA of LDPE films were evaluated toward Gram-positive and Gram-negative bacteria. The antibacterial test proved that ZnO coated films showed considerable inhibition against *E. coli* and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). SEM images showed that the use of anhydride-modified LDPE (LDPE-g-AM) resin allowed an improvement in the distribution of ZnO nanoparticles on the surface of LDPE films, reduced the size of agglomerates and reinforced the bonding of ZnO nanoparticles to the surface of LDPE film. The results also proved that the coated films retained their antibacterial efficiency toward *E. coli*, even after 8 months, with a reduction rate higher than 99.9 %. To keep a considerable antibacterial activity, it is recommended to laminate the coated films with a neat LDPE layer whose thickness does not exceed 8 μm . This coating approach guaranteed a good antibacterial property of the ZnO nanoparticles that were absent in the case where they were compounded with the polymer in the melt state.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVIII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 Les agents antibactériens inorganiques	4
2.2 L'oxyde de Zinc (ZnO).....	5
2.2.1 Les propriétés de ZnO	5
2.2.2 Structure cristalline	5
2.2.3 Synthèse de ZnO	6
2.2.4 Modification des nanoparticules de ZnO	6
2.2.5 Domaines d'applications.....	7
2.2.6 Application du ZnO dans les emballages alimentaires	7
2.3 Propriétés antibactériennes de l'oxyde de zinc.....	9
2.3.1 Mécanisme d'action	10
2.3.2 Facteurs influençant la toxicité	14
2.3.3 Sensibilité des bactéries à Gram-positif versus Gram-négatif	16
2.4 La technologie d'électrofilage	17

2.4.1	Le procédé d'électrofilage	18
2.4.2	Paramètres influençant le procédé d'électrofilage	19
2.4.3	Électrofilage en présence des nanoparticules de ZnO.....	20
2.4.4	Activité antibactérienne des nanofibres à base de nanoparticules de ZnO	21
2.5	Procédé d'extrusion	22
2.6	Procédé de revêtement	23
2.7	Synthèse de la revue de littérature et frontière de connaissance	25
CHAPITRE 3 OBJECTIFS DE RECHERCHES, COHÉRENCES DES ARTICLES ET ORGANISATION DE LA THÈSE.....		26
3.1	Objectifs de recherche	26
3.2	Présentation des articles et cohérence avec les objectifs.....	27
CHAPITRE 4 ARTICLE 1: COMBINED EFFECT OF ULTRASOUND STIMULATIONS AND AUTOCLAVING ON THE ENHANCEMENT OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ZNO AND SIO2/ZNO NANOPARTICLES		29
4.1	Abstract	29
4.2	Introduction	30
4.3	Results	33
4.3.1	Combined effect of sterilization and ultrasound stimulations on the ABA of zinc oxide suspensions.....	33
4.3.2	MICs and MBCs of the zinc oxide suspensions.....	36
4.3.3	Fiber's porosity measurement.....	37
4.3.4	Thermogravimetric Analysis (TGA).....	38
4.3.5	Scanning Electron Microscopy (SEM)	38
4.3.6	ABA of PLA-based Nanofibers	40
4.4	Discussion	42

4.5	Materials and methods	47
4.5.1	Materials.....	47
4.5.2	Solutions preparation.....	48
4.5.3	Electrospinning process.....	48
4.5.4	Scanning Electron Microscopy (SEM)	49
4.5.5	Thermogravimetric Analysis (TGA).....	49
4.5.6	Fiber's porosity measurement.....	49
4.5.7	Antibacterial test	50
4.6	Conclusions	51
4.7	References	52
CHAPITRE 5 ARTICLE 2: RHEOLOGICAL PROPERTIES OF POLY(LACTIC ACID) SOLUTIONS ADDED WITH METAL OXIDE NANOPARTICLES FOR ELECTROSPINNING		58
5.1	Abstract	58
5.2	Introduction	59
5.3	Methodology	61
5.3.1	Materials.....	61
5.3.2	Solutions preparations	63
5.3.3	Electrospinning process.....	63
5.3.4	Characterization	63
5.4	Results and discussion.....	65
5.4.1	Rheological properties of PLA solutions used as precursors for electrospinning.....	65
5.4.2	Acid Value Analysis.....	75
5.4.3	Infrared Spectroscopy	77
5.4.4	Scanning Electron Microscopy (SEM)	79

5.5	Conclusions	82
5.6	References	83
CHAPITRE 6 ARTICLE 3: ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF LOW-DENSITY POLYETHYLENE-BASED FILMS COATED WITH ZNO NANOPARTICLES FOR POTENTIAL USE IN FOOD PACKAGING.....		87
6.1	Abstract	87
6.2	Introduction	88
6.3	Methodology	90
6.3.1	Materials.....	90
6.3.2	Preparation of ZnO-coated LDPE films.....	91
6.4	Characterization	92
6.4.1	Antibacterial tests.....	92
6.4.2	Morphology.....	93
6.5	Results and discussion.....	93
6.6	Conclusions	104
6.7	References	105
CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE		111
CHAPITRE 8 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....		116
8.1	Conclusions	116
8.2	Recommandations	117
RÉFÉRENCES.....		119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1: Les principales applications des nanofibres à base de ZnO.....	18
Table 4.1: MICs and MBCs of ZnO and ZnO-UVM-7 (Si/Zn=5) suspensions in mg/mL, after 24 h incubation at 37 °C in LB, against <i>E. coli</i> (DH5 α) bacteria for different treatments.....	36
Table 4.2: Porosity of PLA nanofibers scaffolds produced by the electrospinning process, measured by the liquid intrusion method at room temperature.....	37
Table 4.3: Estimation of ZnO-NPs amount in PLA mats produced by the electrospinning process, by using TGA under nitrogen (N ₂) atmosphere from 25 to 800 °C, at a rate of 10 °C/min. .	38
Table 6.1: Different temperature profiles used to produce the LDPE films by the TSE, where T1= 190, T2= 200 and T3= 220 °C.....	91

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1: Les différents mécanismes responsables de l'activité antibactérienne des nanoparticules de ZnO [13].....	11
Figure 2.2: Mécanisme de formation des EROs à partir des nanoparticules de ZnO [15].....	13
Figure 2.3: Parois bactérienne des bactéries à Gram-négatif et des bactéries à Gram-positif [16].	17
Figure 4.1: The effect of sterilization and ultrasound stimulations on the ABA of ZnO-NPs, in LB suspensions against <i>E. coli</i> (DH5 α), after incubation at 37 °C for 24 h. Data are shown with mean values and standard errors of bacterial counts.	34
Figure 4.2: The effect of sterilization and ultrasound stimulations on the ABA of ZnO-UVM-7 (Si/Zn=5) material, LB suspensions against <i>E. coli</i> (DH5 α), after incubation at 37 °C for 24 h. Data are shown with mean values and standard errors of bacterial counts.	35
Figure 4.3: Morphology of electrospun PLA based mats: (a) PLA (10 % wt/vol), 1 wt % ZnO in TFE (0.5 mL/h, 35 KV, 15 cm), (b) PLA (10 % wt/vol), 1 wt % ZnO-UVM7 (Si/Zn = 5) in TFE (0.5 mL/h, 35 KV, 15 cm) and (c) and (d) are fiber diameter distribution of (a) and (b), respectively. The scale bars represent 10 μ m.....	39
Figure 4.4: ABA of electrospun PLA/ZnO nanofibers with different ZnO content, against <i>E. coli</i> (DH5 α), after incubation at 37 °C for 4 h in PBS solutions. Data are shown with mean values and standard errors of bacterial counts.	40
Figure 4.5: ABA of electrospun PLA/ZnO-UVM-7 nanofibers with different ZnO-UVM-7 content, for 3 different molar ratio (5, 25 and 25), against <i>E. coli</i> (DH5 α), after incubation at 37 °C for 4 h in phosphate-buffered saline solutions. Data are shown with mean values and standard errors of bacterial counts.	41
Figure 5.1: TEM images of ZnO-UVM-7 materials: a UVM-7(Si/Zn = ∞); and b UVM-7(Si/Zn = 5) [37].	62
Figure 5.2: Viscosity of PLA solutions with different contents of ZnO as a function of shear rate in TFE at 25 °C: a 5 days; and b 25 days after the preparation of solutions.	66

Figure 5.3: Viscosity of PLA solutions as a function of ZnO contents, at a shear rate of 1 s^{-1} , in TFE for 5 and 25 days, respectively after the preparation of solutions.	67
Figure 5.4: Viscosity of PLA solutions with different contents of ZnO as a function of shear rate in chloroform at 25 °C: a 5 days; and b 25 days after the preparation of the solutions.....	69
Figure 5.5: Viscosity of PLA solutions as a function of ZnO contents, at a shear rate of 1 s^{-1} , in chloroform for 5 and 25 days, respectively after the preparation of solutions.....	70
Figure 5.6: Viscosity of the PLA solutions with different contents of ZnO-UVM-7 as a function of shear rate in TFE at 25 °C: a 5 days; and b 25 days after the preparation of solutions.....	71
Figure 5.7: Viscosity of PLA solutions with different contents of SiO_2 as a function of shear rate in TFE at 25 °C a 5 days; and b 25 days after the preparation of solutions.	73
Figure 5.8: Viscosity of the PLA solutions with different contents of TiO_2 as a function of shear rate in TFE at 25 °C: a 5 days; and b 25 days after the preparation of the solutions.....	74
Figure 5.9: Av of neat PLA and PLA/NPs solutions in: a chloroform; and b TFE at 25 °C.....	76
Figure 5.10: FT-IR spectra of PLA pellets, PLA-TFE and PLA-2 % ZnO TFE suspensions.	78
Figure 5.11: SEM images of: a Neat PLA-TFE; and b PLA-TFE-5 % ZnO mats produced by the electrospinning process (1 mL/h, 15 cm, 20 KV) from suspension kept 60 days after preparation.....	80
Figure 6.1: Inhibitory effects of different FPS and Bynel films toward <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> at 1 month post-preparation.	93
Figure 6.2: SEM and EDS analysis (by SEM) of the surface of (a), (c): FPS-T3 and (b), (d): Bynel-T3 films. For EDS samples were analyzed with a mapping mode operating at 15 KV.	95
Figure 6.3: Inhibitory effects of FPS-T3 and Bynel-T3 films towards <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> at 1, 5 and 8 months after their preparation.	97
Figure 6.4: Inhibitory effects of treated and untreated FPS-T3 and Bynel-T3 films toward <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> . The films were shacked in an ultrasonic bath during 20 minutes and then dried in air.	99

Figure 6.5: SEM and EDS analysis of the surface of (a), (c): FPS-T3 and (b), (d): Bynel-T3 films surface after washing 20 minutes in a ultrasonic bath. EDS samples were analyzed with a mapping mode operating at 15 KV.100

Figure 6. 6: (a) Inhibitory effects of different FPS and Bynel films towards *E. coli* and *S. aureus*. The films were coated by dipping in FPS 317A /xylene solution. (b) Distribution of the thickness of the coating layer in μm103

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ATG	Analyse thermogravimétrique
ASTM	American Standards for Testing and Materials
BOPLA	Acide polylactique bi-orienté
BOPP	Polypropylène bi-orienté
CF	Chloroforme
CFU/mL	Unités formant colonies par millilitre
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DCM	Dichlorométhane
DLC	Date limite de consommation
DMF	<i>N,N</i> -Diméthyle formamide
EDS	Analyse dispersive en énergie
EROs	Espèces réactives de l'oxygène
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier
GRAS	Generally Regarded As Safe
IR	Infrarouge

LB	Luria-Bertani
LDPE	Polyéthylène à basse densité
LDPE-g-AM	Polyéthylène à basse densité greffé avec l'anhydride maléique
LLDPE	Polyéthylène à basse densité linéaire
MAH	Anhydride maléique
MEB	Microscope électronique à balayage
MET	Microscope électronique à transmission
NFs	Nanofibres
NMR	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire
NPs	Nanoparticules
PAN	Polyacrylonitrile
PBS	Poly(butylène succinate)
PBS	Tampon phosphate salin
PCL	Polycaprolactone
PET	Poly(téréphtalate d'éthylène)
PLA	Acide polylactique
PLA-NFs	Nanofibres d'acide polylactique
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
PP	Polypropylène

PU	Polyuréthane
PVA	Alcool polyvinylique
PVC	Poly(chlorure de vinyle)
Si/Zn	Ratio molaire
SiO ₂	Silice ou dioxyde de silicium
TEM	Microscope électronique à transmission
TFA	Acide trifluoroacétique
TFE	2,2,2-Trifluoroéthanol
Tg	Température de transition vitreuse
TiO ₂	Oxyde de titane
TSE	Extrudeuse bi-vis
UFC/mL	Unités formant colonies par millilitre
UV	Rayonnement ultraviolet
UVA	Rayonnement ultraviolet 315-400 nm
UVB	Rayonnement ultraviolet 280-315 nm
ZnO	Oxyde de zinc
ZnO-NPs	Nanoparticules de ZnO
ZnO-UVM-7	silice mésoporeuse dopée avec du ZnO

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Le gaspillage alimentaire, défini au Québec comme " *toute denrée consommable jetée à la poubelle en raison d'une mauvaise gestion*", peut survenir à toutes les étapes de la chaîne agroalimentaire, de la production/transformation jusqu'à la consommation en passant par le stockage et la distribution. Néanmoins, le consommateur reste le plus grand responsable avec 47 % du gaspillage. Chaque année, mondialement, 1.3 milliard de tonnes de denrées encore comestibles sont jetées à la poubelle, soit en raison d'une manipulation ou d'un transport inadéquats pouvant entraîner une contamination par les bactéries, ou le plus souvent en raison de l'expiration de la date limite de consommation (DLC) qui se traduit par le développement d'une flore d'altération. Les pays de l'Amérique du Nord et de l'Europe sont les plus touchés par ce phénomène. Au Canada le coût du gaspillage ne cesse d'augmenter, et est passé de 27 milliards de dollars en 2010 à 31 milliards de dollars en 2014 [1].

Par ailleurs, les maladies d'origines alimentaires ne cessent d'augmenter dans le monde entier. Ceci est probablement le résultat de changements radicaux à travers les différentes étapes de la chaîne alimentaire ainsi que la mondialisation et la libération du commerce alimentaire [2]. La demande croissante pour les aliments prêts-à-manger, figure parmi ces changements, représentant ainsi un défi à la salubrité et la qualité des aliments [3]. Le Canada est l'un des pays dont la population a été touchée par l'éclosion d'agents pathogènes. Le gouvernement canadien estime qu'il y a 4 millions de cas de maladies d'origine alimentaire chaque année au Canada. Des agents pathogènes comme *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* et *Staphylococcus* ont été signalés dans des produits avariés tels que la viande et le porc crus, la charcuterie, les huîtres, les cantaloups, les épinards et le fromage [4, 5]. Les intoxications alimentaires causées par l'ingestion des aliments contaminés peuvent s'avérer sévères, entraînant des nausées, des vomissements ou des diarrhées et même la mort.

La nanotechnologie a été exploitée dans l'industrie de l'emballage alimentaire pour fournir des solutions aux défis rencontrés par ce secteur, en assurant la sécurité pour le consommateur et en réduisant les pertes économiques.

Une solution commune à ces deux fléaux majeurs, que sont le gaspillage et les intoxications alimentaires serait le développement de nouveaux matériaux d'emballage alimentaire ayant des propriétés antibactériennes. La fonction assurée par de tels matériaux est l'inhibition de la croissance des microorganismes pathogènes responsables de l'insalubrité de l'aliment emballé, prolongeant ainsi sa durée de conservation.

À cet égard, l'oxyde de zinc (ZnO) est un candidat prometteur à exploiter comme agent antibactérien dans les emballages alimentaires antibactériens. Le ZnO est exploité dans diverses applications de la vie quotidienne telles que les cosmétiques, l'administration des médicaments ou les équipements médicaux grâce à un large spectre d'activité antibactérienne. Il a un prix abordable contrairement à l'argent (Ag) ou l'or (Au) qui ne peuvent pas être exploités à l'échelle industrielle à cause de leur prix assez élevé [6]. L'activité antibactérienne de ZnO ne nécessite pas une activation par la lumière UV, comme c'est le cas pour l'oxyde de titane (TiO₂), ce qui représente un avantage majeur pour l'industrie des emballages alimentaires [7]. Le ZnO est reconnu par sa stabilité thermique et chimique assez élevée et est actuellement reconnu par la FDA comme un matériau sécuritaire. L'inconvénient principal de ZnO à l'échelle nanométrique est son aptitude à s'agglomérer, qui est due à son énergie de surface et son hydrophobicité assez élevée.

Bien que les propriétés antibactériennes des solutions de ZnO aient été largement rapportées et que plusieurs études s'y sont intéressées, une grande majorité de ces études ont porté sur l'effet dû aux propriétés intrinsèques des nanoparticules, l'effet des prétraitements que peuvent revoir ces nanoparticules et leurs solutions n'a pas été abordé.

La morphologie et l'efficacité antibactérienne des nanofibres de polymère contenant des nanoparticules de ZnO ont été étudiées en vue d'une potentielle application de ces nanomatériaux dans le domaine médicale ou biomédicale. De plus si quelques unes parmi ces études ont examiné l'effet de la concentration en nanoparticules de ZnO sur la viscosité des suspensions, l'effet combiné de la nature des nanoparticules ("bare" ou modifiées) et du solvant sur la stabilité des suspensions au cours du temps n'a jamais été abordé.

Les revêtement à base de nanoparticules de ZnO ont suscité beaucoup d'intérêt dans le secteur de l'emballage alimentaire et ont été élaborés par une multitudes de procédés. Cependant le procédé exploité pendant ce projet est plus simple et n'a jamais été développé auparavant.

Le présent travail de recherche étudie les propriétés antibactériennes de différentes poudres de ZnO en suspensions et l'effet de certains prétraitements sur ces propriétés. L'effet de la nature des nanoparticules et du solvant sur les suspensions d'électrofilage ainsi que leur effet sur la morphologie finale des nanofibres à base de ZnO sont aussi examinés. Les propriétés antibactériennes des nanofibres produites par le procédé d'électrofilage et des films produits par le procédé de revêtement ont été évaluées par la suite.

Organisation de la thèse

Cette thèse est basée sur trois articles qui ont été publiés ou acceptés dans des journaux scientifiques avec comité de lecture.

Ce manuscrit est divisé en trois sections qui sont organisées comme suit:

Le chapitre 2 fournit une revue de littérature et les frontières des connaissances en rapport avec l'activité antibactérienne de l'oxyde de zinc et de ses nanocomposites et le chapitre 3 établit les objectifs de recherche et la cohérence des articles.

Les chapitres 4,5 et 6 présentent les trois articles et décrivent les principales réalisations et contributions de ce travail.

Le chapitre 7 présente la discussion générale des principaux résultats et le chapitre 8 est consacré aux conclusions de cette thèse ainsi que les recommandations pour les travaux futurs.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Les agents antibactériens inorganiques

L'émergence des agents pathogènes résistants aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique et, par conséquent, de nombreuses études ont été rapportées pour améliorer les solutions antimicrobiennes actuelles. Il est connu que plus de 70 % des infections bactériennes sont résistantes à un ou plusieurs antibiotiques, généralement utilisés pour éradiquer l'infection. Le développement de nouveaux agents antimicrobiens efficaces semble donc être d'une importance primordiale. Ainsi, l'exploitation de nanoparticules de métaux et d'oxydes métalliques comme agents antibactériens pourrait être considérée comme un moyen pour résoudre ce problème. Les nanoparticules métalliques comme l'argent (Ag) ou l'or (Au) ou des oxydes métalliques comme l'oxyde d'argent (Ag_2O), l'oxyde de cuivre (CuO), l'oxyde de titane (TiO_2), l'oxyde de calcium (CaO) ou l'oxyde de zinc (ZnO) ont été reconnues par leur activité antibactérienne considérable. En les comparant aux agents organiques, les oxydes métalliques sont plus stables aux hautes températures et pressions et ont une durée de vie plus longue. Plusieurs d'entre eux sont non seulement considérés comme des matériaux non toxiques pour les êtres humains mais contiennent aussi des minéraux essentiels pour la santé humaine [8]. Les composants inorganiques de taille nanométrique sont connus pour leur activité antimicrobienne assez prononcée même à des faibles doses, grâce à un rapport surface/volume assez élevé et des propriétés chimiques et physiques uniques. La nature des matériaux utilisés pour la synthèse de ces nanoparticules ainsi que leur taille sont deux facteurs importants qui affectent leur efficacité antibactérienne. Ces nanoparticules nanométriques ont des propriétés différentes de leurs analogues de plus grande taille en raison du fait que le rapport surface/volume des nanoparticules croît considérablement avec la diminution de la taille [9]. Les propriétés morphologiques et physicochimiques peuvent aussi avoir un effet sur l'activité antibactérienne des métaux de tailles nanométriques. En effet, les nanoparticules les plus petites sont dotées de l'effet bactéricide le plus puissant. La surface des nanoparticules est positivement chargée, ce qui facilite leur interaction avec la surface bactérienne qui est négativement chargée, ce qui peut induire une amélioration de l'effet bactéricide. La forme des nanoparticules a aussi une influence sur leur

efficacité antibactérienne [10]. Parmi les oxydes métalliques cités ci-dessus, le ZnO se distingue par sa durabilité, sa haute sélectivité et sa biocompatibilité.

2.2 L'oxyde de Zinc (ZnO)

L'oxyde de zinc se présente sous forme de poudre blanche inodore. Dans la section qui suit, certaines propriétés physicochimiques de l'oxyde de zinc ainsi que les domaines d'application seront développées.

2.2.1 Les propriétés de ZnO

Le ZnO est un matériau polyvalent grâce à ses diverses propriétés chimiques et physiques uniques telles qu'une grande stabilité chimique et thermique, une longue durabilité, une haute sélectivité, un coefficient de couplage élevé, une large gamme d'absorption de radiations UV et une photo-stabilité élevée [11]. Le ZnO est un semi-conducteur direct avec une large bande interdite dans le proche ultra-violet (≈ 3.3 eV à température ambiante) [12]. Il est classé comme un semi-conducteur de type II-IV et est sur la frontière entre semi-conducteur ionique et covalent [11]. Même à température ambiante, l'énergie d'exciton considérable du ZnO (≈ 60 meV à température ambiante) permet une émission fiable [13]. Le ZnO est très stable à haute température avec une température de fusion de 1975 °C. Il est caractérisé par une densité de 5.6 g/cm³ [14]. Les nanoparticules de ZnO sont reconnues comme des substances non-toxiques et biocompatibles [13]. Actuellement, le ZnO est l'un des cinq composants du zinc qui sont reconnus par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA), comme des substances sécuritaires (21CFR182.8991) [15].

2.2.2 Structure cristalline

Il existe deux formes cristallographiques du ZnO: la forme hexagonale (wurtzite) et la forme cubique (rocksalt et zinc blende) [15]. La structure wurtzite est la plus stable thermodynamiquement [16], chaque atome de zinc est lié à 4 atomes d'oxygène pour former un tétraèdre [17].

2.2.3 Synthèse de ZnO

En raison de ses vastes domaines d'application, diverses méthodes de synthèse ont été employées pour développer une variété de nanostructures de ZnO (fils, tiges, tubes, particules, et autres) [14]. Les différentes approches utilisées pour la synthèse des nanoparticules de ZnO peuvent être classées en deux catégories, les procédés chimiques et les procédés physiques. Généralement, les procédés chimiques sont plus simples à mettre en œuvre avec un large éventail de paramètres permettant un meilleur contrôle de la morphologie et de la taille des particules [13]. En effet, les techniques de synthèse chimiques en solution telles que la méthode hydrothermale ou la méthode sol-gel sont efficaces et sont les plus couramment utilisées car peu coûteuses et respectueuses de l'environnement [14].

2.2.4 Modification des nanoparticules de ZnO

Certains des inconvénients majeurs pouvant limiter les procédés de synthèse ou d'exploitation des nanoparticules de ZnO dans certains domaines sont leur tendance à s'agglomérer et à précipiter ainsi que leur difficulté de solubilisation [13]. En effet, les nanoparticules de ZnO ont une énergie de surface assez élevée, ce qui pourrait favoriser leur agglomération [18]. Pour y remédier, certaines études se sont focalisées sur les méthodes de modification de la surface de ces nanoparticules sans pour autant nuire à leurs propriétés physicochimiques. L'objectif de la fonctionnalisation est le changement de la surface spécifique et de la taille des nanoparticules de ZnO, l'amélioration de leur dispersion, l'amélioration de leur compatibilité et leur dispersion dans les matrices organiques ou encore l'introduction de nouveaux groupement fonctionnels à leurs surfaces [11]. À cet effet, différentes méthodes de modifications sont déployées et peuvent être classées en trois catégories, selon la nature de l'agent modificateur. Les agents peuvent être des composés inorganiques comme la silice SiO_2 [19], l'oxyde d'aluminium Al_2O_3 [20] ou des composés organiques tels que les acides [21] ou les silanes [22] organiques, ou tout simplement un polymère tels que le poly(méthyle méthacrylate) (PMMA) [18].

2.2.5 Domaines d'applications

En raison de ses diverses propriétés à la fois chimiques et physiques, le ZnO est largement utilisé dans de nombreux domaines.

Dans l'industrie plastique, le ZnO est utilisé comme agent de réticulation [23], agent antibactérien [24] ou bien encore pour modifier les propriétés électriques des nanocomposites [25]. Le ZnO peut absorber en UVA (315-400 nm) et en UVB (280-315 nm), ce qui lui confère une utilité particulière en tant qu'agent protecteur contre les UV [26], d'où son intervention dans les formulations des crèmes solaires [27]. Dans le domaine pharmaceutique et médical, le ZnO peut être utilisé dans les formulations de pommades, de pâtes dentaires, de pansements [11], dans les nanocomposites servant au développement des implants médicaux [28] qui sont fréquemment infectés. Le côté sécuritaire du ZnO et sa compatibilité avec la peau humaine font de lui un additif approprié pour les matériaux qui sont en contact direct avec le corps humain. D'ailleurs, le ZnO est utilisé dans l'élaboration de textiles hydrofuge, autonettoyant [11], anti-UV [29] ou antibactérien [30, 31]. Le ZnO peut également être utilisé dans la fabrication des équipements électroniques, des capteurs, des lasers UV et des cellules solaires [32]. Le ZnO peut être exploité également dans la dégradation photocatalytique des polluants organiques [33, 34]. Dans l'industrie alimentaire, le ZnO a été utilisé dans les compléments alimentaires, les céréales pour le petit déjeuner ou dans les aliments pour animaux [15].

2.2.6 Application du ZnO dans les emballages alimentaires

Les nanoparticules de ZnO ont démontré une toxicité sélective envers une large gamme de bactéries à Gram-positif et Gram-négatif incluant les pathogènes d'origine alimentaire, tels que *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) et *S. aureus* [35]. Grâce à leur taille nanométrique et à leur réactivité de surface, ces nanoparticules peuvent doter les matériaux d'emballage alimentaire d'une activité antimicrobienne pour empêcher la prolifération d'une flore d'altération et pathogènes dans les aliments.

Ainsi, l'activité antibactérienne du ZnO à l'échelle nanométrique pourrait fournir des stratégies novatrices, abordables et sécuritaires pour le domaine de l'emballage.

Li et al. [36] ont remarqué que la détérioration des pommes "Fuji" a été réduite suite à l'utilisation des films de poly(chlorure de vinyle) (PVC) enduits avec des nanoparticules de ZnO. En effet, la croissance des microorganismes a été réduite et les indicateurs de qualité comme la teneur en acide ascorbique et en poly-phénols ont été préservés [36]. Emamifar et al. [37] ont démontré qu'un emballage de LDPE et de nanoparticules de ZnO et Ag pouvait préserver et étendre la durée de vie du jus d'orange frais stocké à 4 °C jusqu'à 28 jours sans détruire ses qualités comme la teneur en acide ascorbique et la couleur [37]. Dans une autre étude, le même groupe a conclu que l'utilisation d'un emballage de jus d'orange à base de LDPE et de nanoparticules de ZnO ou de Ag pouvait être une bonne alternative pour désactiver le *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) à 4 °C. Néanmoins, les emballages contenant des nanoparticules de Ag étaient plus efficaces que ceux contenant les nanoparticules de ZnO dans l'élimination de *L. plantarum* après un stockage de 112 jours [38]. Dans une étude plus récente, Emamifer et al. [39], ont prouvé que, suite à l'utilisation d'un nanocomposite à base de LDPE et de nanoparticules de ZnO, la durée de vie des fraises fraîches a été allongée de 16 jours sans avoir d'effet négatif sur leur teneur en acide ascorbique. Ceci a été obtenu en gardant la densité microbienne des fraises stockées à 4 °C en dessous du seuil qui affecte la durée de vie, grâce à l'activité antibactérienne des nanoparticules de ZnO [39]. La combinaison de l'isothiocyanate d'allyle avec la nisine et les nanoparticules de ZnO dans un revêtement à base de PLA pour des bocaux en verre a permis d'inhiber la croissance de *Salmonella* dans l'albumen d'œufs liquide [40]. Panea et al. [41] ont prouvé qu'un emballage à base de LDPE et de nanoparticules de ZnO et de Ag a un effet antibactérien à la fois quand il est testé *in vitro* et quand il est testé sur les poitrines de poulet. En effet, cet emballage était capable de réduire la population d'*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) et *L. monocytogenes* avec un taux de réduction qui dépasse les 4 logs UFC/mL (unités formants colonies par millilitre). Avec un tel emballage, les taux de migration des nanoparticules enregistrés étaient en-dessous de ceux autorisés par la réglementation. Ainsi, la détérioration des poitrines de poulet ainsi que l'oxydation des lipides ont été retardés [41]. Dans une autre étude, les nanoparticules sphériques de ZnO ayant une taille moyenne de 50 nm, ont été mélangées à l'alginate de calcium pour développer un emballage pour la volaille prête à manger. Cet emballage a prouvé son efficacité contre *S. Typhimurium* et *S. aureus*, en réduisant leurs populations de 7 logs UFC/mL après un stockage de la saucisse de

volaille emballée à 8 °C pendant 10 jours. Aucune cellule bactérienne vivante n'a été détectée après une période de 6 et 8 jours, pour *S. aureus* et *S. Typhimurium*, respectivement [42].

D'autres nanocomposites antibactériens ont été développés en vue de les exploiter comme emballages alimentaires qui pourraient détruire les pathogènes d'origine alimentaire et augmenter la durée de vie des aliments. Mais pour ces recherches, ces systèmes actifs n'ont pas été testés sur les aliments. En effet leur efficacité antibactérienne a été seulement prouvée *in vitro*.

Par exemple, Tankhiwale et Bajpai [6] ont réussi à synthétiser *in situ* des nanoparticules de ZnO dans un réseau d'amidon qui a été déposé sur des films de LDPE. Les résultats fournis par le test d'inhibition ont prouvé que ces films ont exercé une bonne activité contre *E. coli* [6]. On peut citer aussi d'autres nanocomposites antibactériens qui ont été élaborés à l'aide des nanoparticules de ZnO et divers polymères comme le PLA [43], le PVC [44, 45], le poly(butylène succinate) (PBS) [46], et le poly(téréphtalate d'éthylène) (PET) [7].

2.3 Propriétés antibactériennes de l'oxyde de zinc

Les investigations portant sur l'activité antimicrobienne du ZnO ont commencé au début des années 1950. Néanmoins, le vrai mouvement vers l'utilisation du ZnO comme agent antimicrobien était en 1995, quand Sawai et ses collègues ont trouvé que les poudres de ZnO, MgO et CaO sont dotées d'une activité antimicrobienne considérable contre certaines souches de bactéries [47-49].

Les propriétés antibactériennes des nanoparticules de ZnO ne sont plus à prouver. Plusieurs études ont montré leur potentiel antibactérien contre les bactéries à Gram-positif (*Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *S. aureus*) [49-52], les bactéries à Gram-négatif (*E. coli*, *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), *Salmonella enterica*) [35, 49-51, 53, 54] et les levures pathogènes (*Candida albicans* (*C. albicans*), *Aspergillus niger* (*A. niger*)) [55, 56]. Zhang et al. [53] ont rapporté que les suspensions de ZnO ont un effet bactériostatique contre *E. coli* (évalué par la mesure de densité optique). Après 8 heures de traitement avec des suspensions de 0.25 g/L de ZnO, *E. coli* avait encore enregistré une faible croissance [53]. Cet effet a été aussi démontré auparavant par certaines études, bien que les méthodes de quantification de l'activité antibactérienne étaient basées sur la conductimétrie [49, 57]. Sawai [49] a évalué l'activité antibactérienne des poudres de ZnO contre *E. coli* et *S. aureus* en mesurant le changement de la conductivité électrique du

milieu de croissance. L'auteur a également estimé la CMI à 32.4 et 0.99 mg/mL pour *E. coli* et *S. aureus*, respectivement [49]. À l'aide des tests antibactériens réalisés dans des milieux de LB (Luria Bertani) liquides et solides, Reddy et al. [58] ont montré que la croissance des populations d'*E. coli* et *S. aureus* a été inhibée à une concentration en ZnO de 3.4 et 1 mM, respectivement [58]. Ces résultats étaient similaires à ceux obtenus par Emami Karvani et Chehrazhi [51] qui ont trouvé que la croissance d'*E. coli* et *S. aureus* a été inhibée à des concentrations de 3.1 et 1.5 mg/mL de ZnO, respectivement [51]. Brayner et al. [54] ont consolidé ces résultats où une concentration entre 10^{-2} et 3×10^{-3} M a causé l'inhibition de 100 % de la croissance d'*E. coli*, alors qu'une concentration entre 3×10^{-3} et 1.5×10^{-3} M a éradiqué 85 % de la population. En revanche, à des concentrations plus faibles (1.5×10^{-3} et 1×10^{-3} M), une croissance de la bactérie *E. coli* a été notée [54]. Le même phénomène a été observé par Reddy et al. [58] où 1 mM de ZnO a fait hausser la population d'*E. coli* [58]. Il est à noter que des faibles teneurs en ZnO pourraient augmenter la croissance d'*E. coli* mais de telles concentrations sont potentiellement toxiques pour *S. aureus*.

2.3.1 Mécanisme d'action

Le mécanisme antibactérien des nanoparticules de ZnO soulève de vives discussions dans la littérature. Les principales hypothèses proposées sont récapitulées dans la figure ci-dessous. Le mécanisme d'action antibactérien des nanoparticules de ZnO fait intervenir trois différents modes à savoir (1) la génération d'espèces réactives de l'oxygène (EROs); (2) la libération des ions Zn^{2+} ; (3) l'interaction entre les bactéries et les nanoparticules de ZnO.

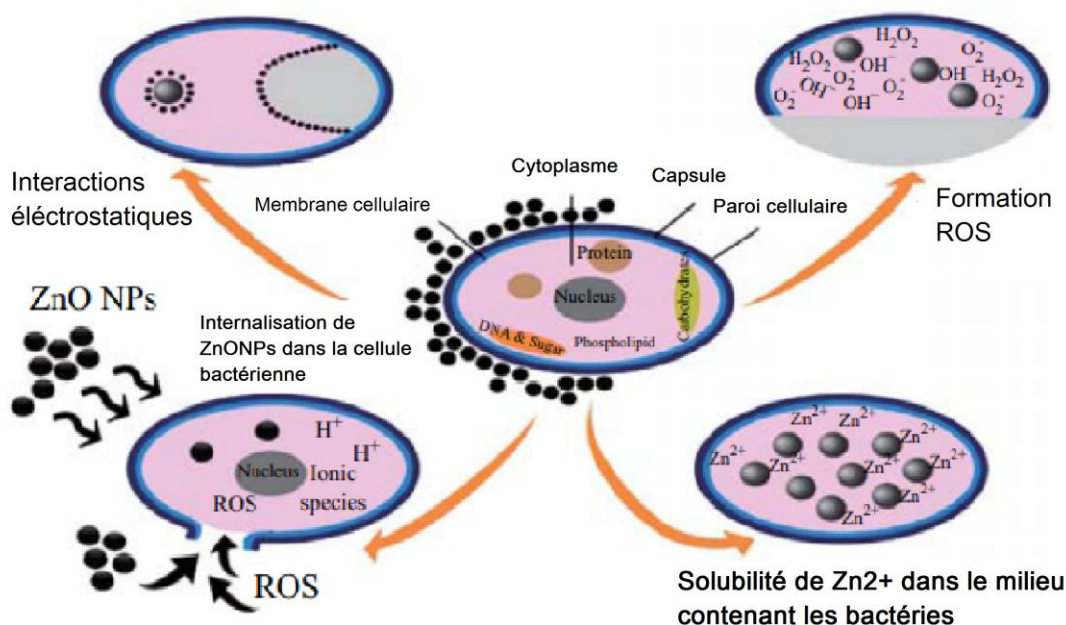


Figure 2.1: Les différents mécanismes responsables de l'activité antibactérienne des nanoparticules de ZnO [13].

2.3.1.1 Génération d'espèces réactives de l'oxygène (EROs)

Plusieurs études ont affirmé que la formation des EROs est le principal mécanisme responsable de l'activité antibactérienne de ZnO [15, 48, 52, 57, 59-61]. La génération des EROs (Figure 2.2) comme le radical hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) résulte de l'activation des nanoparticules de ZnO par la lumière UV [15]. En tenant compte que le ZnO est un matériau semi-conducteur, un rayonnement incident ayant une énergie de photons supérieure à la valeur de sa largeur de bande interdite (3.3 eV) engendre un mouvement d'électrons de la bande de valence (BV) vers la bande de conduction (BC) de la nanoparticule. Ainsi, il y aura formation d'un trou (h^+) dans la bande de valence et d'un électron libre (e^-) dans la bande de conduction. Le trou (h^+) réagit avec les molécules d'eau pour former des $\bullet\text{OH}$ et des H^+ . Les molécules d'oxygène réagissent avec l'électron pour donner des radicaux superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$), qui à leur tour réagissent avec les ions H^+ , puis avec un électron, puis encore une fois avec les ions H^+ , pour générer les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) [15, 16]. Sawai et al. [47] avaient

mesuré la concentration des EROs produites à partir des boues de ZnO à l'aide d'analyses électrochimiques de l'oxygène. Il ont trouvé que la concentration des EROs est linéairement proportionnelle à la concentration des nanoparticules de ZnO [47]. Ces résultats ont été également confirmés par Jalal et al. [59]. Tayal et al. [62] ont consolidé ces constatations et ont conclu que la concentration des EROs augmente avec la diminution de la taille des particules de ZnO [62]. Étant donné que les radicaux hydroxyles ainsi que les superoxydes sont négativement chargés, ils ne sont pas capables de pénétrer à travers la membrane cellulaire. Par conséquent, ils doivent demeurer en contact direct avec la surface extérieure de la bactérie. En contrepartie, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pourrait pénétrer à l'intérieure de la cellule bactérienne [60], induire ainsi certains types de lyse et inhiber la croissance des cellules [48]. Les EROs générées peuvent éventuellement causer l'oxydation de la membrane lipidique au niveau de la paroi cellulaire d'*E. coli* [16]. Cependant la génération des EROs semble être un phénomène plus complexe et parfois contradictoire, étant donné que certaines études ont enregistré une activité antibactérienne des nanoparticules de ZnO dans l'obscurité [50, 63], alors que Raghupathi et al. [64] ont énoncé que l'amélioration de l'activité antibactérienne de ZnO était due principalement à l'augmentation de la production des EROs à la lumière UV [64]. Adams et al. [50] ont découvert que les nanoparticules de ZnO peuvent exercer une activité antibactérienne même dans l'obscurité [50]. Hirota et al. [63] ont aussi trouvé que des nanoparticules de ZnO ayant un diamètre moyen de 30 nm peuvent exercer une activité antibactérienne durable contre *E. coli* en l'absence de lumière. Ils ont ainsi supposé que cette activité peut découler de la génération d'anions superoxydes [63]. Ces résultats indiquent que des mécanismes additionnels restent à déterminer en ce qui concerne la génération des EROs en l'absence de lumière.

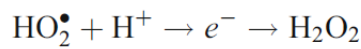
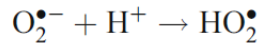
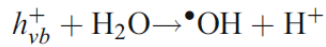
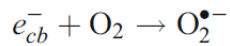
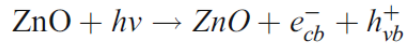


Figure 2.2: Mécanisme de formation des EROs à partir des nanoparticules de ZnO [15].

2.3.1.2 Libération des ions Zn^{2+}

Parmi les principaux mécanismes antibactériens proposés pour l'activité des nanoparticules de ZnO, figure la libération des ions Zn^{2+} . La libération des ions Zn^{2+} dépend essentiellement des propriétés physicochimiques des nanoparticules telles que la taille, la concentration et la morphologie ainsi que le pH et le temps d'exposition. La solubilité des ions Zn^{2+} dans le milieu incluant les bactéries pourrait affecter le transport actif, le métabolisme aminoacide ainsi que le fonctionnement enzymatique des bactéries [13]. Lors d'une étude comparative, Reddy et al. [58] ont constaté une augmentation du nombre d'*E. coli* (UFC) traitées avec 1 mM de ZnO par rapport au contrôle. La population d'*E. coli* a été complètement inhibée à une teneur de ZnO supérieure ou égale à 3.4 mM, alors que celle de *S. aureus* nécessitait seulement une concentration supérieure ou égale à 1 mM pour une inhibition complète. En effet, de faibles concentrations de Zn^{2+} peuvent déclencher une tolérance relativement élevée par *E. coli* [58]. Les mêmes constatations ont été faites par Padmavathy et Vijayaraghavan [60] qui ont ajouté qu'en présence de faibles concentrations de ZnO (0.01-1 mM), la toxicité de ce dernier est presque inexistante envers *E. coli* et les ions solubles Zn^{2+} peuvent être un nutriment pour ce microorganisme [60]. D'autre part, Sawai [49] et Jiang et al. [65] ont décrit la contribution des ions Zn^{2+} dans l'efficacité

antibactérienne des nanoparticules de ZnO comme mineure, puisque la dissolution du ZnO produit des faibles concentrations de Zn soluble [49, 65].

2.3.1.3 Interactions entre les bactéries et les nanoparticules de ZnO

Zhang et al. [53] ont montré que la présence des nanoparticules de ZnO a provoqué l'endommagement de la membrane cellulaire d'*E. coli*, suite aux interactions entre les nanoparticules de ZnO et la surface de la membrane cellulaire à haute concentration en ZnO [53]. Dans une étude plus récente, Zhang et al. [61] ont investigué ce phénomène plus en profondeur et ont conclu que l'interaction entre les nanoparticules de ZnO et *E. coli* est favorisée principalement par des forces électrostatiques. Ils ont expliqué que les nanoparticules de ZnO ont une charge positive à pH 7 (potentiel zêta de +24 mV). Inversement, la charge globale des cellules d'*E. coli* est négative au même pH [61]. Selon Stoimenov et al. [66], la charge négative des cellules bactériennes est causée par un nombre considérable de groupes carboxylates à la surface [66]. Par conséquent, les charges opposées des nanoparticules de ZnO et des cellules bactériennes génèrent des forces électrostatiques de haute énergie entre la surface des bactéries et les nanoparticules, causant ainsi l'endommagement de la membrane cellulaire [61]. En outre, Brayner et al. [54] ont constaté que l'interaction entre les nanoparticules de ZnO et *E. coli* cause la rupture de la paroi bactérienne, suivie par une internalisation des nanoparticules dans le cytoplasme des bactéries. Des observations MET (Microscope électronique à transmission) ont montré que les cellules d'*E. coli* présentaient des dommages considérables, à savoir une paroi cellulaire désorganisée, une morphologie modifiée et des fuites du contenu intracellulaire [54].

2.3.2 Facteurs influençant la toxicité

Une multitude de facteurs peut influencer l'activité antibactérienne des nanoparticules de ZnO tel que la taille, la concentration, la morphologie des nanoparticules ainsi que l'effet de la lumière.

L'activité antibactérienne est fortement dépendante de la concentration et de la taille des nanoparticules de ZnO. Une surface spécifique plus élevée et une concentration plus grande sont responsables d'une activité antibactérienne accrue. Plusieurs études ont montré que l'activité antibactérienne des nanoparticules de ZnO contre *E. coli* et *S. aureus* a été améliorée avec la diminution de la taille des particules et l'augmentation de la concentration [52, 53, 57, 59, 60, 64]. Padmavathy et Vijayaraghavan [60] ont rapporté que la génération des EROs dépend

principalement de la surface spécifique de ZnO. Ainsi, les nanoparticules de plus petit diamètre ayant la plus grande surface spécifique, vont libérer une grande quantité de H_2O_2 qui va engendrer une activité antibactérienne plus importante [60]. En outre, les nanoparticules de plus petites tailles peuvent pénétrer plus facilement la membrane bactérienne grâce à leur tension de surface considérable. Jalal et al. [59] ont rapporté aussi que l'augmentation de la concentration des nanoparticules de ZnO engendre une augmentation de la quantité des EROs générées [59]. Zhang et al. [53] ont jugé que la concentration des nanoparticules de ZnO est un facteur ayant plus d'influence que le diamètre des particules sur l'effet bactériostatique des suspensions de ZnO. En revanche, certaines études ont rapporté que la morphologie des nanoparticules de ZnO n'a pas de conséquence sur son activité antibactérienne [57], tandis que d'autres études ont prouvé le contraire. Ramani et al. [67] ont démontré que les nanoparticules de ZnO sont plus efficaces que les nanostructures de ZnO sous forme de tiges contre les bactéries à Gram-positif (*S. aureus*, *B. subtilis*) et à Gram-négatif (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)) [67]. Ces résultats sont en contradiction avec les conclusions tirées suite à une autre étude qui explique que les nanostructures sous formes de tubes et de fils peuvent affecter le mécanisme d'internalisation. En effet, ces mêmes auteurs ajoutent que ces nanostructures pénètrent plus facilement que les nanoparticules à l'intérieur de la cellule bactérienne, ce qui favorise leur efficacité antibactérienne [68]. Dans une étude menée par Kayrite et al. [69], il a été démontré que l'activité antibactérienne des nanoparticules de ZnO (200 nm) photoactivées ($\lambda=400$ nm) en suspensions a été renforcée contre *L. monocytogenes* et *E. coli* [69]. Une autre étude a démontré qu'une exposition des nanostructures de ZnO à des radiations UVA (390 nm) pendant 20 minutes rehaussait l'inhibition d'*E. coli* et *S. aureus* de 18 et 22 %, respectivement [13].

Pour mieux élucider l'effet des radiations sur l'activité antibactérienne des nanoparticules de ZnO, Zhang et al. [61] ont mené une étude comparative portant sur des nanoparticules de ZnO avec une taille moyenne de 198 nm. Les suspensions de ZnO ont été conservées pendant des périodes différentes (1, 90 et 120 jours), et dans des conditions différentes (sous la lumière et à l'obscurité). Les résultats ont montré que les suspensions qui ont été conservées pendant 120 jours sous la lumière, ont manifesté la meilleure activité antibactérienne contre *E. coli* (DH5 α) [61].

2.3.3 Sensibilité des bactéries à Gram-positif versus Gram-négatif

L'efficacité antibactérienne des nanoparticules de ZnO contre les bactéries à Gram-négatif et les bactéries à Gram-positif a suscité beaucoup de controverse dans la littérature. Certains auteurs ont clamé que *E. coli* est plus sensible que *S. aureus* au traitement avec les nanoparticules de ZnO [57, 70]. La différence de sensibilité a été attribuée à la différence du contenu intracellulaire antioxydant à l'intérieur de *S. aureus* qui procure une meilleure résistance à l'oxydation ainsi qu'à la présence d'agents de désintoxication puissants au sein des bactéries à Gram-positif [70]. D'autres études ont rapporté que *S. aureus* a une plus grande susceptibilité que *E. coli* envers le ZnO [49, 58, 71]. Selon Sawai [49], les nanoparticules de ZnO ont une affinité pour la membrane de *S. aureus* [49] qui à son tour a une grande sensibilité au stress causé par le H₂O₂ [15]. La paroi cellulaire bactérienne des Gram-négatif est plus complexe en raison de la présence d'une membrane externe constituée d'une bicouche phospholipidique riche en lipopolysaccharides (LPS) et lipoprotéines et d'une mince couche de peptidoglycane. Par conséquent, la membrane externe des bactéries à Gram-négatif agit comme une barrière à la pénétration, ce qui réduit l'absorption des EROs et l'internalisation des nanoparticules de ZnO dans la cellule bactérienne [72]. Ajoutons que l'augmentation de la résistance d'*E. coli* vis-à-vis du ZnO par rapport à *S. aureus* pourrait être due à la différence de polarité de la membrane externe. En effet, la membrane externe de *S. aureus* a une charge négative moins importante que celle d'*E. coli* [15]. Selon Gordon et al. [73] cela permettrait un taux de pénétration plus élevée des EROs négativement chargées, causant ainsi la mort cellulaire de *S. aureus* à des concentrations plus faibles que celles requises pour engendrer le même effet chez *E. coli* [73]

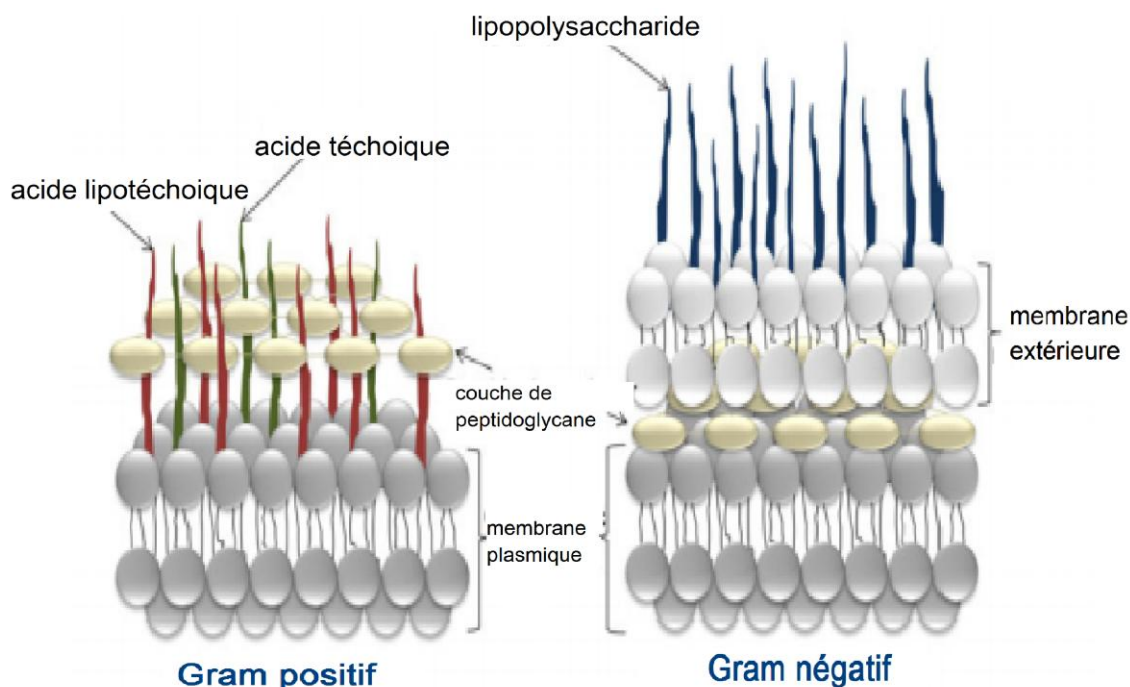


Figure 2.3: Parois bactérienne des bactéries à Gram-négatif et des bactéries à Gram-positif [16].

2.4 La technologie d'électrofilage

Les nanoparticules de ZnO sont considérées comme des agents antibactériens peu coûteux et efficaces et sont largement utilisées en conjonction avec une diversité de polymères biocompatibles et/ou biodégradables dans le but de développer des structures non tissées de fibres à caractère antibactérien. La majorité des études existantes sur les nanofibres électrofilées en présence de nanoparticules de ZnO projettent l'utilisation de ces nanofibres dans le domaine biomédical, comme les pansements antibactériens avec une grande stabilité thermique, de bonnes performances mécaniques et une haute porosité. Quelques applications des nanofibres à base de nanoparticules de ZnO sont citées dans le tableau suivant.

Tableau 2.1: Les principales applications des nanofibres à base de ZnO.

Matrice	Nanoparticules	Bactéries	Applications	Références
PLA	ZnO,ZnO-PLA (12 nm)	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Pansements	[74]
PLA	ZnO (12 nm)	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Pansements	[75]
PCL	ZnO (60 nm)	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Pansements	[76]
PLLA	ZnO (10-30 nm)	<i>S. aureus</i>	Pansements	[77]
PVA/alginate de sodium	ZnO (160 nm)	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Pansements	[78]
PU	ZnO (24-71 nm)	<i>S. aureus</i> <i>K. pneumoniae</i>	Tissue en coton antibactérien et anti- UV	[79]
Acétate de cellulose	ZnO	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Citrobacter freundii</i>	Membranehydrofuge	[80]

2.4.1 Le procédé d'électrofilage

L'électrofilage est une technologie économique, polyvalente et relativement simple permettant de produire des nanofibres continues et uniformes avec un diamètre allant de 2 nm à quelques micromètres, à partir d'une large gamme de polymères synthétiques et naturels. Cette technologie permet de générer des fibres non tissées avec une grande surface spécifique, une porosité considérable et un rapport d'aspect élevé. Actuellement, c'est une technologie en plein essor et ce en raison de la diversité de ses applications potentielles comme l'ingénierie tissulaire, les vêtements de protection, le domaine biomédical ou pharmaceutique et les détecteurs [81]. Le dispositif d'électrofilage se compose essentiellement de trois éléments: une alimentation

électrique à haute tension (0-50 kV), une pompe à seringue et un collecteur métallique (fixe ou rotatif). Une haute tension est appliquée à une solution de polymère contenue dans une seringue pour créer un champ électrique entre la gouttelette propulsée au bout de l'aiguille et le collecteur. Quand les forces électriques sont plus élevées que la tension de surface de la solution, la gouttelette est déformée en une forme de cône couramment appelé « cône de Taylor » qui émerge de la solution pour former un jet de liquide chargé. Ce jet est allongé et accéléré vers la contre-électrode tandis que le solvant s'évapore en chemin. Ainsi les nanofibres sont recueillies sous forme de réseau de fibres solides aléatoirement orientées. Le dispositif d'électrofilage est illustré dans le schéma suivant.

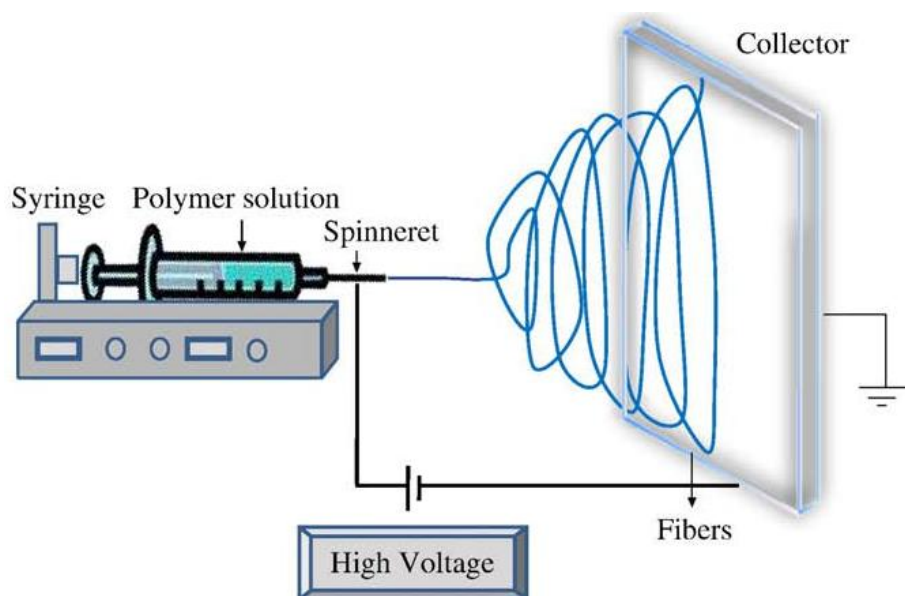


Figure 2.4: Schéma représentatif d'un dispositif d'électrofilage horizontal [81].

2.4.2 Paramètres influençant le procédé d'électrofilage

Différents paramètres influencent la transformation d'une solution de polymère en nanofibres. Ces paramètres comprennent (a) les propriétés intrinsèques de la solution précurseur tels que la viscosité, la conductivité électrique, la tension de surface, le poids moléculaire et la nature du solvant; (b) les paramètres du procédé, à savoir le voltage, la distance entre l'extrémité de

l'aiguille et le collecteur et le débit de l'alimentation de la solution; et (c) les paramètres ambiants tels que la température ambiante et le degré d'humidité. En raison de ces nombreux paramètres, le procédé d'électrofilage est le procédé polyvalent le plus utilisé pour la formation des nanofibres.

2.4.3 Electrofilage en présence des nanoparticules de ZnO

Les nanoparticules de ZnO ont été exploitées pour la production de fibres nanocomposites à caractère antibactérien pour des utilisations diverses. Des nanofibres à base de polyuréthane (PU) et de nanoparticules de ZnO (24-71 nm) ont été élaborées à partir de l'électrofilage de solutions de *N,N*-Diméthyle formamide (DMF) sur un support en coton. Des images de MET et de EDX (Analyse dispersive en énergie) ont confirmé la présence des nanoparticules de ZnO dans les fibres nanocomposites du PU (300-700 nm de diamètre) [79] .

Dans une autre étude, le polycaprolactone (PCL) a été électrofilé en présence des nanoparticules de ZnO (60 nm) et d'acétone. Il a été démontré que l'augmentation de la concentration de ZnO fait augmenter la rugosité de la surface des fibres de PCL en raison de l'agglomération des nanoparticules de ZnO. Il est à noter que les fibres de PCL pur présentaient une surface lisse avec un diamètre moyen de 2.5 μm . En ce qui concerne la taille des nanofibres de PCL/ZnO, leur diamètre moyen a diminué avec l'ajout des nanoparticules de ZnO jusqu'à une teneur de 1 % (p/p) et a atteint une valeur minimale de 1.340 μm pour une teneur de ZnO de 0.4 % (p/p). En effet, l'ajout de nanoparticules de ZnO a permis d'accumuler une densité de charge plus importante sur la surface du jet projeté. Ainsi, les forces d'élongation qui dépassent l'auto-répulsion ont permis l'obtention de fibres de plus petit diamètre avec une distribution plus étroite. En revanche, l'augmentation de la teneur en ZnO au-delà de 1 % (p/p) a doublé encore le diamètre des fibres, dépassant ainsi le diamètre des fibres de PCL pur. Ceci est dû à l'augmentation de la viscosité de la solution suite à l'ajout des nanoparticules [76].

Une autre étude a montré que dans le cas où des nanofibres à base de polyacrylonitrile (PAN) ont été développées à partir de solutions de DMF en présence de nanoparticules de ZnO, le diamètre des nanofibres de PAN pouvait être contrôlé par l'ajout de ZnO. En effet, le diamètre moyen des nanofibres a baissé de 260 à 190 nm en augmentant la teneur en ZnO de 1 à 3 % (p/p), avec la formation d'agglomérats de ZnO à la surface des nanofibres [82]. D'ailleurs, Nataraj et al. [82] ont jugé que le contrôle du diamètre des nanofibres à travers l'ajout de ZnO est plus efficace que

le contrôle à travers les propriétés des solutions telles que la viscosité, la conductivité ou la tension de surface [82] .

Un autre groupe s'est intéressé à l'électrofilage des nanofibres de PLA en présence des nanoparticules de ZnO (1, 3 et 5 % (p/p)) et de TFE. Ils ont constaté que l'introduction des nanoparticules de ZnO a provoqué une légère variation de la conductivité et de la viscosité des solutions. Néanmoins, celle-ci n'a pas eu un effet significatif sur la morphologie des nanofibres, puisque le diamètre moyen des fibres était compris entre 0.81 et 0.79 μm pour des teneurs en ZnO de 0 à 5 % (p/p). Les mêmes observations morphologiques ont été faites quand le PLA a été électrofilé en même temps que l'électro-pulvérisation d'une solution de méthanol avec différentes teneurs en ZnO (1, 3 et 5 % (p/p)) [75]. Dans une étude plus récente, le même groupe de chercheurs a étudié l'effet des nanoparticules de ZnO (12 nm) dont la surface a subi un greffage de PLA. Ils ont remarqué que l'introduction de ces nanoparticules modifiées a augmenté la viscosité des solutions d'électrofilage à base de PLA et de TFE et a réduit leur conductivité électrique. Ces variations ont engendré une augmentation du diamètre moyen des fibres et une diminution de la porosité. Par contre, des fibres avec une meilleure dispersion ont été développées, probablement grâce aux interactions favorables entre la matrice de PLA et les chaînes de PLA adsorbées à la surface des nanoparticules de ZnO [74].

2.4.4 Activité antibactérienne des nanofibres à base de nanoparticules de ZnO

Les nanofibres de PU avec 5 % de ZnO ont induit au support en coton une protection anti -UV et une activité antibactérienne considérable. Le réseau de fibres a montré un taux de réduction qui dépasse 98 % pour les populations de *S. aureus* et *K. pneumoniae*. L'évaluation de l'activité antibactérienne de ce textile a été accomplie par différentes méthodes de quantification. Une comparaison des résultats a prouvé que l'efficacité antibactérienne des nanoparticules de ZnO exige un contact direct entre les bactéries et le tissu traité [79]. La même constatation a été faite par Augustine et al. [76] en ce qui concerne le contact direct entre les nanoparticules de ZnO et la membrane bactérienne. Les auteurs ont également prouvé que l'activité antibactérienne des membranes de PCL/ZnO contre *E. coli* et *S. aureus* ne se manifeste qu'à des teneurs de ZnO de 5 et 6 % (p/p). Ils ont expliqué qu'à des concentrations plus faibles, les nanoparticules de ZnO sont piégées dans la matrice de PCL, ce qui réduit le nombre de nanoparticules qui sont en contact direct avec les cellules bactériennes [76]. Il est souvent rapporté que l'activité antibactérienne des

nanofibres à base de ZnO dépend du type de bactéries, de la concentration de ZnO ou encore de la méthode de quantification utilisées. Rodriguez-Tobias et al. [75] ont ajouté que, quand le procédé électrofilage/électro-pulvérisation est utilisé, une meilleure performance antibactérienne contre *E. coli* et *S. aureus* est atteinte. Prenant l'exemple de *S. aureus* où le taux d'inhibition pour les fibres produites par le procédé d'électrofilage était de 0, 27 et 95 % pour 1, 3 et 5 % (p/p) en ZnO, respectivement. Pour le procédé simultané électrofilage/électro-pulvérisation, le taux d'inhibition de *S. aureus* a dépassé 94 % dès l'introduction de 1 % (p/p) de ZnO. Cette amélioration a été expliquée par la disponibilité d'une plus grande surface spécifique des nanoparticules qui ont été déposées à la surface des nanofibres par l'électro-pulvérisation et qui sera en contact avec les cellules bactériennes [75]. Dans une étude plus récente, Rodriguez-Tobias et al. [74] ont pu améliorer l'activité antibactérienne des nanofibres à base de PLA en les électrofilant en présence des nanoparticules de ZnO dont la surface a été greffée avec du PLA. Le taux d'inhibition d'*E. coli* n'a pas dépassé 25 % pour des teneurs en nanoparticules de ZnO non modifiées de 1, 3 et 5 % (p/p). Alors que ce taux a dépassé 97 % pour les mêmes teneurs mais en nanoparticules de ZnO greffées avec du PLA [74].

2.5 Procédé d'extrusion

Le développement de nanocomposites ayant des performances antibactériennes peut être réalisé par l'incorporation d'agents antibactériens soit par voie humide (revêtement, cast solution) ou par voie sèche ou thermique qui comprend les méthodes de transformation conventionnelles exploitées par l'industrie plastique telles que l'extrusion, le moulage par compression, le moulage par injection ou le soufflage. Néanmoins, le procédé d'extrusion demeure le procédé le plus couramment utilisé pour développer des films d'emballages [16].

En effet, la plupart des emballages discutés dans la section 2.2.6 ont été développés par un des procédés suscités.

Un nanocomposite à base de PBS et de nanoparticules de ZnO (100 nm) a été produit à l'aide d'une extrudeuse de film soufflé. La teneur minimale en ZnO requise pour l'inhibition de la croissance d'*E. coli* et de *S. aureus* était obtenue à 6 % (p/p), avec des zones d'inhibition de 1.31 et 1.25 cm, respectivement [46]. Les films d'emballages à base de LDPE et de nanoparticules de ZnO + Ag développés par Emamifar et al. [37, 38] ont été eux aussi produits par extrusion-

soufflage à une température de 190 °C. Un autre emballage à base de LDPE et de ZnO a été produit, mais cette fois-ci par moulage par compression à 180 °C [39]. L'efficacité de ces films a été discutée dans la section 2.2.6.

Un emballage pour les poitrines de poulet à base de LDPE et de nanoparticules de ZnO et de Ag a été produit par moulage par injection. Le film de LDPE avec 5 % (p/p) de ZnO + Ag a détruit les populations d'*E. coli*, *P. aeruginosa* et *L. monocytogenes* de 99.9 % [41]. Des films à base de PLA et de nanoparticules de ZnO modifiées par silanisation ont été formés à l'aide d'une extrudeuse bi-vis équipée d'une filière plate. Ces films étaient actifs contre les bactéries à Gram-positif et celles à Gram-négatif et leur activité était dépendante du temps de traitement. En effet, le taux de réduction d'*E. coli* en présence d'un film de PLA avec 3 % (p/p) de ZnO a été améliorée de 1 à 3 logs de réduction (UFC/mL) entre 24 h et 7 jours. Le taux de réduction de la population de *S. aureus* était inférieur à un log de réduction (UFC/mL) à 24 h de traitement, mais a été augmenté à 5 logs de réduction (UFC/mL) après une semaine. Ces résultats ont été expliqués par le fait que la libération des espèces actives telles que les EROS et /ou les ions Zn^{2+} peut nécessiter plus de 24 h pour atteindre la CMI et l'efficacité optimale [43].

2.6 Procédé de revêtement

L'activité antibactérienne entre un emballage actif et les produits alimentaires peut être atteinte soit par un contact direct en faisant appel à un agent antibactérien non-migrateur ou bien par contact indirecte en utilisant un agent volatile qui sera libéré par la suite [83]. Récemment, une attention particulière a été accordée à l'utilisation de revêtements à base de nanoparticules dans les emballages alimentaires en raison de leurs avantages inhérents par rapport aux films multicouches pour améliorer les propriétés barrières et antimicrobiennes de l'emballage. Pour ce type de revêtement, le nanomatériau peut être appliqué sur la surface de l'emballage ou peut être incorporé en tant que couche de nanocomposite laminée. Par rapport aux films multicouches, les principaux avantages sont une utilisation réduite du matériau et un processus de conversion de films plus simple. Les revêtements à base d'oxyde métalliques sur les polymères biodégradables et non-biodégradables ont été évalués pour leurs propriétés barrières et antimicrobiennes [84].

Des films de PVC ayant subi un revêtement à base de nanoparticules de ZnO ont manifesté un effet d'inhibition contre *E. coli* et *S. aureus* avec une affinité plus élevée pour *S. aureus*. En

revanche, l'activité antifongique de ce revêtement n'a pas été observée contre *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) et *Penicillium citrinum* (*P. citrinum*), probablement à cause de la complexité de la paroi cellulaire fongique, de l'absence d'une lumière UV ou encore d'une quantité de ZnO insuffisante [45]. Dans une étude plus récente, le même groupe de chercheurs a consolidé ces résultats en ajoutant que les films de PVC-ZnO qui ont subi un traitement d'agitation à température constante pendant 10 h, ont démontré la même efficacité antibactérienne que les films non traités. Ceci s'explique par une bonne adhérence des nanoparticules de ZnO sur la surface des films de PVC. Ils ont rajouté que cette activité contre *E. coli* et *S. aureus* a été améliorée en présence de la lumière UV. Ajoutons toutefois que ce revêtement à base de nanoparticules de ZnO a fait diminuer la transmission de vapeur d'eau de 107 à 85 g/m².24 h pour une teneur en ZnO de 94 et 187 µg/cm². Par contre, les propriétés mécaniques telles que l'élongation à la rupture et la résistance à la traction des films de PVC n'ont pas été affectées par ce revêtement [44]. Ces résultats étaient en contradiction avec ceux trouvés par Li et al. [85] qui ont rapporté que le module de Young ainsi que la résistance à la traction des films de PU ont été considérablement améliorés grâce au revêtement à base de 2 % (p/p) de nanoparticules de ZnO [85]. Carvalho et al. [7] se sont focalisés sur l'étude de l'influence de l'épaisseur et de la morphologie des revêtements à base de nanoparticules sur les performances antibactériennes des films de PET. Les résultats ont montré que les revêtements de ZnO les plus minces (50-100 nm) avaient une activité envers *E. coli* (HB101) moins prononcée que les plus épais (200-600 nm). Il est important de souligner ici que les revêtements les plus épais n'ont non seulement pas diminué le taux d'inhibition, mais ont aussi réduit de 45 % le taux des cellules bactériennes présent à la fin du test. Cette caractéristique est assez importante pour les applications des emballages alimentaires puisque cela permet de réduire clairement la charge bactérienne [7]. Tous les travaux discutés ci-dessus, ont montré le potentiel des revêtements à base de nanoparticules de ZnO en vue d'une potentielle utilisation des films traités comme matériaux d'emballage alimentaire à caractère antibactérien.

2.7 Synthèse de la revue de littérature et frontière de connaissance

L'état de l'art présenté ci-dessus montre que les nanoparticules de ZnO sont un candidat prometteur pour la formulation de nouveaux matériaux d'emballage alimentaire actif en raison de leur non toxicité et de leurs propriétés antibactériennes considérables vis-à-vis des souches pathogènes qui causent souvent l'altération microbiologique des aliments. Plusieurs études ont montré l'efficacité antimicrobienne des nanoparticules de ZnO *in vitro* soit en suspensions ou en nanocomposites (films, revêtement, nanofibres). Évidemment, la variation de l'activité antibactérienne des nanoparticules de ZnO en fonction de leurs propriétés intrinsèques (la taille, la concentration, etc.) a aussi été largement étudiée. Cependant, aucune étude ne s'est penchée sur l'effet des prétraitements (stérilisation, traitement ultrasons) des suspensions de ZnO sur l'état physique des nanoparticules (agglomération, dissociation) et par conséquent l'effet qu'ils peuvent avoir sur leur efficacité antibactérienne. La majorité des études existantes sur les nanofibres électrofilées en présence de nanoparticules de ZnO, projettent l'utilisation de ces nanofibres dans le domaine biomédical, mais aucune étude ne vise leur exploitation dans les emballages alimentaires. Certaines de ces études ont porté sur les propriétés rhéologiques des suspensions de ZnO. Néanmoins, aucune étude ne s'est intéressée à l'effet de la nature des nanoparticules et du solvant sur la viscosité des suspensions de nanoparticules et son évolution en fonction du temps. Rodriguez-Tobias et ses collègues [74, 75] ont beaucoup investigué l'électrofilage du PLA en présence des nanoparticules de ZnO, mais aucune information n'était disponible sur l'éventuelle dégradation du PLA.

Vu que l'activité antibactérienne du ZnO exige un contact direct avec la surface contaminée, il serait intéressant de développer des films d'emballage alimentaire à l'aide de revêtement à base de nanoparticules de ZnO. Plusieurs études ont confirmé la performance antibactérienne des revêtements à base de ZnO élaborés par différents procédés. Cependant, le procédé de revêtement développé dans le cadre de notre projet est plus simple, s'effectue en une seule étape, consomme moins de matériaux, et ne nécessite pas l'utilisation de solvants. La présence des nanoparticules de ZnO sur la surface des films ou près d'elle permettra de maximiser leurs efficacité antibactérienne.

CHAPITRE 3 OBJECTIFS DE RECHERCHES, COHÉRENCES DES ARTICLES ET ORGANISATION DE LA THÈSE

3.1 Objectifs de recherche

Sur la base de la revue de littérature présentée dans le Chapitre 2, ZnO est un agent prometteur pour la formulation de nouveaux matériaux d'emballages alimentaires antibactériens. Cependant, l'efficacité antibactérienne de ces oxydes varie en fonction de leurs propriétés intrinsèques, de la méthode de quantification, des prétraitements reçus et de la souche bactérienne exploitée. Ainsi, la validation de l'activité antibactérienne des poudres d'oxydes métalliques en suspensions est une étape essentielle avant toute étape de développement de nouveaux matériaux nanocomposite à base des ces oxydes. Par la suite, une étude des différentes alternatives de leur incorporation s'impose afin d'arriver à l'étape de quantification et validation de l'efficacité des nanocomposites antibactériens développés. Par conséquent, l'objectif principal de ce travail est le suivant:

"Élaborer de nouveaux matériaux nanocomposites antibactériens à base de nanoparticules d'oxyde de zinc pour améliorer la qualité et prolonger la durée de vie des produits alimentaires"

Les objectifs spécifiques de la présente étude sont:

- 1) Évaluer l'effet des prétraitements sur l'activité antibactérienne des poudres d'oxydes de zinc en suspensions.
- 2) Élucider l'effet des nanoparticules de ZnO sur les propriétés rhéologiques des solutions de PLA et leur incidence sur l'électrofilage des nanocomposites PLA/ZnO.
- 3) Développer un nouveau procédé de revêtement à base de nanoparticules de ZnO pour produire des films de LDPE/ZnO.

3.2 Présentation des articles et cohérence avec les objectifs

Les chapitres suivants comprennent trois articles présentant les principales contributions scientifiques et les principaux résultats de ce travail. Cette partie présente donc l'élément central de cette thèse, présenté sous forme de trois articles scientifiques :

Le chapitre 4 présente les résultats du premier article intitulé "*Combined effect of ultrasound stimulations and autoclaving on the enhancement of antibacterial activity of ZnO and ZnO/SiO₂ nanoparticles*", publié en ligne dans le journal *Nanomaterials* le 25 Février 2018. Dans ce chapitre nous examinons l'effet des prétraitements comme les vibrations ultrasonores et la stérilisation sur l'activité antibactérienne des nanoparticules d'oxyde de zinc en suspensions, contre *E. coli* (DH5 α). Une étude comparative entre la poudre de ZnO commerciale et une seconde poudre de silice mésoporeuse dopée avec du ZnO (ZnO-UVM-7), a été également menée. L'activité antibactérienne de ces poudres d'oxyde a été également étudiée en termes de CMI et CMB. Finalement, l'efficacité antibactérienne de nanofibres de PLA, produites par le procédé d'électrofilage et contenant ces oxydes métalliques a été évaluée.

Le chapitre 5 comprend le deuxième article intitulé "*Rheological properties of Poly(lactic acid) solutions added with metal oxide nanoparticles for electrospinning*", publié en ligne le 27 novembre 2017 dans *Journal of Polymers and the environment*. Dans cette étude, l'effet de la nature du solvant et des nanoparticules d'oxydes métalliques (ZnO, ZnO-UVM-7, SiO₂, TiO₂) sur les propriétés rhéologiques des solutions d'électrofilage au cours du temps est élucidé. Les résultats démontrent que le PLA se dégrade en solutions en présence d'un des solvants exploités, et que cette action est amorcée en présence de nanoparticules de ZnO. Un mécanisme plausible qui décrit la dégradation du PLA en solution est aussi présenté au cours de cette étude. Finalement, l'effet du changement des propriétés de ces solutions sur la morphologie des nanofibres à base de PLA a été également examiné.

Le chapitre 6 présente les résultats du troisième article "*Antibacterial properties of Low-density polyethylene-based films coated with ZnO nanoparticles for potential use in food packaging*". Cet article a été soumis le 31 décembre 2017 au journal *Food Packaging And Shelf Life* et est accepté pour publication après révision le 5 Février 2018. Dans cette étude, une nouvelle approche de revêtement à base de nanoparticules de ZnO est développée pour produire des films de LDPE à

caractère antibactérien. L'efficacité antibactérienne de ces films contre *E. coli* (souche non pathogène) et *S. aureus* (souche pathogène) a été examinée. Cette efficacité a été étudiée en changeant les conditions de la mise en forme, à différents intervalles de temps, et aussi après certains traitements subis par le film de LDPE/ZnO. Les résultats démontrent que les films de LDPE/ZnO peuvent retenir leur activité contre *E. coli* jusqu'à 8 mois après leur préparation. Les films de LDPE/ZnO pourraient trouver une application prometteuse dans le domaine des emballages alimentaires.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: COMBINED EFFECT OF ULTRASOUND STIMULATIONS AND AUTOCLAVING ON THE ENHANCEMENT OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ZNO AND SIO₂/ZNO NANOPARTICLES

Hajer Rokbani ¹, France Daigle ² and Abdellah Ajji ^{1,*}

¹ 3SPack, CREPEC, Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal, P.O. Box 6079, Station Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3A7

² Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Pavillon Roger-Gaudry, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7 ; france.daigle@umontreal.ca

(Cet article a été publié en ligne le 25 Février 2018 dans le journal *Nanomaterials*)

4.1 Abstract

This study investigates the antibacterial activity (ABA) of suspensions of pure ZnO nanoparticles (ZnO-NPs) and mesoporous silica doped with ZnO (ZnO-UVM7), as well as electrospun nanofibers containing those nanoparticles. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of these two materials were also determined under the same conditions. The results showed a concentration-dependent effect of antibacterial nanoparticles on the viability of *Escherichia coli* (*E. coli*). Moreover, the combination of the stimulations and sterilization considerably enhanced the antimicrobial activity (AMA) of the ZnO suspensions. Poly(lactic acid) (PLA) solutions in 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) were mixed with different contents of nanoparticles and spun into nonwoven mats by the electrospinning process. The morphology of the mats was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The amount of nanoparticles contained in the mats was determined by thermogravimetric analysis (TGA). The obtained PLA-based mats showed a fibrous morphology, with an average diameter ranging from 350 to 450 nm, a porosity above 85 %, but with the nanoparticles agglomeration on their surface. TGA analysis showed that the loss of ZnO-NPs increased with the increase of ZnO-NPs content in the PLA solutions and reached 79 % for 1 wt % of ZnO-NPs, which was mainly due to the aggregation of nanoparticles in

solution. The ABA of the obtained PLA mats was evaluated by the dynamic method according to the ASTM standard E2149. The results showed that, above an optimal concentration, the nanoparticle agglomeration reduced the antimicrobial efficiency of PLA mats. These mats have potential features for use as antimicrobial food packaging material.

Keywords: Poly(Lactic Acid); ZnO nanoparticles; Electrospinning process; Antibacterial properties; *E. coli*.

4.2 Introduction

The development of antimicrobial packaging materials based on poly(lactic acid) (PLA), is growing continuously, with major focuses on enhancing food safety and quality and, concurrently, exploring alternatives to synthetic polymers made from petrochemicals that are less environmentally friendly [1]. Among the various aliphatic degradable polyesters, PLA has been considered as one of the most interesting and promising biodegradable materials [2]. Since it has been classified as “generally recognized as safe” (GRAS), PLA has been approved for use in food packaging, including direct-contact applications [3]. Moreover, it is suitable for producing thin and uniform electrospun nanofibers and can be dissolved in many common solvents [2,4]. ZnO-NPs are considered as antimicrobial agents that can compete favorably with silver nanoparticles, especially because of their simple and inexpensive synthesis, greater efficiency and cost-effectiveness, lower levels of toxicity [5,6], as well as their selective toxicity toward a wide range of both Gram-positive and Gram-negative bacteria, including major food-borne organisms such as *Escherichia coli*, *Listeria* and *Staphylococcus aureus* [7–10]. As inorganic antibacterial agents, ZnO-NPs have better stability at high temperatures and pressures, and longer shelf life than the organic ones [8,11,12]. Moreover, they show an ABA without photo-activation compared to TiO₂ [7,10,11]. The main potential food application of ZnO-NPs is as an antimicrobial agent in food packaging materials [13,14]. When incorporated into antimicrobial packaging, ZnO-NPs can also improve the properties of the packaging material, such as mechanical strength, barrier properties, and stability [8,15]. Proper incorporation of ZnO-NPs into packaging materials will favor interaction with foodborne pathogens and act as bacteriostatic or bactericidal agents onto the food surface where bacteria reside, halting their growth and, thus, preventing food from spoilage [16].

Polymeric nanofibers containing antimicrobial nanoparticles can exhibit several advantages compared to standard organic compound-loaded polymeric analogs such as higher thermal stability, enhanced mechanical performance or biocompatibility, depending on the chemical nature of nanoparticles. Electrospinning is one of the most common methods of nanofiber formation for life science, protective clothing, filters, sensors, tissue engineering, drug delivery systems, and other applications. Synthetic and natural polymers, as well as their blends and composites with proper nanoparticles, are used in the electrospinning process to form nano- and submicron fibers with architecture and properties suitable for appropriate applications. Understanding of electrospinning process parameters enables tailoring of the electrospun nanofibers' morphology, internal structure, and properties to their respective applications [17]. ZnO-NPs have been exploited for the development of several antibacterial fibrous materials based on biodegradable polymers. ZnO-NPs (100 nm) were incorporated into nanofibers based on poly(vinyl alcohol) (PVA) and sodium alginate and showed a substantial antibacterial activity (ABA) against *E. coli* and *S. aureus*, which was proportional to nanoparticles concentration [18]. Augustine and co-workers [19] found that concentrations higher than 5 wt % ZnO-NPs incorporated in polycaprolactone (PCL) nanofibers was able to inhibit the proliferation of *E. coli* and *S. aureus*, which makes them promising as antibacterial biodegradable scaffolds [19]. In a recent work, they proved that PCL/ZnO nanofibers with a concentration below 4 wt % ZnO-NPs, were efficient to heal wounds on the skin of animals without showing inflammation of tissues [20]. Virovska's group [21] combined the electrospinning and electrospraying processes to generate a PLA and ZnO non-woven textile that was active against *S. aureus*, but the ZnO content (45 wt %) used was considered unsuitable for adhesion and proliferation of tissue cells [21]. Rodriguez-Tobias and co-workers [22,23] noticed through two different studies that simultaneous electrospinning of PLA solutions with electrospraying of ZnO dispersions, as well as the use of ZnO-graft-PLA nanoparticles, provided better antibacterial performance than the PLA-based mats filled with pure ZnO-NPs and developed by the electrospinning process. The incorporation of ZnO-graft-PLA nanoparticles improved the nanoparticles' dispersion within the PLA fibers and, consequently, enhanced their antibacterial (*E. coli* and *S. aureus*) and mechanical properties [22]. When electrospinning/electrospraying was used with at least 1 wt % of ZnO-NPs, the growth inhibition of *S. aureus* was around 94 %, while simple electrospun mats did not inhibit the bacterium growth for the same ZnO concentration.

Additionally, it was noticed that *E. coli* are less sensitive than *S. aureus* to the presence of nanoparticles [23].

The ABA between an antimicrobial agent dispersed in the packaging material and the food product can be achieved by either direct contact using a non-migratory system or by indirect contact using a volatile antimicrobial releasing system. Many reports have shown that the ABA of ZnO-NPs is size-dependent [7,9,10,24–26] and concentration-dependent [9,10,12,25–32]; in this way the antimicrobial activity (AMA) of ZnO-NPs on *E. coli* and *S. aureus* has been promoted by a decrease in particle size and an increase in concentration. Commonly-accepted mechanisms of antibacterial action of ZnO-NPs are the formation of reactive oxygen species (ROS) [7,27,28,33], the interaction of nanoparticles with bacteria [9,34–36], and the release of Zn^{2+} ions [24,37]. For ROS, whose amount generated should increase with the concentration of ZnO-NPs [7,24], they are supposed to cause the oxidation of the lipid membrane of the cell wall of *E. coli*. The direct interaction between ZnO-NPs and the surface of the cells affects the permeability of the membrane [9,36] allows the internalization of NPs [34] and induces oxidative stress in bacteria cells [38]. The toxicity of ZnO-NPs could result from the solubility of Zn^{2+} ions in the medium of micro-organisms [8,15].

The first objective of this research was to determine, for the first time, the combined influence of ultrasound and sterilization on inhibiting *E. coli* functions by the ZnO-NPs. To the best of our knowledge, the combinatory antibacterial effect of autoclaving, ultrasound stimulations, and ZnO-NPs on *E. coli* has not been studied previously. The only study that approached the impact of ultrasound stimulations on the antibacterial effect of ZnO-NPs suspensions has treated the suspensions containing both the bacteria cells and ZnO-NPs [39], whereas, in the present study, the nanoparticle suspensions were either sonicated and/or autoclaved before their inoculation. Seil's group study [39] focused on the effect of ultrasound on the physical interaction between the nanoparticles and the bacterial membrane only. These interactions may be enhanced due to nanoparticles dissociation and increased nanoparticles penetration into the cell membrane. However, in the present study, we focused on how the pretreatments (ultrasound-autoclaving) of ZnO-NPs suspensions can modify the nanoparticles' physical state (agglomeration-dissociation) before any bacterial inoculation, and its effect on the ABA of their suspensions. The effect of these pretreatments was also extended to the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the nanoparticle suspensions. To the best of our

knowledge, the MIC and MBC of ZnO suspensions were estimated using different approaches [16,37,40,41] but none of them have tackled the effect of pretreatments. A comparative study was also performed on ZnO and silica nanoparticles doped with ZnO (ZnO-UVM-7) material for all the experiments described above. As a second objective, the ABA of PLA-based nanofibers loaded with ZnO and ZnO-UVM-7 materials was studied. These materials may be good candidates for antimicrobial food packaging material.

4.3 Results

4.3.1 Combined effect of sterilization and ultrasound stimulations on the ABA of zinc oxide suspensions

The objective of these experiments was to determine, for the first time, the combined effect of sterilization, ultrasound stimulations and ZnO-NPs on *E. coli* ABA. In order to examine the effect of each parameter as well as their combined effect, four different groups of experiment were conducted as mentioned in the experimental section.

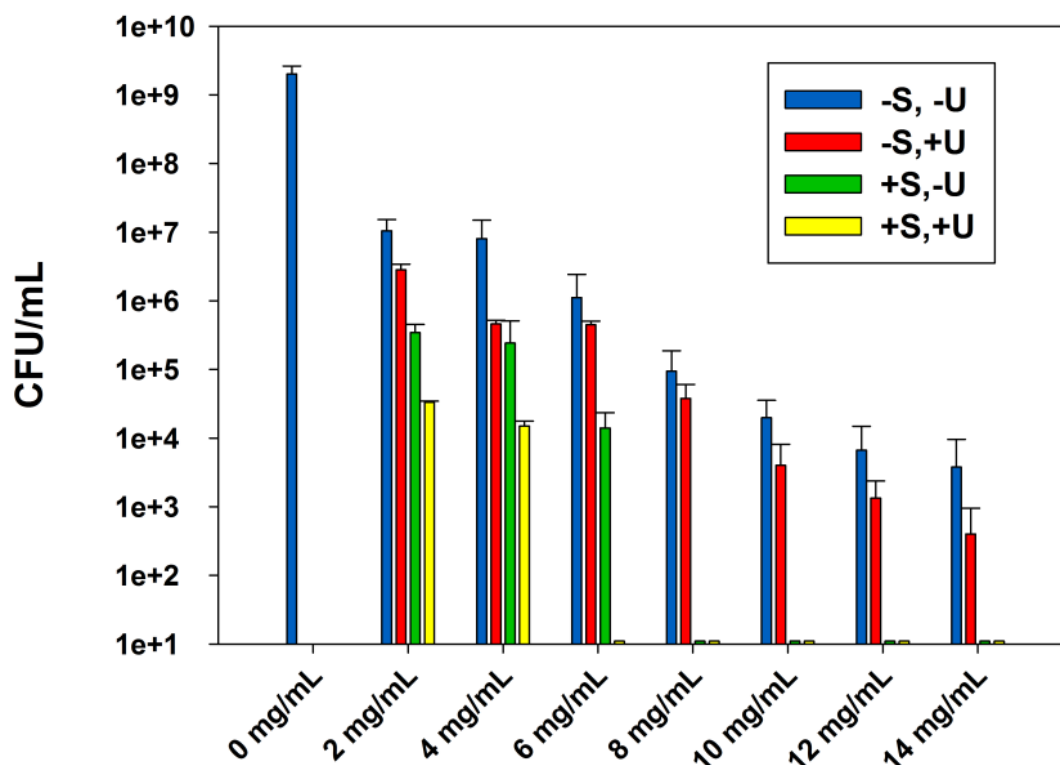


Figure 4.1: The effect of sterilization and ultrasound stimulations on the ABA of ZnO-NPs, in LB suspensions against *E. coli* (DH5 α), after incubation at 37 °C for 24 h. Data are shown with mean values and standard errors of bacterial counts.

Figure 4.1 represents the effect of sterilization and ultrasound stimulations on the ABA of ZnO-NPs for concentrations from 0 to 14 mg/mL. For the first group of experiments where ZnO-NPs were used without any treatment, the results show that the increase of ZnO-NPs concentration in suspension from 2 to 14 mg/mL decreased *E. coli* growth gradually. The rise in ZnO-NP content was able to progressively increase the inhibitory effect of the *E. coli* growth, but a complete inhibition was not achieved even for the highest concentration of ZnO-NPs (14 mg/mL). At this concentration, ZnO-NPs were able to reduce the bacterial growth by 5 log CFU/mL. When the ZnO suspensions were sonicated before their inoculation, we observed the same trend on the inhibition of the *E. coli* growth. The ABA of ZnO-NPs was enhanced as their concentration in suspensions was increased. At 2 mg/mL, ZnO-NPs reduced *E. coli* growth from 2.10^9 (Control) to 1.10^7 and 2.10^6 CFU/mL for the non-treated and the sonicated ZnO-NPs suspensions,

respectively. At 4 mg/mL the sonicated ZnO-NPs reduced the *E. coli* population to 4.10^5 CFU/mL, whereas the untreated ones inhibited it to 8.10^6 CFU/mL. For the third group of experiments, the ZnO-NPs suspensions were autoclaved before their inoculation. In this case, the three first concentrations of ZnO-NPs were able to decrease the bacterial growth gradually, starting with 4 logs CFU/mL reduction for the lowest one. At a concentration of 8 mg/mL, the *E. coli* growth was totally inhibited. For the last group of experiments, ZnO suspensions were autoclaved and sonicated before their contamination with *E. coli*. The result showed that 2 and 4 mg/mL of ZnO-NPs were able to reduce the *E. coli* growth by four orders of magnitude, from 2.10^9 (Control) to 3.10^4 and 1.10^4 CFU/mL, respectively. A concentration of 6 mg/mL was able to completely inhibit the *E. coli* growth.

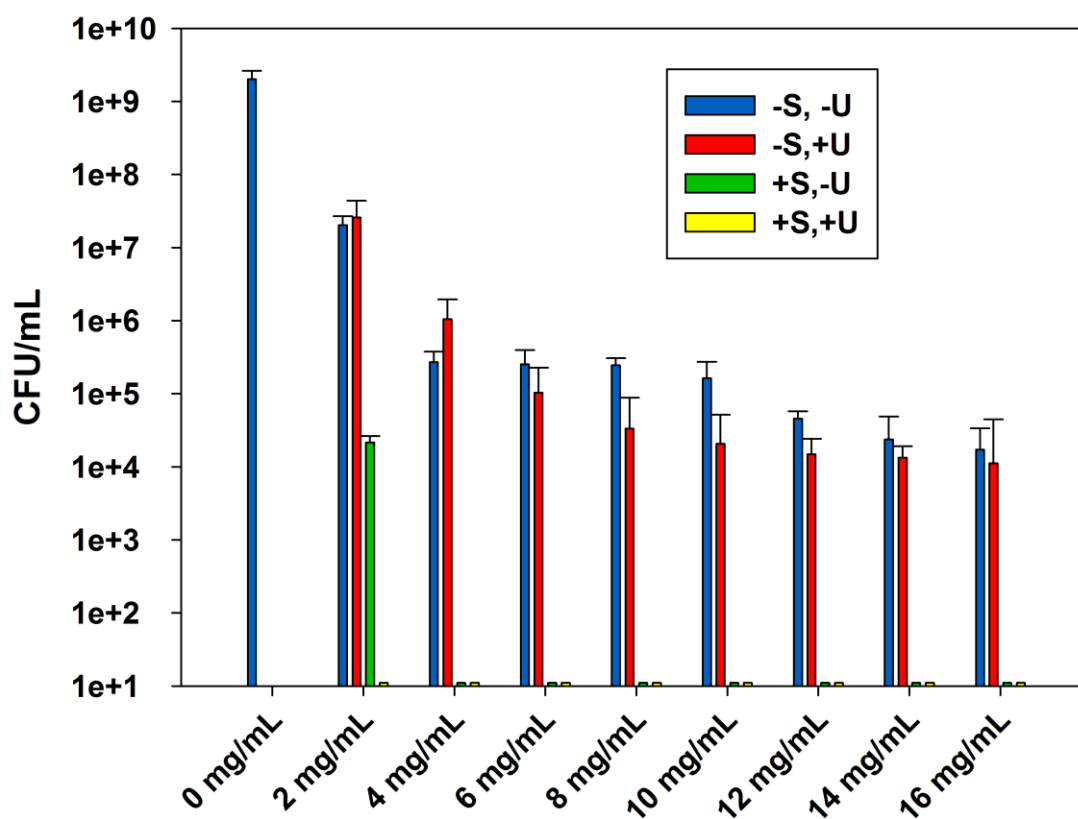


Figure 4.2: The effect of sterilization and ultrasound stimulations on the ABA of ZnO-UVM-7 (Si/Zn=5) material, LB suspensions against *E. coli* (DH5 α), after incubation at 37 °C for 24 h.

Data are shown with mean values and standard errors of bacterial counts.

Figure 4.2 represents the effect of sterilization and ultrasound stimulations on the ABA of ZnO-UVM-7 (Si/Zn=5) material for concentrations from 0 to 14 mg/mL. This antibacterial material has been tested in the same way as ZnO-NPs above to evaluate the effect of sterilization and ultrasound stimulations on its ABA. For the first groups of experiments, the increase of ZnO-UVM-7 content decreased progressively the *E. coli* population. A concentration of 2 mg/mL reduced the *E. coli* population by two orders of magnitude, compared to control suspensions with no powders. At 4 mg/mL, the bacterial growth was reduced to 2.10^5 CFU/mL and remained approximately in the same range for 6, 8, and 10 mg/mL. For 12 and 14 mg/mL, the growth was further reduced by one order of magnitude. For the second group of experiments, the sonicated ZnO-UVM-7 suspensions progressively reduced the *E. coli* growth to reach a 4 log CFU/mL reduction for the highest concentration of antibacterial NPs. When the ZnO-UVM-7 suspensions were autoclaved before their contamination, 2 mg/mL of this material was able to provide over 5 logs CFU/mL reduction of the bacterial growth, and a concentration of 4 mg/mL was able to inhibit it completely. When the suspensions were autoclaved and sonicated, no growth was recorded for all the concentrations established during these experiments, meaning that under these conditions the *E. coli* growth can be inhibited entirely by a concentration of the ZnO-UVM-7 material lower than 2 mg/mL.

4.3.2 MICs and MBCs of the zinc oxide suspensions

The MICs and MBCs of ZnO and ZnO-UVM-7 (Si/Zn=5) suspensions, with concentration ranging from 2 to 14 mg/mL, were determined by the CFU method, after 24 h incubation at 37 °C in LB, against *E. coli* (DH5 α) bacteria for different treatments.

Table 4.1: MICs and MBCs of ZnO and ZnO-UVM-7 (Si/Zn=5) suspensions in mg/mL, after 24 h incubation at 37 °C in LB, against *E. coli* (DH5 α) bacteria for different treatments.

Treatment	-S, -U		-S,+U		+S,-U		+S,+U	
Antibacterial NPs	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
ZnO	2	> 14	2	> 14	2	8	2	6
ZnO-UVM-7	2	>14	2	>14	2	4	< 2	2

Table 4.1 reports the MICs and MBCs of ZnO and ZnO-UVM-7 suspensions against *E. coli*. MICs, and particularly MBCs, were necessary to determine the minimum concentrations of antibacterial nanoparticles that would ensure the antibacterial efficacy of PLA nanofibers. The results indicated that ZnO and ZnO-UVM-7 nanoparticles with an average diameter of 20 and 5 nm, respectively, significantly inhibited (MIC) or killed (MBC) the tested bacteria. The results also demonstrate, that the combination of sterilization and ultrasound stimulations decreased considerably the MBC of ZnO and ZnO-UVM-7 nanoparticles from 14 mg/mL to 6 and 2 mg/mL, respectively.

4.3.3 Fiber's porosity measurement

Table 4.2: Porosity of PLA nanofibers scaffolds produced by the electrospinning process, measured by the liquid intrusion method at room temperature.

Samples	Porosity ε (%)
Neat PLA nanofibers	90.08
PLA/0.8 wt % ZnO nanofibers	87.48
PLA/3 wt % ZnO nanofibers	87.07
PLA/0.6 wt % ZnO-UVM-7 (Si/Zn=5) nanofibers	86.95
PLA/0.8 wt % ZnO-UVM-7 (Si/Zn=5) nanofibers	84.59

Table 4.2 presents the porosities of the PLA scaffolds that have been produced by the electrospinning process with the parameters mentioned in the experimental section. The results show that neat PLA mats are characterized by a porosity of about 90% that is slightly higher than that of the nanocomposite mats filled with either ZnO or ZnO-UVM-7 nanoparticles. The scaffolds that contain the ZnO-NPs provided an overall porosity around 87 %, which is slightly higher than the porosity of the nanocomposites mats filled with ZnO-UVM-7.

4.3.4 Thermogravimetric Analysis (TGA)

Table 4.3: Estimation of ZnO-NPs amount in PLA mats produced by the electrospinning process, by using TGA under nitrogen (N₂) atmosphere from 25 to 800 °C, at a rate of 10 °C/min.

ZnO Content	ZnO Weight in Solutions (mg)	ZnO Weight in PLA Nanocomposites Mats (mg)	Percentage of ZnO in the PLA Nanocomposite Mats (%) (compared to 100% if no loss)
PLA/0.6 wt % ZnO	12	9.49	79.08
PLA/0.8 wt % ZnO	16	10.13	63.31
PLA/1 wt % ZnO	20	4.31	21.55
PLA/2 wt % ZnO	24	5.48	22.83
PLA/3 wt % ZnO	28	8.03	28.67

The TGA was performed to estimate the content of the nanoparticles inside the scaffolds that have been developed by the electrospinning process. This amount was then compared to the initial weight of the nanoparticles that have been introduced, for each concentration, during the solutions' preparations. The results are presented in Table 4.3. For the lowest content of the ZnO-NPs, 79 % of the initial amount of the ZnO-NPs was found in the mat containing 0.6 wt % ZnO. For the mat with 0.8 wt % of ZnO, this percentage was around 63%. However, for higher ZnO contents, this rate dropped dramatically to reach 21 % for the mat containing 1 wt % of ZnO.

4.3.5 Scanning Electron Microscopy (SEM)

In order to understand the relationship between PLA based-mat morphology and their AMA, SEM imaging was performed on the mats. In this regard, Figure 4.3 shows the images of PLA nanocomposite mats obtained by electrospinning under the following conditions: a feed rate of 0.5 mL/h, a voltage of 35 KV and a needle-collector distance of 15 cm. These SEM images (Figure 4.3a and b) reveal the presence of a network of randomly-oriented smooth nanofibers, with some beaded-fibers, which is mostly attributed to the relatively low PLA concentration in the electrospinning solutions. Figure 4.3c and d show the average fiber diameters of mats obtained for PLA/ZnO and PLA/ZnO-UVM-7 solutions, respectively. The average fiber

diameters were estimated from the SEM images and were $0.35\ \mu\text{m}$ and $0.45\ \mu\text{m}$ for PLA/ZnO and PLA/ZnO-UVM-7 nanofibers, respectively, while the fiber diameter distribution ranged from 0.1 to $0.7\ \mu\text{m}$. Both mats presented nanoparticles agglomerates in the fiber's network. Smaller aggregates formed on the surface of nanofibers, whereas the larger ones were scattered all over the fiber's network., Using Image-Pro Plus software, the average diameter of the nanoparticles agglomerates formed was estimated to $1.4\ \mu\text{m}$.

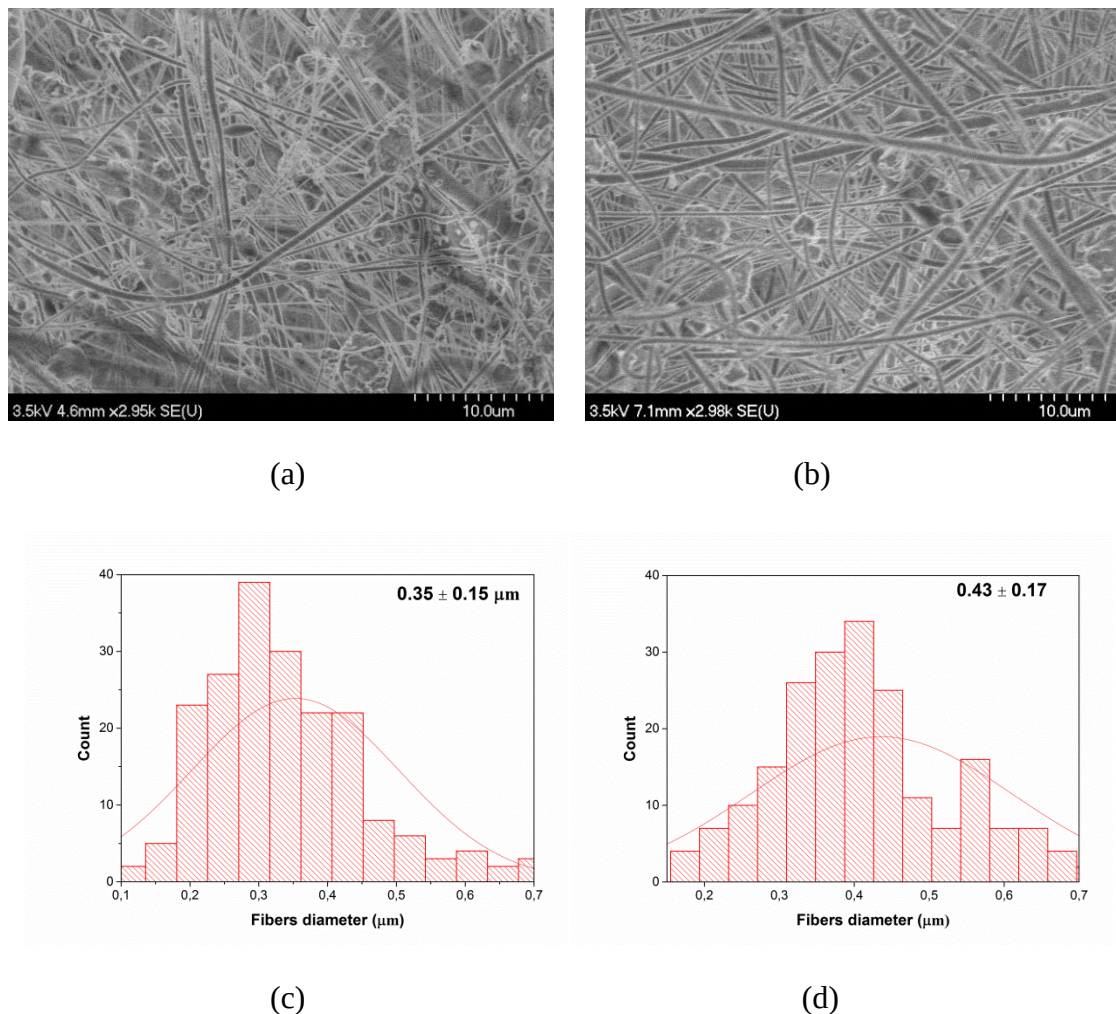


Figure 4.3: Morphology of electrospun PLA based mats: (a) PLA (10 % wt/vol), 1 wt % ZnO in TFE (0.5 mL/h, 35 KV, 15 cm), (b) PLA (10 % wt/vol), 1 wt % ZnO-UVM7 (Si/Zn = 5) in TFE (0.5 mL/h, 35 KV, 15 cm) and (c) and (d) are fiber diameter distribution of (a) and (b), respectively. The scale bars represent $10\ \mu\text{m}$.

4.3.6 ABA of PLA-based Nanofibers

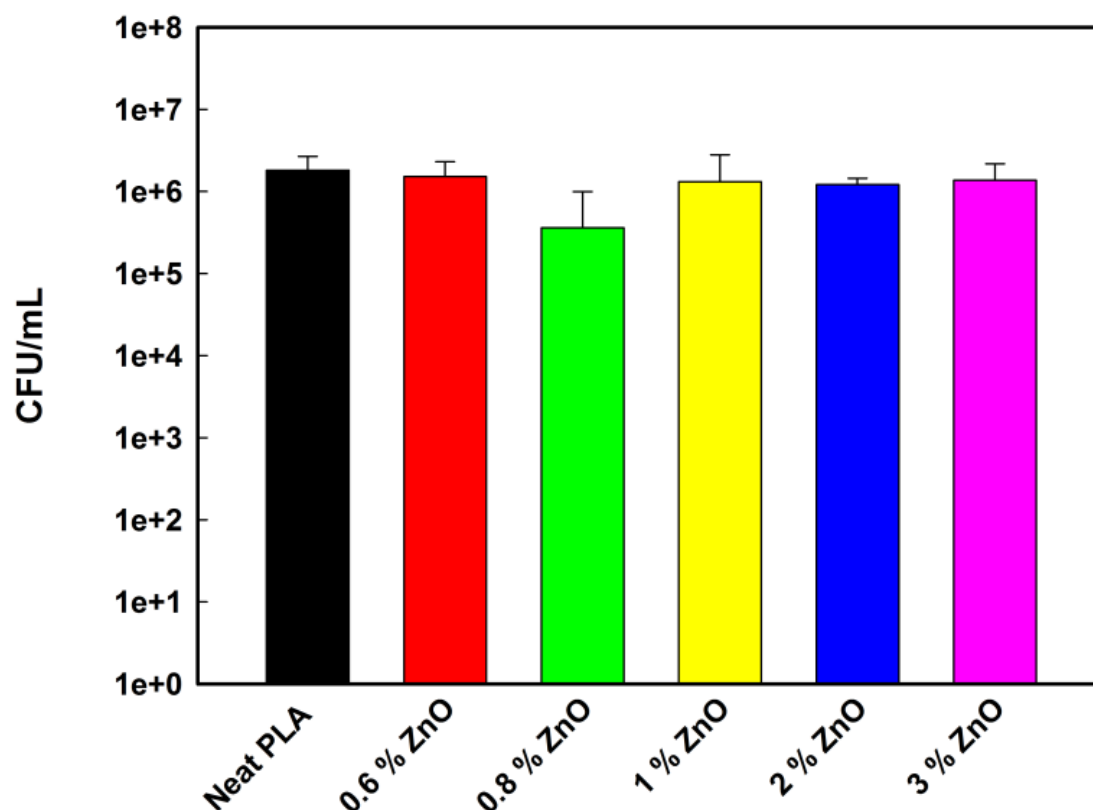


Figure 4.4: ABA of electrospun PLA/ZnO nanofibers with different ZnO content, against *E. coli* (DH5α), after incubation at 37 °C for 4 h in PBS solutions. Data are shown with mean values and standard errors of bacterial counts.

The ABA of the ZnO and ZnO-UVM-7 nanoparticles-filled PLA fiber mats was assessed using an American Standard test method (ASTM E-2149-13a, 2013) against Gram-negative bacteria (*E. coli*). The activity of the neat PLA mats against these bacteria was used as a control. The results of the ABA analysis are shown in Figure 4.4 and Figure 4.5. After 4 h contact at 37 °C in PBS, PLA/ZnO nanofibers (Figure 4.4) did not show any significant reduction rate of bacterial growth of *E. coli*. The lowest content of ZnO (0.6 wt %), does not decrease the *E. coli* population growth. At 0.8 wt %, the bacterial population was reduced by less than 1 log magnitude. However, a further increase in ZnO-NPs had no significant effect, and the *E. coli* growth was in the same range as the control growth, showing the absence of ABA in these conditions.

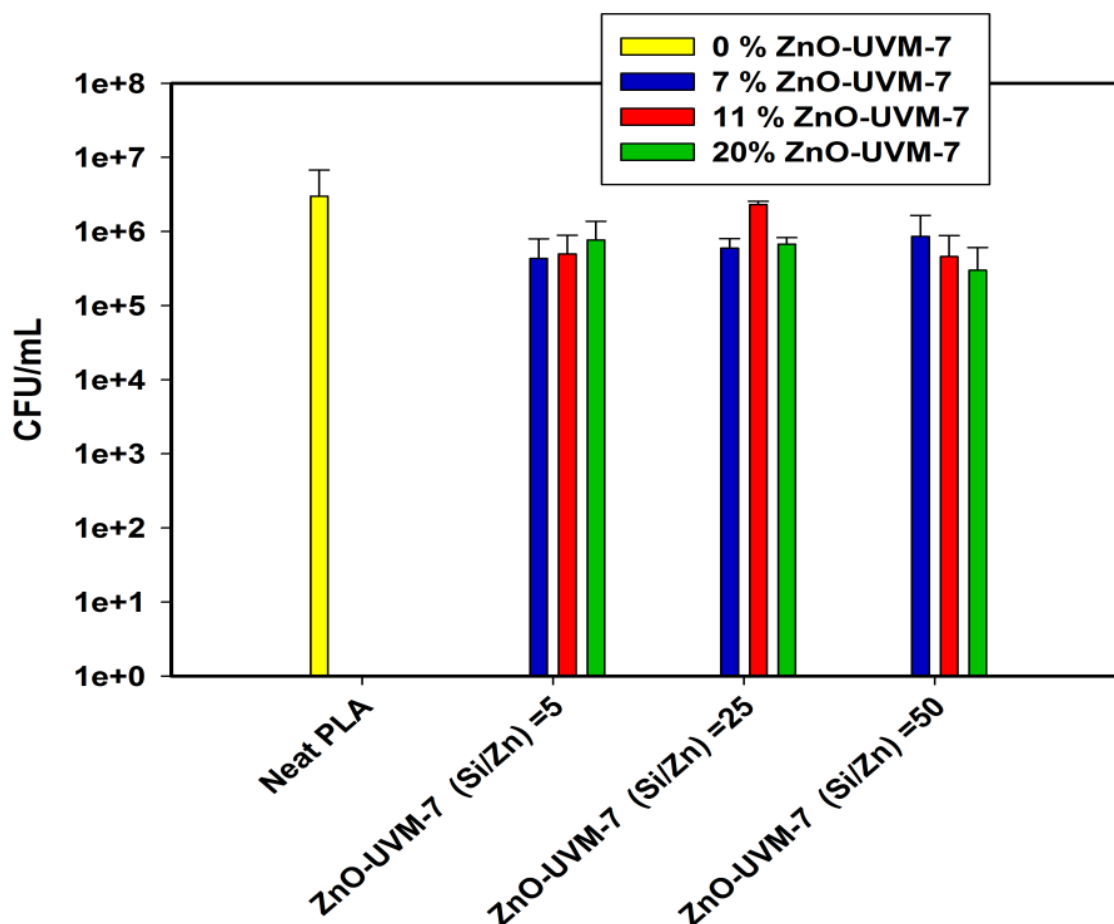


Figure 4.5: ABA of electrospun PLA/ZnO-UVM-7 nanofibers with different ZnO-UVM-7 content, for 3 different molar ratio (5, 25 and 25), against *E. coli* (DH5 α), after incubation at 37 °C for 4 h in phosphate-buffered saline solutions. Data are shown with mean values and standard errors of bacterial counts.

Figure 4.5 shows the ABA of PLA mats containing ZnO-UVM-7 material against *E. coli* (DH5 α). ZnO-UVM-7 with a molar ratio of 5 has the highest Zn content among the silica-doped nanoparticles. The increase in the concentration of this material in the precursor solutions for electrospinning decreased the growth inhibition rate from 85.5 to 74 % for 7 and 20 wt % of the ZnO-UVM-7 nanoparticles, respectively. The decrease of the growth inhibition rate can be explained by the increase of the probability of the nanoparticles agglomeration. For the material having a molar ratio of 25, the PLA mats with 7 wt % exhibited an inhibition of *E. coli* growth of 80 %, but this rate dropped dramatically to 23 % for a content of 11 wt % and then increased again to 77 % for the highest concentration of ZnO-UVM-7 nanoparticles. For a molar ratio of

50, the increase in the content of the ZnO-UVM-7 nanoparticles generated an increase in the growth inhibition rate up to 90 % for 20 wt % ZnO-UVM-7 nanoparticles. This trend was only observed for the material having the lowest content in zinc.

4.4 Discussion

Many studies have strongly indicated that ZnO-NPs have a concentration-dependent ABA [9,10,12,25,27–32]. Jalal and co-workers [27] indicated that the increase of nanoparticle concentration produced higher ABA towards *E. coli* due to the increase of the amount of H_2O_2 generated from the surface of ZnO-NPs [27]. Sawai and co-workers [28] suggested that H_2O_2 is one of the primary factors in the antibacterial mechanism of the ZnO powder slurry. Since the bacterial cell membrane is relatively permeable to these species, it is assumed that they are able to penetrate the cell membrane of *E. coli*, produce injury, and inhibit cell growth [28]. In a previous study [29], they measured the ROS generated in ZnO slurries by chemiluminescence and oxygen electrochemical analyses and found that H_2O_2 produced a concentration that was linearly proportional to the ZnO concentrations [29]. Moreover, the ultrasound stimulations can have an enhancement effect on reducing the *E. coli* growth. This enhancement can be due to nanoparticle dissociation, which will increase nanoparticles penetration into cell membranes in the presence of ultrasound treatment. Additionally, the sterilization of the NP suspensions played a crucial role on the enhancement of the ABA of ZnO-NPs by removing the contaminants and naturally-occurring micro-organisms that already exist in suspensions before their inoculation. In the case of the last group of experiments, the enhancement in the ABA was due to the combination of the autoclaving and the ultrasound effect with the antibacterial effect of the ZnO-NPs.

To the best of our knowledge, the combinatory antibacterial effect of autoclaving, ultrasound stimulations, and ZnO-NPs on *E. coli* has not been studied previously. Thus, the objective of these experiments was to determine the combined influence of ultrasound and autoclave sterilization on inhibiting *E. coli* functions by the ZnO-NPs. The only existing study that has focused on the combined antibacterial effect of ZnO-NPs suspensions has investigated the antibacterial effect of ZnO-NPs in both the absence and the presence of ultrasound stimulations [39]. They concluded that any increase in the antibacterial activity of ZnO-NPs (20 nm), in the presence of ultrasound stimulations, must be attributed to a synergistic antibacterial mechanism

of the combination of the nanoparticles and ultrasound. They assume that the presence of ultrasound stimulations can have a significant effect on decreasing bacteria functions. They explained that, in the presence of ultrasound, the agglomerated nanoparticles with negative surface charge are dissociated, and the flocculated bacteria may also be disrupted. Thus, physical interactions between the nanoparticles and the bacteria membrane may be enhanced: the transport of nanoparticles to the bacteria and their penetration across the bacteria membranes are promoted. Furthermore, the enhanced antibacterial activity observed may be due to the increased zinc ions Zn^{2+} present in the NPs suspensions after sonication, since ultrasonication is a method frequently used to improve the solubility of nanomaterials [39].

As discussed above, the combined effect of sterilization, ultrasound stimulations, and ZnO-UVM-7 material has a significant effect on increasing the ABA of this material. In the presence of sonication and ultrasound stimulations, a complete inhibition of microbial growth was achieved at a level of 6 mg/mL of ZnO, whereas this level was 2 mg/ml for the ZnO-UVM-7 material. This was expected since the average diameter of the ZnO-UVM-7 material (5 nm) is much smaller than the average diameter of ZnO-NPs (20 nm). In addition to the concentration-dependent ABA of ZnO-NPs that has been already discussed above, many studies strongly indicated that ZnO-NPs have a particle size-dependent ABA [7,9,10,24–26]. In fact, one of the parameters involved in ZnO-NPs antibacterial properties is the specific surface area. It increases for reduced particle size, thus enhancing particle surface reactivity [9,10,24,25]. Moreover, generation of H_2O_2 depends mainly on the surface area of ZnO-NPs [24,42]. Padmavathy and Vijayaraghavan [24] studied the AMA of ZnO suspensions against *E. coli* with various particle sizes (12 nm, 45 nm, and 2 μm), using a standard microbial method. They concluded that using small nanoparticles, thus having a larger surface area, will generate a higher concentration of ROS on the surface and will result in greater AMA. More precisely, in the case of smaller ZnO-NPs, more particles are required to cover a bacterial colony (2 μm), which results in the generation of a larger number of ROS, killing bacteria more effectively [24]. Yamamoto [10] used electrical conductivity to evaluate the effect of primary particle size on the ABA of ZnO-NPs (100–800 nm) obtained by milling in a planetary ball mill. He showed that the ABA increased with decreasing particle size [10].

Many factors can explain that the combination of sterilization and ultrasound stimulations decreased considerably the MBC of ZnO and ZnO-UVM-7. In fact, autoclaving the glass powder

vials directly before their inoculation with *E. coli* can allow the removal of any contaminants and the naturally-existing micro-organisms in the antibacterial powder used or the LB medium prepared in the laboratory. On the other hand, the antibacterial mechanisms of nanoparticles may be enhanced in the presence of ultrasound stimulations. In fact, physical interactions between nanoparticles and bacteria membrane may be reinforced due to nanoparticles dissociation and increased nanoparticles penetration into the cell membrane. Moreover, antibacterial metal ions may be released from the particles' surface more easily during the ultrasound to inhibit bacteria proliferation. Only a few studies performed on the MIC and MBC of ZnO-NPs were available in the literature. Reddy and co-workers [37] have found that *E. coli* growth was completely inhibited at a concentration of 3.4 mg/mL of ZnO-NPs with an average diameter of 13 nm. In another study, Emami-Karvani and Chehrazhi [40] evaluated the MIC and the MBC of ZnO-NPs with an average diameter of 3 nm by agar diffusion testing. They found that the concentration that prevented *E. coli* growth was 1 mg/mL whereas the MBC was around 16 mg/mL. A comparison between this study and those presented above is quite complicated since the ZnO-NPs that have been used did not have the same average diameter and, in each case, different antibacterial methods were used to evaluate MIC and MBC.

The TGA results showed that ZnO-NPs loss increased with the increase of its content. This loss is mainly due to agglomeration and sedimentation in solution. Indeed, the solutions for electrospinning were sonicated before the electrospinning to dissociate the nanoparticles in solution, but this process is performed under static conditions over several hours. During the electrospinning process, a certain amount of nanoparticles will sediment in the bottom of the syringe, depending on the ZnO concentration, and are not ejected with the solution.

Regarding the SEM observations, similar results were obtained by Rodriguez-Tobias and co-workers [22] who produced PLA-based mats containing ZnO-NPs with an average diameter of 12 nm, synthesized by a microwave-assisted technique. Their mats were produced from TFE solutions with 10 % (wt/v) of PLA at a voltage of 25 KV, a feed rate of 2.5 mL/min, a rotating collector speed of 700 rpm, and a needle-to-collector distance of 25 cm. The nanofibers were characterized by an average diameter of 700-800 nm, and by the presence of some aggregates up to 300 nm within the PLA fibers [22]. Concerning the absence of the ABA of the PLA-based nanofibers at a content of ZnO (0.6 wt %), it has already been shown that, at very low concentration, ZnO-NPs are non-toxic for *E. coli* since the bacteria can metabolize Zn^{2+} as an

oligo-element [34]. In fact, Reddy and co-workers [37] showed that a concentration of 1 mM of ZnO-NPs was able to consistently increase the number of CFU of *E. coli* compared to the control, whereas the growth of *S. aureus* was completely inhibited at a concentration ≥ 1 mM [37]. In another study conducted by Padmavathy and Vijayaraghavan [24], suspensions at low concentrations of ZnO-NPs (0.01–1 mM) had a slight AMA against *E. coli*, the presence of soluble Zn^{2+} acted as nutrients for this bacteria since the zinc element is an essential cofactor in a variety of cellular processes [15,24]. The slight antibacterial performance provided for 0.8 wt % ZnO-NPs, could be associated with a higher surface area of nanoparticles subject to attack the bacteria by the well-known antibacterial mechanism for metal oxides [7,9,24,27,28,34,36,37]. The further increase in ZnO concentration provoked agglomeration of nanoparticles as it was evidenced by SEM and TGA. In fact, according to the TGA results, the increase of the ZnO-NPs content from 0.8 to 1 wt %, decreased dramatically the ZnO-NPs amount in the PLA-based mats from 63 to 21.5 % compared to the initial amount of nanoparticles used for the preparation of the precursory solutions for electrospinning, and this amount was kept in the range of 22–28 % for the highest concentration. Thus, for 1–3 wt %, a negligible amount of agglomerated ZnO-NPs was incorporated inside PLA-based mats, reducing the ZnO surface area and consequently, decreasing the antibacterial performance. Rodriguez-Tobias and coworkers [22] tested the AMA of PLA-based mats derived from the electrospinning process containing pure ZnO-NPs. They found that 1 wt % of ZnO-NPs demonstrated a growth inhibition rate of only 9.6 %. This reduction was 25.8 % for a 3 wt %, but then was lowered to 14.6 % when the content reached 5 wt % of the ZnO-NPs because of nanoparticles agglomerations [22]. In the present study, the growth inhibition rate was around 17 % for 0.6 wt % ZnO-NPs, which increased dramatically to reach 80 % at 0.8 wt %, and finally dropped in the range 28–33 % for the highest content. Thus, depending on the conditions used during the electrospinning process and the average diameter of the ZnO-NPs used, there is an optimum ZnO-NPs concentration characterized by a higher growth inhibition rate, above this concentration, a drop in the inhibition rate will be observed because of the high probability of the nanoparticle agglomeration.

Furthermore, it can be concluded that *E. coli* exhibited a low sensitivity to the polymer mats with different content of ZnO-NPs. Such results were confirmed by several studies [22,23,34,43]. For example, Rodriguez-Tobias and co-workers [22,23] confirmed this result through two different studies, and noticed that simultaneous electrospinning of PLA solutions with electrospraying of

ZnO dispersions, as well as the use of ZnO-graft-PLA nanoparticles, provided better antibacterial performance than the PLA-based mats filled with pure ZnO-NPs and developed by the electrospinning process [22,23]. The low sensitivity of *E. coli* to polymer-based ZnO-NPs was explained by the complex cell wall structure of Gram-negative bacteria with a thin layer of peptidoglycan between the outer membrane and cytoplasmic one, and the overall negative charge of the bacterial cell surface. In addition, in the present study, the ester groups in PLA mats increase the electron density. Hence, electrostatic repulsion between PLA nanofibers and the partial negatively-charged *E.coli* cell surface are likely [43]. The ABA of nanosized silicon dioxide (SiO₂) has been performed by Adams and co-workers [35] in water suspensions. It was observed that these SiO₂ nanoparticle suspensions (205 nm) led to less than 20 % growth inhibition against *E. coli*, whereas ZnO-NPs (480 nm) showed around 50 % of growth inhibition under the same conditions. It was also noticed that light had no significant effect on increasing the toxicity of SiO₂ [35]. These results were in disagreement with those obtained by Liang and co-workers [44] who found that micro-sized bulk SiO₂ was inert towards bacteria [44]. In a more recent study, a SiO₂/ZnO composite material obtained by two synthesis routes—a sol-gel followed by alkaline precipitation and acidic precipitation demonstrated its effectiveness in inhibiting *E. coli* growth with inhibition growth ranging from 75 to 83 % [45]. This work confirmed the findings of Adams and co-workers [35] that showed that the antibacterial activity of pure ZnO-NPs had a higher activity than the SiO₂/ZnO composite material [35,45]. The growth inhibition rates obtained for PLA mats containing ZnO-UVM-7 material in the present work are in agreement with those found by Spoiala's group [45], with an inhibition rate ranging from 70 % to 90 %.

Comparing ZnO-NPs/PLA-based mats to those from PLA/ZnO-UVM-7, it is possible to affirm that it is possible to maintain a growth inhibition rate above 70 % by using ZnO-UVM-7. This was probably due to the reduced quantity of agglomerated nanoparticles. The incorporation of metal to the silica system by a direct and reproducible one-pot surfactant-assisted procedure allowed the production of silica-based material with ZnO-NPs diameters ranging from 3 to 4 nm. The use of the silica-doped nanoparticles contributed to reduce the agglomeration and at the same time to use antibacterial nanoparticles with very low diameter, providing a higher surface area. The generation of ROS depends on the surface area of nanoparticles, i.e., the amount of H₂O₂ generated should increase with the concentration and surface area of ZnO-NPs [7,24]. Since the

hydroxyl radicals and superoxide are negatively-charged particles, they cannot penetrate the cell membrane and have to remain in direct contact with the outer surface of the bacteria. However H_2O_2 can easily penetrate the cell [24,27]. In fact, the generated ROS can cause the oxidation of the lipid membrane in the cell wall of *E. coli*. In some studies, it was demonstrated that the ABA of ZnO-NPs could occur even in the dark [35,46], indicating that there are other mechanisms apart from those that require UV irradiation for the production of ROS in the absence of light. The negatively-charged bacterial cell [11] will allow strong electrostatic binding between the nanoparticles and the bacteria surface [36], thus producing cell membrane damage [9] that will lead to the leakage of intracellular content [38]. In fact, the ZnO-NPs can either be transported into the cytoplasm or penetrate the cell wall [26,34,47].

The non-toxicity of the electrospun mats produced with the same setup was already assessed by a large number of researchers in our laboratory. It was proven that no residual solvent was remaining in the nanofibers mats. Moreover, most of these nanofibers served in biomedical applications, which could prove their non-toxicity even more. PLLA electrospun nanofibers were produced from TFE solutions. Neural stem-like cells (NSLCs) cultured on these mats have successfully proliferated and differentiated rapidly into motor neurons. These structures may be able to offer a support for the fabrication of motor nerve grafts from NSLCs [48]. In another study, PLA electrospun nanofibers were developed from a mixture of dichloromethane (DCM) and trifluoroacetic acid (TFA). The PLA mats also supported neural stem cell (NSC) adhesion and proliferation, and were, thus, used in developing efficient approaches for NSC expansion in neural tissue engineering applications [49]. In addition, the antibacterial test for the nanofiber mats were performed in PBS solution, which is a water-based medium. Thus, if there was residual solvent remaining inside the nanofiber mats, they would dissolve when immersed in PBS solution. However, on the contrary, they remained intact after four hours of incubation.

4.5 Materials and methods

4.5.1 Materials

PLA was a semi-crystalline grade (INGEO™ Biopolymer 4032D) from NatureWorks LLC (Blair, NE, USA), with $M_n = 133.000$ and molecular weight distribution $M_w/M_n = 1.9$. Other characteristics from the manufacturer were: relative viscosity of 3.94, D stereo-isomer content of

1.4 %, and residual monomer content of 0.14 %. Commercially-available ZnO-NPs were kindly supplied by SkySpring Nanomaterials Inc (Houston, TX, USA) and were used without further purification. The average diameter specified by the supplier was 20 nm, and the specific surface area 30 to 50 m²/g. A second zinc oxide-based nanoparticle system was used and consisted in ZnO nanodomains embedded in bimodal mesoporous silica. This composite powder, referred to as ZnO-UVM-7, was used with three different Zn content (Si/Zn = 5, 25, and 50), and was produced by the atrane method [50–52]. The final ZnO-UVM-7 material was bimodal and mesoporous with high surface area up to 1000 m²/g. These nanoparticles had a diameter ranging from 2 to 5 nm [50]. TFE (TFE ≥ 99%) was purchased from Sigma-Aldrich Co.LLC (Oakville, ON, Canada). Cultures of *Escherichia coli* (*E. coli* strain (DH5α) non-pathogen) were obtained from the Laboratory of Microbiology, Infectiology and Immunology (Université de Montréal, Québec, Canada).

4.5.2 Solutions preparation

In this work, two different solution systems were prepared to investigate the effect of nanoparticles content. In the first one, 0, 0.6, 0.8, 1, 2, and 3 wt % of ZnO-NPs, with respect to polymer, were dispersed in 10 % PLA (wt/v) solutions in TFE. In the second, each of the three ZnO-UVM-7 powders was dispersed in PLA/TFE solutions at concentrations of 7, 1, and 20 wt % with respect to polymer. Solutions mixing was performed at room temperature using a laboratory magnetic stirrer (Corning Inc, Tewksbury, MA, USA) for 24 h to ensure complete dissolution of the polymer and to obtain homogenous solution with a good dispersion of the nanoparticles.

4.5.3 Electrospinning process

Electrospinning was performed at room temperature using a homemade horizontal setup. Each of the prepared PLA solutions was contained in a 10 mL plastic syringe, connected to a stainless steel needle (OD = 18 gauge), and placed in a programmable micro-syringe pump (Havard Apparatus, PHD2000, Havard Apparatus, Holliston, MA, USA). The delivery rate of the spinning solution was 0.5 and 1 mL/h for the PLA solutions prepared in the presence of ZnO-NPs and ZnO-UVM-7, respectively. The electrospinning was conducted at a tip-to-collector distance of 15 cm. A variable voltage of 30–35 KV was provided using a common high-DC voltage power

supply (ES60P-5W Gamma High Voltage Research Inc., Ormond Beach, FL, USA). A web of fibers was collected on a grounded stationary collector covered with aluminum foil. All experiments were conducted in a chamber at a relative humidity of 20–30 % and under atmospheric pressure. Collected electrospun fibers were dried overnight under a chemical fume hood for the evaporation of any remaining solvent.

4.5.4 Scanning Electron Microscopy (SEM)

The morphology of electrospun PLA nanofibers was observed with a JSM-7600TFE field emission gun-scanning electron microscope (FEG-SEM) (HITACHI, Calgary, AB, Canada) operating at 5–10 KV. For better conductivity and to reduce electron charging effects, samples were observed as collected on aluminum foil after sputter-coating with gold. The fiber diameter and fiber diameter distribution were analyzed using Image-Pro Plus software. Approximately, 600 nanofibers randomly chosen from three independent samples (200 nanofibers from each sample) were used for the analysis.

4.5.5 Thermogravimetric Analysis (TGA)

The amount of Zinc oxide powder inside the PLA nanofibers was determined by using TGA Q500 (TA Instruments, New-Castle, DE, USA). The measurements were performed under nitrogen (N₂) atmosphere from 25 to 800 °C at a rate of 10 °C/min.

4.5.6 Fiber's porosity measurement

The porosity of the nanofiber scaffolds was measured using the liquid intrusion method. Scaffolds were weighed prior to their immersion in ethyl alcohol, and they were left overnight on a shaker table to allow diffusion of ethanol into the void volume. The next day, the scaffolds were taken out, blotted with a kimwipe to remove the excess of ethanol and reweighed. This measurement was performed in duplicate samples. The porosity was calculated by dividing the volume of intruded ethanol (as determined by the change in mass due to intrusion and the density of ethanol, 0.789 g/mL) by the total volume after intrusion (i.e., volume of the intruded ethanol combined with the volume of the PLA fibers determined from the initial mass of the PLA scaffold and the density of PLA, 1.25 g/cm³) [53,54].

4.5.7 Antibacterial test

4.5.7.1 Effect of the Combined Effect of sterilization and Ultrasound Stimulations on the ABA of the Zinc Oxide Suspensions

Bacteria were grown in a nutritional-rich medium (Luria Bertani, or LB, broth) under constant agitation for 24 h at 37 °C until reaching a density of approximately 10^9 colony forming units (CFU/mL). In the testing tubes, different concentrations of the analyzed powder were prepared in the presence of LB broth. Then, the appropriate volume of *E. coli* (DH5 α) inoculum was added to reach a bacterial concentration of 10^5 CFU/mL, and the tubes were incubated at 37 °C with shaking for 24 h. The day after, for each sample, six serial dilutions of phosphate-buffered saline (PBS) solution were prepared. Three 10 μ L droplets were taken from each of the six dilutions and were applied onto the LB agar plate. This was also performed for the control tubes, which contained only bacterial culture (i.e., without antibacterial powder). Four different groups of experiments were conducted: in the first one; the powder suspensions were tested directly after their preparation referred as, -S,-U. In the second one, the suspensions were subjected to ultrasonic stimulations (-S,+U). In the third one, the suspensions were autoclaved to eliminate naturally-occurring micro-organisms and used immediately for the following antibacterial tests (+S,-U). In the fourth group, powder suspensions were subjected to both ultrasound stimulations and autoclaving before their contamination (+S,+U). All the tests were performed in triplicate, and the results were expressed as mean values. The minimum concentrations of antibacterial nanoparticles necessary to inhibit bacterial growth (MIC) and to kill bacteria (MBC) were also determined by the CFU method (ASTM E-2149-13a, 2013), one of the most commonly used techniques for the enumeration of bacteria.

4.5.7.2 *In vitro* Antibacterial Efficiency of nanocomposites PLA nanofibers

The antibacterial properties of the different PLA nanocomposite mats were evaluated by using a non-pathogen *E. coli* (DH5 α) as a model bacterium and by following The American Society for Testing and Materials (ASTM E-2149-13a, 2013) standard for antimicrobial agents. Bacteria were grown in a rich medium (LB broth) under constant agitation for 24 h at 37 °C until reaching a density of approximately 10^9 colony forming units (CFU)/mL. Then, the bacterial culture was diluted in a buffer, a non-permissive growth condition (phosphate-buffered saline, or PBS, solution), in order to have a density of approximately 10^6 CFU/mL. The PLA nanofiber (4 cm²)

mats were immersed (after sterilization under UV light for 20 min) into 5 mL of the PBS culture medium containing *E. coli*. Autoclaving was not the suitable method for fiber sterilization as the samples will not be recoverable after immersing them in water. Moreover, the properties of the PLA mats may change at high temperature, since the autoclaving temperature is higher than the glass transition temperature of PLA. Neat PLA fiber mats and untreated bacteria were suspended in PBS and prepared in the same conditions to be used as positive and negative controls, respectively. Then, tubes were incubated at 37 °C (the optimal temperature for bacterial growth) for 4 h in an orbital shaker (New Brunswick). Dilutions of the inoculated suspensions were prepared and deposited on LB agar plates and incubated overnight (18 h) at 37 °C for the counting of the surviving bacteria (CFU/mL). All experiments were carried out in triplicate. All the antimicrobial tests were conducted in the Department of Microbiology, Infectiology, and Immunology at Université de Montréal.

4.6 Conclusions

In this study, the ABA of suspensions of pure ZnO nanoparticles (ZnO-NPs) and mesoporous silica doped with ZnO (ZnO-UVM7), as well as electrospun nanofibers containing those nanoparticles, were investigated. The antibacterial results showed that the combination of ZnO and ZnO-UVM-7 suspensions with pre-treatments, such as ultrasound stimulations and sterilization, could help to enhance their ABA against *E. coli*. The use of these pre-treatments also decreased the MBC of the powders' suspensions considerably. Thus the bacteriostatic/bacteriocidal effect of these suspensions has occurred at a lower content of nanoparticles. The *E. coli* growth was completely inhibited at a concentration of 6 and 2 mg/mL for ZnO and ZnO-UVM-7, respectively, in the presence of these pre-treatments. Thereby, the use of mesoporous silica doped with ZnO has allowed the improvement of the ABA of these suspensions. The ABA results have confirmed that the zinc oxide suspensions have a concentration-dependent and size-dependent activity.

Electrospinning was used to fabricate nanofiber mats of PLA filled with either ZnO or ZnO-UVM-7 nanoparticles. SEM images showed the presence of nanoparticle agglomerates of around 1 µm in diameter within the nanofiber's network. The absence of the ABA of PLA-based nanofibers at the lowest content (0.6 wt %), was explained by the fact that, at very low concentration, ZnO-NPs are non-toxic for *E. coli* since they can metabolize Zn^{2+} as an oligo-

element. The increase in ZnO content above 1 wt % increased the probability of agglomeration and sedimentation and dramatically reduced the ZnO-NPs amount in the PLA-based mats. Thus, the growth inhibition rate of *E. coli* was reduced considerably from 80 % to 30 % for the highest ZnO content. The use of ZnO-UVM-7 silica-doped nanoparticles had probably improved the nanoparticles' dispersion since the PLA nanofibers filled with ZnO-UVM-7 were able to maintain an inhibition growth rate higher than 70 %.

Acknowledgment: Financial support of 3S Pack NSERC/Saputo/Prolamina Industrial Research Chair from the natural Sciences and Engineering research council Canada and Industrial partners is gratefully acknowledged.

Author Contributions: “Hajer.Rokbani. France.Daigle. and Abdellah.Ajji. conceived and designed the experiments; Hajer.Rokbani performed the experiments; Hajer.Rokbani. France.Daigle. and Abdellah.Ajji. analyzed the data; France.Daigle. and Abdellah.Ajji. contributed reagents/materials/analysis tools; Hajer.Rokbani. France.Daigle. and Abdellah.Ajji. wrote/edited the paper.”

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

4.7 References

1. Tawakkal, I.S.; Cran, M.J.; Miltz, J.; Bigger, S.W. A review of poly (lactic acid)-based materials for antimicrobial packaging. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, R1477-R1490.
2. Kim, E.S.; Kim, S.H.; Lee, C.H. Electrospinning of polylactide fibers containing silver nanoparticles. *Macromol Res* **2010**, *18*, 215-221.
3. Conn, R.; Kolstad, J.; Borzelleca, J.; Dixler, D.; Filer, L.; LaDu, B.; Pariza, M. Safety assessment of polylactide (pla) for use as a food-contact polymer. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33*, 273-283.
4. Li, D.; Frey, M.W.; Baeumner, A.J. Electrospun polylactic acid nanofiber membranes as substrates for biosensor assemblies. *J Membrane Sci* **2006**, *279*, 354-363.
5. Rhim, J.-W.; Park, H.-M.; Ha, C.-S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 1629-1652.

6. Bumbudsanpharoke, N.; Ko, S. Nano-food packaging: An overview of market, migration research, and safety regulations. *J. Food Sci.* **2015**, *80*.
7. Jones, N.; Ray, B.; Ranjit, K.T.; Manna, A.C. Antibacterial activity of zno nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *279*, 71-76.
8. Shi, L.-E.; Li, Z.-H.; Zheng, W.; Zhao, Y.-F.; Jin, Y.-F.; Tang, Z.-X. Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of zno nanoparticles: A review. *Food Addit Contam A* **2014**, *31*, 173-186.
9. Zhang, L.; Jiang, Y.; Ding, Y.; Povey, M.; York, D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of zno nanoparticles (zno nanofluids). *J. Nanopart. Res.* **2007**, *9*, 479-489.
10. Yamamoto, O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *Int. J. Inorg. Mater.* **2001**, *3*, 643-646.
11. Stoimenov, P.K.; Klinger, R.L.; Marchin, G.L.; Klabunde, K.J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir* **2002**, *18*, 6679-6686.
12. Sawai, J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (zno, mgo and cao) by conductimetric assay. *J. Microbiol. Methods* **2003**, *54*, 177-182.
13. Emamifar, A.; Kadivar, M.; Shahedi, M.; Soleimanian-Zad, S. Effect of nanocomposite packaging containing ag and zno on inactivation of lactobacillus plantarum in orange juice. *Food Control* **2011**, *22*, 408-413.
14. Emamifar, A.; Kadivar, M.; Shahedi, M.; Soleimanian-Zad, S. Evaluation of nanocomposite packaging containing ag and zno on shelf life of fresh orange juice. *Innov Food Sci Emerg* **2010**, *11*, 742-748.
15. Espitia, P.J.P.; Soares, N.d.F.F.; dos Reis Coimbra, J.S.; de Andrade, N.J.; Cruz, R.S.; Medeiros, E.A.A. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food Bioprocess Tech* **2012**, *5*, 1447-1464.
16. Sirelkhatim, A.; Mahmud, S.; Seenii, A.; Kaus, N.H.M.; Ann, L.C.; Bakhori, S.K.M.; Hasan, H.; Mohamad, D. Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Lett* **2015**, *7*, 219-242.
17. Rodríguez-Tobías, H.; Morales, G.; Grande, D. Electrospinning and electrospraying techniques for designing antimicrobial polymeric biocomposite mats. *NANOFIBER RESEARCH* **2016**, *91*.

18. Shalumon, K.; Anulekha, K.; Nair, S.V.; Nair, S.; Chennazhi, K.; Jayakumar, R. Sodium alginate/poly (vinyl alcohol)/nano zno composite nanofibers for antibacterial wound dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *49*, 247-254.
19. Augustine, R.; Dominic, E.A.; Reju, I.; Kaimal, B.; Kalarikkal, N.; Thomas, S. Electrospun polycaprolactone membranes incorporated with zno nanoparticles as skin substitutes with enhanced fibroblast proliferation and wound healing. *RSC Advances* **2014**, *4*, 24777-24785.
20. Augustine, R.; Kalarikkal, N.; Thomas, S. Effect of zinc oxide nanoparticles on the in vitro degradation of electrospun polycaprolactone membranes in simulated body fluid. *Int J Polym Mater PO* **2016**, *65*, 28-37.
21. Virovska, D.; Paneva, D.; Manolova, N.; Rashkov, I.; Karashanova, D. Electrospinning/electrospraying vs. Electrospinning: A comparative study on the design of poly (l-lactide)/zinc oxide non-woven textile. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *311*, 842-850.
22. Rodríguez-Tobías, H.; Morales, G.; Grande, D. Improvement of mechanical properties and antibacterial activity of electrospun poly(d,l-lactide)-based mats by incorporation of zno-graft-poly(d,l-lactide) nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.* **2016**, *182*, 324-331.
23. Rodríguez-Tobías, H.; Morales, G.; Ledezma, A.; Romero, J.; Grande, D. Novel antibacterial electrospun mats based on poly(d,l-lactide) nanofibers and zinc oxide nanoparticles. *J Mater Sci* **2014**, *49*, 8373-8385.
24. Padmavathy, N.; Vijayaraghavan, R. Enhanced bioactivity of zno nanoparticles—an antimicrobial study. *Sci Technol Adv Mat* **2008**, *9*, 035004.
25. Zhang, L.; Jiang, Y.; Ding, Y.; Daskalakis, N.; Jeuken, L.; Povey, M.; O'Neill, A.J.; York, D.W. Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of zno nanoparticles against e. Coli. *J. Nanopart. Res.* **2010**, *12*, 1625-1636.
26. Raghupathi, K.R.; Koodali, R.T.; Manna, A.C. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir* **2011**, *27*, 4020-4028.
27. Jalal, R.; Goharshadi, E.K.; Abareshi, M.; Moosavi, M.; Yousefi, A.; Nancarrow, P. Zno nanofluids: Green synthesis, characterization, and antibacterial activity. *Mater. Chem. Phys.* **2010**, *121*, 198-201.

28. Sawai, J.; Shoji, S.; Igarashi, H.; Hashimoto, A.; Kokugan, T.; Shimizu, M.; Kojima, H. Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. *J. Ferment. Bioeng.* **1998**, *86*, 521-522.
29. Sawai, J.; Shoji, S.; Igarashi, H.; Hashimoto, A.; Kokugan, T.; Shimizu, M.; Kojima, H. Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. *J. Chem. Eng. Jpn.* **1996**, *29*, 627-633.
30. Wahab, R.; Mishra, A.; Yun, S.-I.; Hwang, I.; Mussarat, J.; Al-Khedhairi, A.A.; Kim, Y.-S.; Shin, H.-S. Fabrication, growth mechanism and antibacterial activity of zno micro-spheres prepared via solution process. *Biomass Bioenergy* **2012**, *39*, 227-236.
31. Liu, Y.; He, L.; Mustapha, A.; Li, H.; Hu, Z.; Lin, M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against escherichia coli o157: H7. *J Appl Microbiol* **2009**, *107*, 1193-1201.
32. Saliani, M.; Jalal, R.; Goharshadi, E.K. Effects of ph and temperature on antibacterial activity of zinc oxide nanofluid against escherichia coli o157: H7 and staphylococcus aureus. *Jundishapur J Microb* **2015**, *8*.
33. Lipovsky, A.; Nitzan, Y.; Gedanken, A.; Lubart, R. Antifungal activity of zno nanoparticles—the role of ros mediated cell injury. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 105101.
34. Brayner, R.; Ferrari-Iliou, R.; Brivois, N.; Djediat, S.; Benedetti, M.F.; Fiévet, F. Toxicological impact studies based on escherichia coli bacteria in ultrafine zno nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 866-870.
35. Adams, L.K.; Lyon, D.Y.; Alvarez, P.J. Comparative eco-toxicity of nanoscale tio₂, sio₂, and zno water suspensions. *Water Res.* **2006**, *40*, 3527-3532.
36. Zhang, L.; Ding, Y.; Povey, M.; York, D. Zno nanofluids—a potential antibacterial agent. *Prog Nat Sci* **2008**, *18*, 939-944.
37. Reddy, K.M.; Feris, K.; Bell, J.; Wingett, D.G.; Hanley, C.; Punnoose, A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90*, 213902.
38. Xie, Y.; He, Y.; Irwin, P.L.; Jin, T.; Shi, X. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against campylobacter jejuni. *Appl Environ Microb* **2011**, *77*, 2325-2331.
39. Seil, J.T.; Webster, T.J. Antibacterial effect of zinc oxide nanoparticles combined with ultrasound. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 495101.

40. Emami-Karvani, Z.; Chehraz, P. Antibacterial activity of zno nanoparticle on gram-positive and gram-negative bacteria. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2011**, *5*, 1368-1373.
41. Tayel, A.A.; EL-TRAS, W.F.; Moussa, S.; EL-BAZ, A.F.; Mahrous, H.; Salem, M.F.; Brimer, L. Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens. *J Food Safety* **2011**, *31*, 211-218.
42. Ohira, T.; Yamamoto, O. Correlation between antibacterial activity and crystallite size on ceramics. *Chem. Eng. Sci.* **2012**, *68*, 355-361.
43. Amna, T.; Hassan, M.S.; Barakat, N.A.; Pandeya, D.R.; Hong, S.T.; Khil, M.-S.; Kim, H.Y. Antibacterial activity and interaction mechanism of electrospun zinc-doped titania nanofibers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 743-751.
44. Liang, J.; Wu, R.; Huang, T.; Worley, S. Polymerization of a hydantoinylsiloxane on particles of silicon dioxide to produce a biocidal sand. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *97*, 1161-1166.
45. Spoiala, A.; Nedelcu, I.; Fikai, D.; Fikai, A.; Andronescu, E. Zinc based antibacterial formulations for cosmetic applications. *Dig J Nanomater Bios* **2013**, *8*, 1235.
46. Hirota, K.; Sugimoto, M.; Kato, M.; Tsukagoshi, K.; Tanigawa, T.; Sugimoto, H. Preparation of zinc oxide ceramics with a sustainable antibacterial activity under dark conditions. *Ceram. Int.* **2010**, *36*, 497-506.
47. Applerot, G.; Perkas, N.; Amirian, G.; Girshevitz, O.; Gedanken, A. Coating of glass with zno via ultrasonic irradiation and a study of its antibacterial properties. *Appl. Surf. Sci.* **2009**, *256*, S3-S8.
48. Binan, L.; Tendey, C.; De Crescenzo, G.; El Ayoubi, R.; Ajji, A.; Jolicoeur, M. Differentiation of neuronal stem cells into motor neurons using electrospun poly-l-lactic acid/gelatin scaffold. *Biomaterials* **2014**, *35*, 664-674.
49. Hadjizadeh, A.; Savoji, H.; Ajji, A. A facile approach for the mass production of submicro/micro poly (lactic acid) fibrous mats and their cytotoxicity test towards neural stem cells. *BioMed research international* **2016**, 2016.
50. El Haskouri, J.; Dallali, L.; Fernández, L.; Garro, N.; Jaziri, S.; Latorre, J.; Guillem, C.; Beltrán, A.; Beltrán, D.; Amorós, P. Zno nanoparticles embedded in uvm-7-like mesoporous silica materials: Synthesis and characterization. *Physica E* **2009**, *42*, 25-31.

51. El Haskouri, J.; de Zárate, D.O.; Guillem, C.; Latorre, J.; Caldés, M.; Beltrán, A.; Beltrán, D.; Descalzo, A.B.; Rodríguez-López, G.; Martínez-Máñez, R. Silica-based powders and monoliths with bimodal pore systems. *Chem. Commun.* **2002**, 330-331.
52. Cabrera, S.; El Haskouri, J.; Guillem, C.; Latorre, J.; Beltrán-Porter, A.; Beltrán-Porter, D.; Marcos, M.D.; Amoros, P. Generalised syntheses of ordered mesoporous oxides: The atrane route. *Solid State Sci* **2000**, 2, 405-420.
53. de Valence, S.; Tille, J.C.; Giliberto, J.P.; Mrowczynski, W.; Gurny, R.; Walpoth, B.H.; Möller, M. Advantages of bilayered vascular grafts for surgical applicability and tissue regeneration. *Act Biomater* **2012**, 8, 3914-3920.
54. Savoji, H.; Lerouge, S.; Ajji, A.; Wertheimer, M.R. Plasma-etching for controlled modification of structural and mechanical properties of electrospun pet scaffolds. *Plasma Process Polym* **2015**, 12, 314-327.

CHAPITRE 5 ARTICLE 2: RHEOLOGICAL PROPERTIES OF POLY(LACTIC ACID) SOLUTIONS ADDED WITH METAL OXIDE NANOPARTICLES FOR ELECTROSPINNING

*Hajer Rokbani and Abdellah Ajji**

3SPack, CREPEC, Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal,

P.O. Box 6079, Station Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3A7

(Cet article a été publié en ligne le 27 novembre 2017 dans *Journal of Polymers and the Environment*)

5.1 Abstract

Nanocomposites based on poly(lactic acid) (PLA) with antibacterial properties are of great potential interest as food packaging biomaterials. The investigations carried out in this study include the rheological properties of PLA/ZnO nanoparticles solutions used in the electrospinning of nanofibrous mats and the morphological evaluation of the mats. A detailed rheological analysis of the solutions used for electrospinning was carried out to understand the achieved morphology and structure of nanofibers (NFs). The effect of ZnO nanoparticles (ZnO-NPs) was investigated for various PLA solutions and solvents. The polymer solutions were prepared at various loading levels of ZnO: 0.4, 0.8, 1, 3 and 5 wt % relative to the polymer. Two solvent systems were used: 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) and chloroform. PLA with a low loading level of ZnO-NPs showed higher viscosity than neat PLA solutions. They also showed a maximum value of viscosity at 3 wt % content. Solutions containing more than 3 wt % ZnO exhibited a notable decrease in viscosity, which was attributed to PLA degradation. Other nanoparticles (NPs) such as SiO₂ and TiO₂ showed no decrease in the solution viscosity for all concentrations. The morphological characterization of the electrospun nanofibers was performed using scanning electron microscopy (SEM). The SEM images showed a network of smooth, randomly oriented, PLA nanofibers (PLA-NFs) and ZnO agglomeration was observed on the

surface of the NFs. In the case of the PLA mats produced from PLA/TFE/ZnO suspensions with decreased viscosity, the SEM results confirmed the generation of beaded-fibers.

Keywords Poly(lactic acid) · ZnO nanoparticles · Electrospinning process · Rheological properties

5.2 Introduction

As the environmental impact of plastics as waste becomes a global concern in addition to the increasing cost of producing petrochemical-based polymers, there is considerable interest in developing biodegradable polymers and even more interest in developing bio-sourced biodegradable polymers [1]. PLA is a thermoplastic with high tensile strength and a modulus that can be made from renewable resources to yield articles for use in various applications, among which include food packaging or the biocompatible/bio-absorbable medical device markets [2]. The goal of food packaging is to contain food in a cost-effective way that satisfies industry requirements and consumer desires, maintains food safety, and minimizes environmental impact [3]. Novel and efficient polymeric materials for food packaging are developed using nanomaterials with specific functions that can provide solutions to food industry challenges related to product safety and material performance as well as economic and environmental advantages. In food preservation, the use of these nanostructures can extend and improve packaging functions leading to a new kind of active packaging. Antimicrobial packaging is a type of active packaging which interacts with the products or the headspace inside the package to reduce, inhibit or retard the growth of microorganisms that may be present on food surfaces [4].

Antimicrobial agents can be broadly classified into two categories, organic and inorganic. Inorganic materials such as metal and metal oxides are being increasingly used in antimicrobial applications because of their stability against harsh processing conditions [5], robustness and long shelf life [6]. Metal oxides such as TiO_2 , ZnO, MgO and CaO, are regarded as safe materials to human beings and animals. Their antimicrobial efficiency has been widely investigated by many researchers [7–9].

ZnO is one of five zinc oxide compounds that are currently listed as generally recognized as safe (GRAS) by the U.S Food and Drug Administration [10]. ZnO is currently being used in both

microscale and nanoscale formulations. However, it is well known that toxicity of NPs is greater than the toxicity of larger particles of the same materials, even for materials with relatively low toxicity [11]. ZnO can be used as a drug carrier, in cosmetics and as a filling in medical materials since it is nontoxic, bio-safe and biocompatible [12]. ZnO has shown selective toxicity toward a wide range of both Gram-positive and Gram-negative bacteria including major food-borne organisms such as *Escherichia coli* (*E. coli*), *Listeria* and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [13–15]. It has been demonstrated that the antimicrobial activity of ZnO-NPs is directly related to their surface area and concentration [15]. Larger surface area and higher concentration exhibited better activity [13].

Commonly accepted mechanisms of antibacterial action of ZnO-NPs are the formation of reactive oxygen species (ROS), the interaction of NPs with bacteria, and the release of Zn^{2+} ions [4, 16]. At present, the main food application of ZnO-NPs is as an antibacterial agent in packaging material. The presence of ZnO NPs in the polymeric matrix allows the packaging to interact with the food and have a dynamic role in their preservation [4], so that pathogen contamination will be reduced and the shelf-life of food products will be extended [16]. ZnO-NPs have been incorporated in different materials including PLA [17], glass [18], low density polyethylene (LDPE) [19–21], polypropylene (PP) [22], polyurethane (PU) [23], paper [24] and chitosan [25, 26], using different incorporation methods to develop the antimicrobial nanocomposites.

Electrospinning is a cost-effective and relatively simple technology used to produce continuous and uniform polymer NFs [27] with diameters ranging from 2 nm to several micrometers using polymer solutions of both natural and synthetic polymers [28]. There are three components of the electrospinning process: a high voltage supplier, a syringe pump, and a collecting mean. Many parameters can alter the production of the NFs from the polymer solution during the electrospinning process. These are manifested in the solution properties such as viscosity, elasticity, conductivity and surface tension and reflected in the polymer related parameters such as solubility, molecular weight, and molecular weight distribution; the electric potential applied at the capillary tip; the gap (distance between the needle tip and the collector) and ambient parameters such as humidity and temperature in the electrospinning chamber [29, 30]. PLA has been successfully electrospun from a variety of solvents, and a wide variety of materials have been incorporated in electrospun PLA-NFs to tailor the fibers for particular end uses [31, 32].

Solution viscosity, and hence its rheological properties, are of great importance in the electrospinning process, particularly for its stability and the final nanostructure (nanobeads, beaded nanofibers or nanofibers). Several studies have characterized the rheological properties of nanoparticles-suspended in polymer solutions used in electrospinning [33–36].

ZnO-NPs have been incorporated in various fibrous materials using the electrospinning process of PLA/ZnO solutions [32–34]. However, to the best of our knowledge until now, none of these studies monitored the effect of both the fillers and the solvent's nature on the stability and/or viscosity of the solutions under various conditions of concentration, time and nature of the filler. In particular, PLA degradation under some conditions can significantly affect the processing dynamics and the quality of produced NFs mats.

This work aims to fully understand the degradation mechanism of PLA in TFE solvent and investigate the role played by the ZnO-NPs in the degradation kinetics in solution. Moreover, one of the objectives of this work was to characterize the solution viscosity profile in the presence of different kinds of metal oxides NPs and various PLA solvents. We also investigated the effect of ZnO-NPs on the final morphology of PLA-NFs. The results of this research would lead to the proper selection of the PLA-solvent/ZnO-NPs combination for which PLA degradation in solution can be avoided. These solutions could be used for the preparation of PLA-NFs with different amount of ZnO-NPs by the electrospinning process to serve as antibacterial food packaging material.

5.3 Methodology

5.3.1 Materials

PLA, is a semi-crystalline grade (INGEO TM Biopolymer 4032D) from NatureWorks LLC (Blair, Nebraska, USA), with $M_n = 133.000$ and molecular weight distribution $M_w/M_n = 1.9$. Other characteristics from the manufacturer were : relative viscosity of 3.94, D stereo-isomer content 1.4 % and residual monomer content of 0.14 %. Commercially available ZnO-NPs were kindly supplied by SkySpring Nanomaterials Inc. (Houston, TX, USA) and were used without further purification. The average diameter specified by the supplier was 20 nm, and the specific surface area 30–50 m^2/g . A second ZnO-NPs system was used and consisted in ZnO

nanodomains embedded in bimodal mesoporous silica. This composite powder, referred to as ZnO-UVM-7 and having a high Zn content ($\text{Si}/\text{Zn} = 5$), was produced by the atrane method [37–39]. The final ZnO-UVM-7 material was bimodal and mesoporous with a high surface area of $750 \text{ m}^2/\text{g}$. By following this approach, the dispersion of the ZnO-NPs in an inert matrix, allowed to control the degree of dispersion so that the size of the NPs inhibit the possibility of aggregation. The control of these parameters is essential to maximize the efficiency and activity of these NPs. The presence of ZnO-NPs was confirmed by observations in a transmission electron microscope (TEM), shown in Figure 5.1. All the ZnO-NPs that were used for this doping had a diameter ranging from 2 to 5 nm [37]. The titanium oxide powder used was commercially available in forms of TiO_2 Aeroxide TiO_2 P25 from Evonik (Degussa, GmbH, Switzerland). It is a mixed particle system of approximately 75–80 % anatase and 20–25 % rutile with a specific surface area of $50 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ and comprised of aggregated and agglomerated clusters of primary particles with diameters of $\approx 21 \text{ nm}$. Fumed silica powder (SiO_2) was supplied by Sigma Aldrich Co. LLC. (Oakville, Ontario, Canada). TFE ($\text{TFE} \geq 99 \%$) was purchased from Sigma–Aldrich Co. LLC. (Oakville, Ontario, Canada). Chloroform (Approx. 0.75 % ethanol as preservative) was supplied by Fisher Scientific (Ottawa, Ontario, Canada).

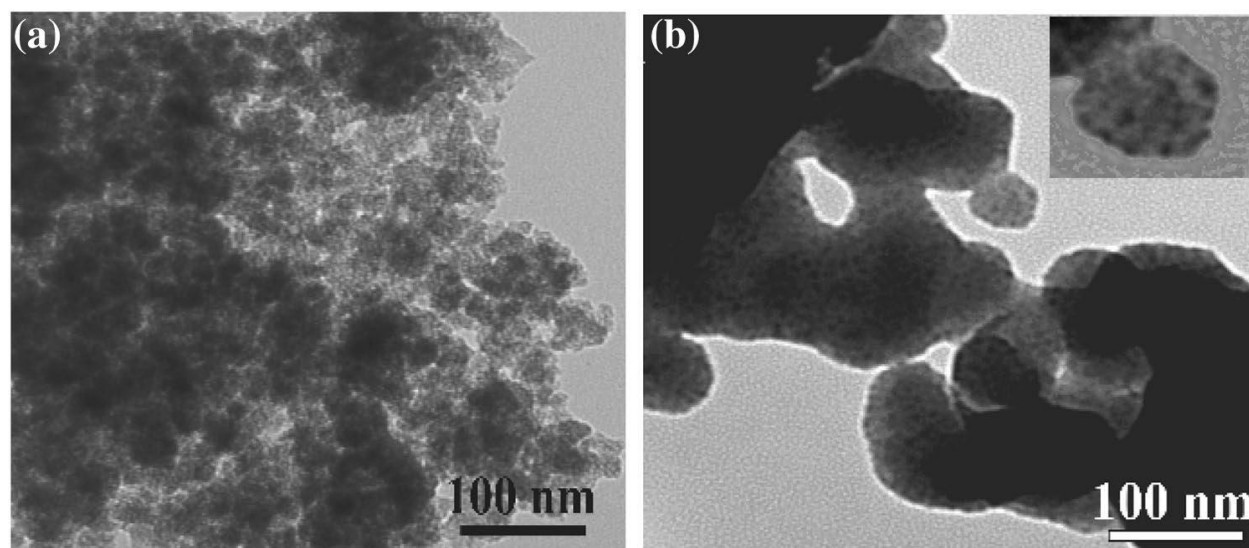


Figure 5.1: TEM images of ZnO-UVM-7 materials: **a** UVM-7($\text{Si}/\text{Zn} = \infty$); and **b** UVM-7($\text{Si}/\text{Zn} = 5$) [37].

5.3.2 Solutions preparations

To investigate the effect of filler content, 0, 0.4, 0.8, 1, 3 and 5 % (wt/wt) of the corresponding oxide : ZnO, ZnO/UVM-7, SiO₂, and TiO₂ were dispersed in PLA (13 wt %) solutions. Different solution systems were prepared. For the first one, the powder oxide (ZnO, ZnO-UVM-7, SiO₂ and TiO₂) and the PLA pellets were dissolved in TFE. In the second, chloroform was the solvent used for PLA and ZnO-NPs. Solutions mixing was performed at room temperature using a laboratory magnetic stirrer (Corning Inc, MA, USA) for 24 h to ensure complete dissolution of the polymer and obtain homogeneous solution with a good dispersion of the nanoparticles.

5.3.3 Electrospinning process

Each of the prepared PLA solutions was contained in a 10 mL plastic syringe, connected to a stainless steel needle (OD = 18 gauge), and placed in a syringe pump (Havard Apparatus, PHD2000, USA). The delivery rate of the spinning solution was 1 mL/h. The electrospinning was conducted at a tip-to-collector distance of 15 cm. An applied voltage of 20 kV was provided using a common high-voltage power supply (ES60P-5W Gamma high voltage research Inc, Ormond Beach, FL, USA). A web of fibers was collected on a grounded stationary collector covered with aluminum foil.

5.3.4 Characterization

5.3.4.1 Acid Value Analysis

Direct titration of the carboxylic groups of the neat PLA and PLA/ZnO suspensions was performed with the help of a solution of potassium hydroxide (KOH) in methanol (MeOH) with a concentration of $2.03 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$. The solution for titration was obtained by dissolving around 6 g of PLA in 60 mL of chloroform or TFE. A pH sensor (Oakton PC2700) was used to follow the evolution of the solution acidity and to reveal the equivalent volume (V_e) used to determine the acid value (Av) by the following equation:

$$Av = \frac{V_e \times C(\text{KOH}) \times M(\text{KOH})}{m(\text{PLA})} \quad \text{Equation 5.1}$$

where V_e (milliliters) corresponds to the equilibrium pH plateau, C (KOH) is the molar concentration (moles per liter) of KOH, M (KOH) is the molar mass (grams per mole) of KOH and m (PLA) is the weight (grams) of dissolved PLA. The A_v is given in milligrams (KOH) per gram (Polymer) as a convention [40].

The PLA/NPs solutions already prepared in chloroform were characterized directly. Whereas the TFE solutions were evaporated in the free area under the hood for about seven days, and then the mixture polymer/NPs was dissolved again in chloroform.

5.3.4.2 Scanning Electron Microscopy (SEM)

JSM-7600 TFE Field Emission Gun-Scanning Electron Microscopy (FEG-SEM) (Calgary, Alberta, Canada) operating at 5–10 kV was used to examine the morphology of the electrospun mat. The specimens for SEM examination were sputter-coated with gold to avoid charge accumulation.

5.3.4.3 Infrared Spectroscopy

Fourier Transform infrared (FT-IR) spectra of PLA pellets, TFE solvent and various TFE suspensions based on PLA and ZnO-NPs were recorded using a Spectrum 65 Perkin Elmer (Woodbridge, Ontario, Canada) FT-IR spectrometer at 4 cm^{-1} resolution and 32 scans. All spectra were recorded in the Attenuated Total Reflection Mode in the $4000 - 600\text{ cm}^{-1}$ region.

5.3.4.4 Measurement of Rheological properties

The viscosity of the solutions as a function of shear rate was analyzed by using a controlled stress Rheometer (MCR-502, Anton Paar Modular Compact, Germany) with a double Couette flow geometry (DG26.7/T200/SS, gap = 0.35 mm) at 25 °C. To ensure homogeneity and good dispersion for NPs, the solutions were thoroughly mixed for 10 min at room temperature using a laboratory magnetic stirrer (Corning Inc, MA, USA), just before loading the sample to be analyzed. Each solution was analyzed twice with two independent samples, and the viscosity measurements were conducted over the shear rate range of 1 to 600 s^{-1} at 25 °C. The solution was kept for a given time prior to the measurements to relax residual stress at the measurement temperature. To prevent evaporation of the solvent during analysis, heavy mineral oil (Aldrich)

was fully applied on the solution's surface. The same solutions were kept and were analyzed after 5 days and then again after 25 days from their preparation.

5.4 Results and discussion

5.4.1 Rheological properties of PLA solutions used as precursors for electrospinning

Electrospinning is a versatile technique for the fabrication of nanofibrous materials, and the final morphology strongly depends on the intrinsic properties of the solution itself, its conductivity and viscosity. The incorporation of NPs might strongly affect these parameters. Thus it is essential to carry out an extensive study of these parameters for the PLA solutions as a function of shear rate. In this regard, Figure 5.2 shows the dynamic viscosity of PLA dissolved in TFE with and without ZnO-NPs as a function of shear rate. Figure 5.2a represents the viscosity measurement results 5 days after the preparation of the solutions. PLA and PLA/ZnO solutions show Newtonian behavior region below 40 s^{-1} , followed by a shear thinning behavior for higher shear rate. The incorporation of ZnO-NPs increases the viscosity of PLA solutions even at low loading levels of 0.4, 0.8 and 1 wt % which correspond to a volume fraction of 0.92, 1.85 and $2.31 \cdot 10^{-4}$, respectively. The increase in the solution viscosity can be explained by the strong interaction between polar ZnO and the polar polymer which can limit the mobility of PLA chains in the suspension.

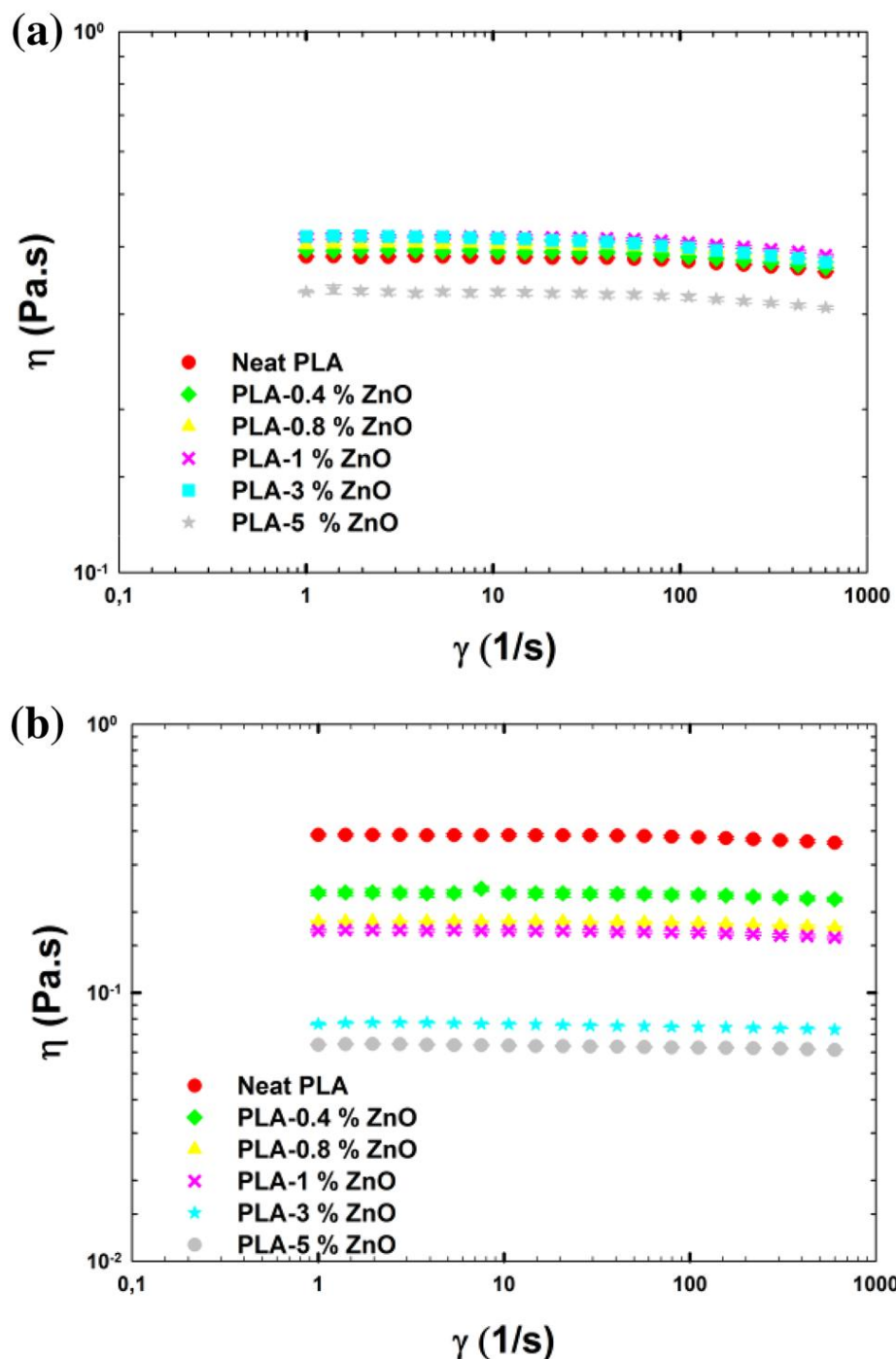


Figure 5.2: Viscosity of PLA solutions with different contents of ZnO as a function of shear rate in TFE at 25 °C: **a** 5 days; and **b** 25 days after the preparation of solutions.

However, viscosity does not increase monotonously with the ZnO content but shows a maximum at 1 wt %. This peak can be clearly detected in Figure 5.3, which represents the viscosity of PLA/TFE solutions as a function of ZnO content at a constant shear rate of 1 s^{-1} . The maximum

in viscosity indicates that ZnO-NPs interact most efficiently with the polymer molecules at this content. The viscosity of PLA solutions with 3 wt % is lower than that of the solution containing 1 wt %, and that of the solution with 5 wt % is even lower than that for neat PLA (Figure 5.3). Chae et al. [36] noticed the same behavior for polyacrylonitrile (PAN) and ZnO suspensions and explained the dynamic viscosity decrease by the fact that the substantial interacting site can be decreased above the critical content because of the formation of ZnO agglomerates. Thereby, certain parts of the adsorbed polymer on the NPs is entirely restricted by the excessive NPs, leading to the reduction of the polymer concentration in the liquid phase. This was interpreted as responsible for the decrease in viscosity of the suspension [36].

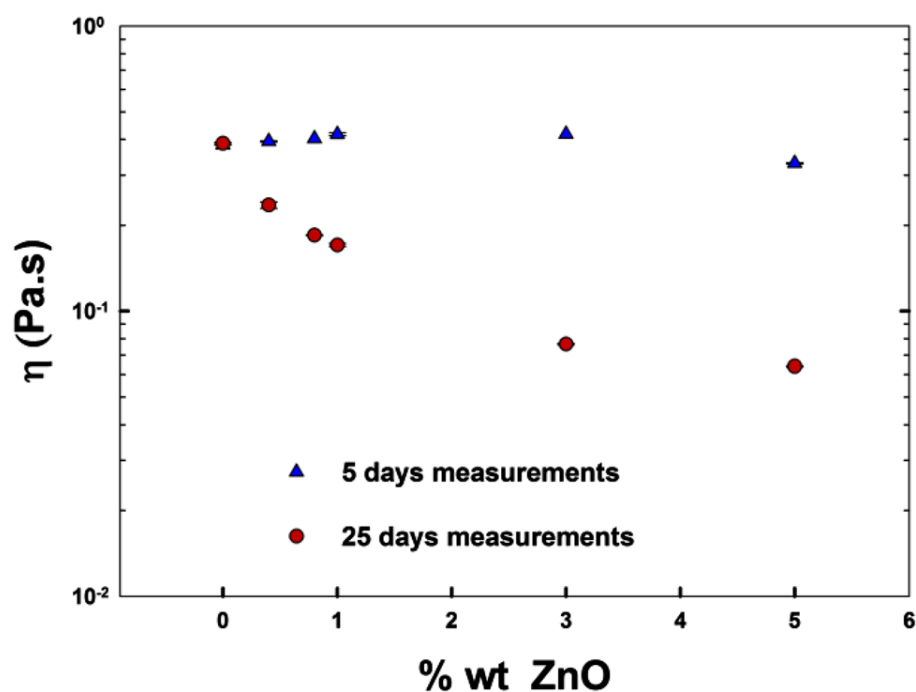


Figure 5.3: Viscosity of PLA solutions as a function of ZnO contents, at a shear rate of 1 s^{-1} , in TFE for 5 and 25 days, respectively after the preparation of solutions.

Rodrigues-Tobias et al. [33, 34] also explained the variation in viscosity of PLA and TFE solutions containing ZnO-NPs as due to combined effects of hydrogen bonding between hydroxyl groups on the surfaces of the NPs and the carbonyl groups in the PLA matrix and/or the formation of ZnO aggregates, which could disrupt the flow properties of PLA-based solutions [33, 34]. The viscosity of the same solutions measured 25 days after their preparation is presented

in Figure 5.2b. They exhibit a Newtonian behavior for all the shear rate from 1 to 600 s^{-1} . The viscosity of the neat PLA solutions remained in the same range of 0.38 Pa.s. Whereas all the PLA suspensions containing ZnO-NPs displayed an important decrease in viscosity, that was enhanced as the ZnO content increased (Figure 5.3). These solutions exhibited good Newtonian behavior even at high shear rate values. To verify if the solvent has an effect on the viscosity variation of the PLA/ZnO suspensions, another series of solutions were prepared, but the solvent used was chloroform. As shown in Figure 5.4a, the chloroform solutions containing ZnO-NPs exhibited a Newtonian behavior, followed by a slight shear thinning one at a high shear rate. In the case of this solvent, the viscosity increased with the increase of ZnO content. The increase in viscosity can be due to the existence of hydrogen bonds between hydroxyl-rich ZnO surface and carbonyl groups of PLA. Whereas at 1 wt % ZnO, the viscosity decrease compared with the viscosity at 0.8 wt %, then start again to increase for 3 and 5 wt %.

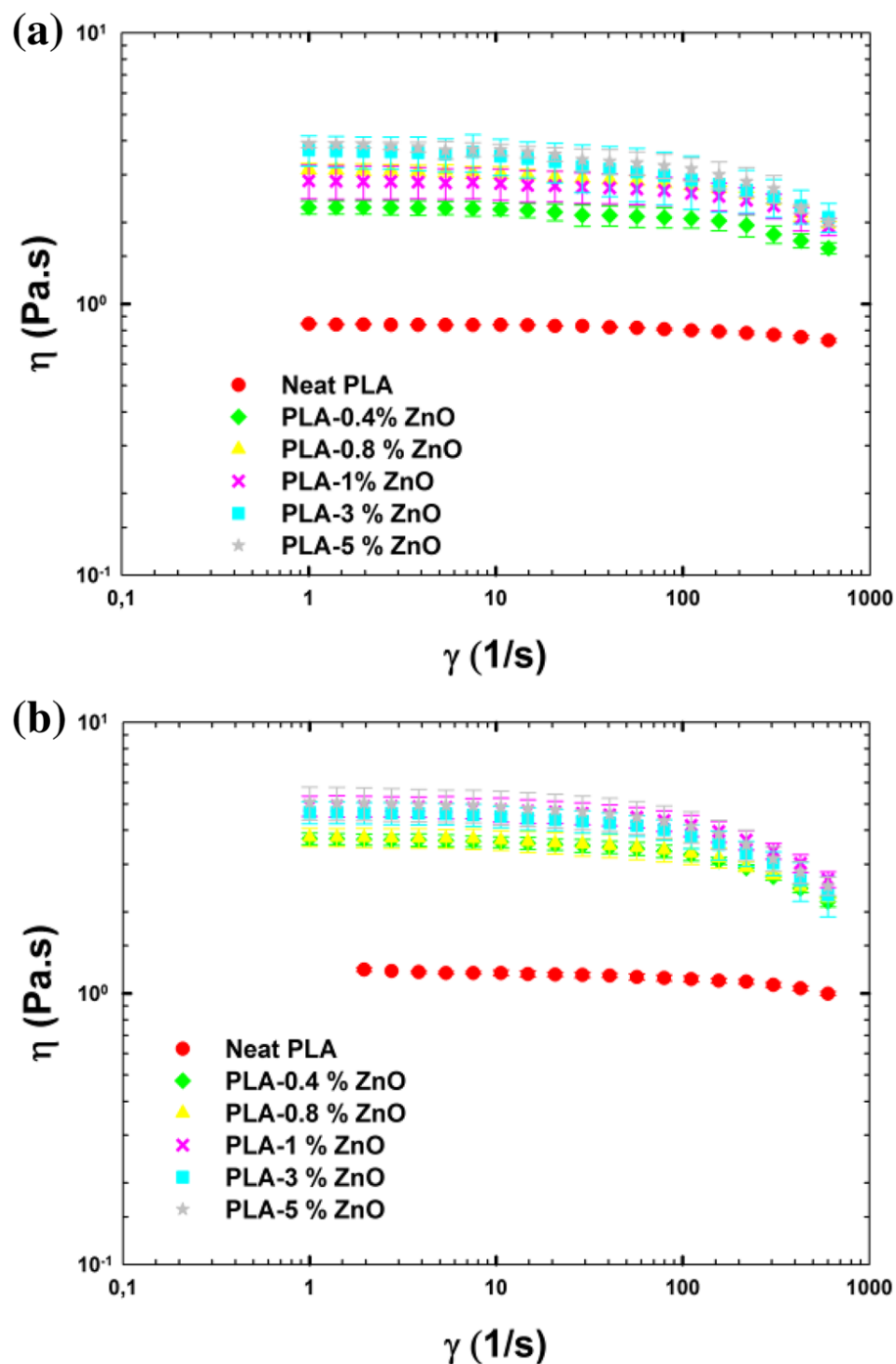


Figure 5.4: Viscosity of PLA solutions with different contents of ZnO as a function of shear rate in chloroform at 25 °C: **a** 5 days; and **b** 25 days after the preparation of the solutions.

The loss of viscosity at 1 wt %, could be explained in terms of agglomeration of the ZnO-NPs. The viscosity fluctuation can be easily observed in Figure 5.5, which represents the viscosity of PLA/CF solutions as a function of ZnO content at a constant shear rate of 1 s^{-1} . After 25 days

(Figure 5.4b), the chloroform solutions showed the same Newtonian behavior as at 5 days. The viscosity increased with ZnO content. All the viscosity values had shifted upwards from their values at 5 days.

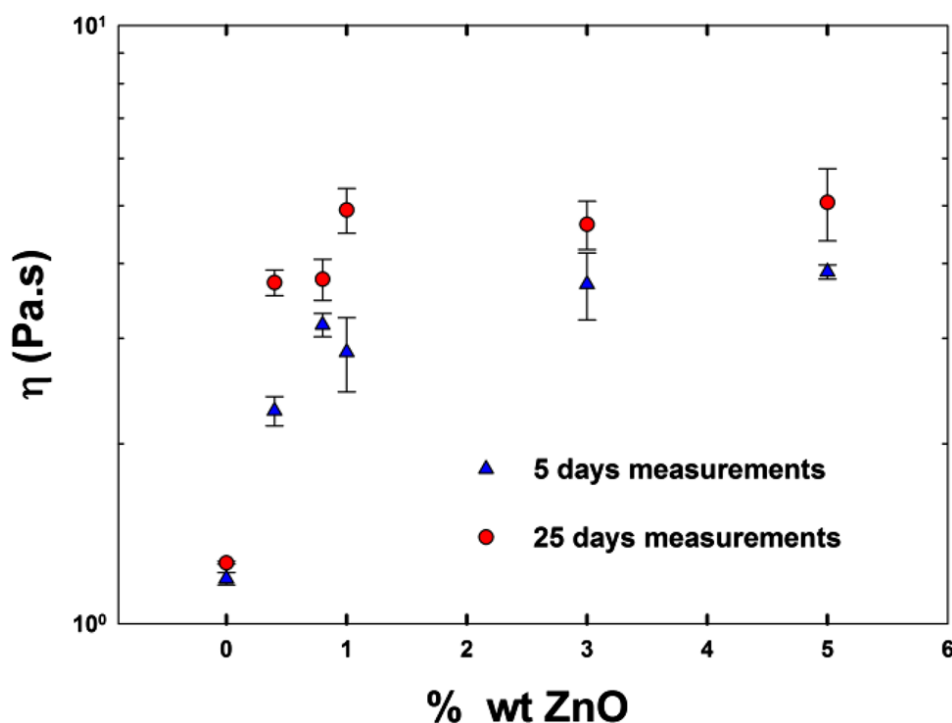


Figure 5.5: Viscosity of PLA solutions as a function of ZnO contents, at a shear rate of 1 s^{-1} , in chloroform for 5 and 25 days, respectively after the preparation of solutions.

The viscosity trend for the chloroform follows the classical model of Einstein for infinitely diluted solutions assuming that single particles increase the viscosity of the dispersion medium as a linear function of the volume fraction ϕ . At this stage of characterization, PLA and TFE suspensions were prepared with different NPs (ZnO-UVM-7, SiO_2 , and TiO_2), to compare with ZnO-NPs used to develop the first series of solutions and evaluate if these could contribute to any variation in the viscosity of the PLA solutions. For the TFE solutions filled with ZnO nanodomains embedded in bimodal mesoporous silica and represented in Figure 5.6a, at 0.4 and 0.8 wt % of ZnO-UVM-7, the viscosity decreased below the neat PLA viscosity for all NPs contents. At 1 and 3 wt %, it increased again to reach the neat PLA viscosity, and at 5 wt % was a

little bit higher. After 25 days (Figure 5.6b), the viscosity of all the solutions filled with ZnOUVM-7 NPs was below the neat PLA viscosity and were slightly different from the ones at the 5 days measurements.

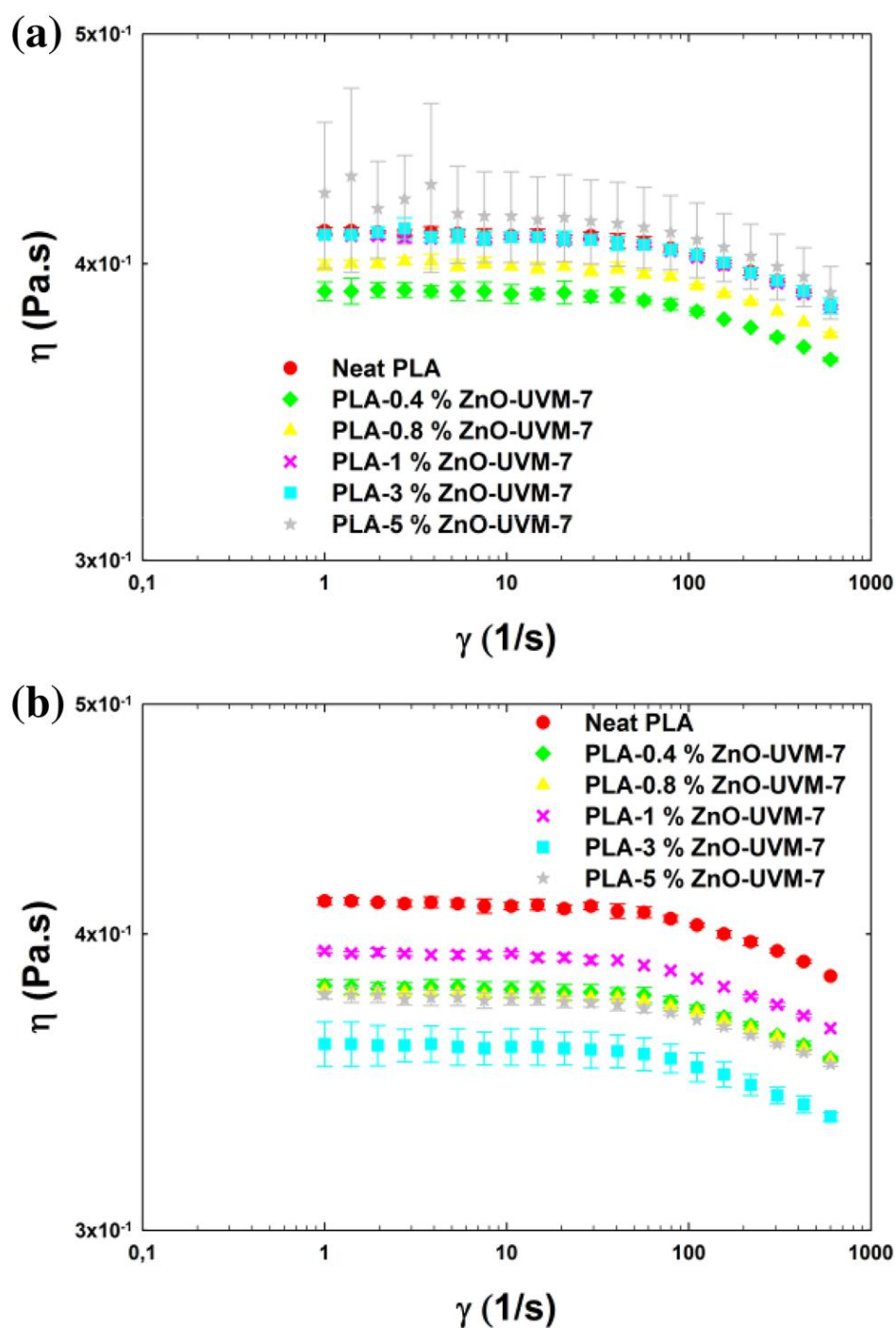


Figure 5.6: Viscosity of the PLA solutions with different contents of ZnO-UVM-7 as a function of shear rate in TFE at 25 °C: **a** 5 days; and **b** 25 days after the preparation of solutions.

Figure 5.7a, b present the effect of SiO₂ NPs on the viscosity of PLA solutions in TFE at 25 °C at 5 days and 25 days, respectively. The incorporation of 0.4 wt % SiO₂ increased the solution viscosity slightly above the neat PLA viscosity. At 0.8 wt % the viscosity decreased, then starting from 1 wt %, the viscosity rose again as a function of the SiO₂ content in solutions. The 25 days measurements, illustrated in Figure 5.7b, revealed that the viscosity didn't show a significant decrease and was fluctuating in the range between 0.39 and 0.42 Pa s.

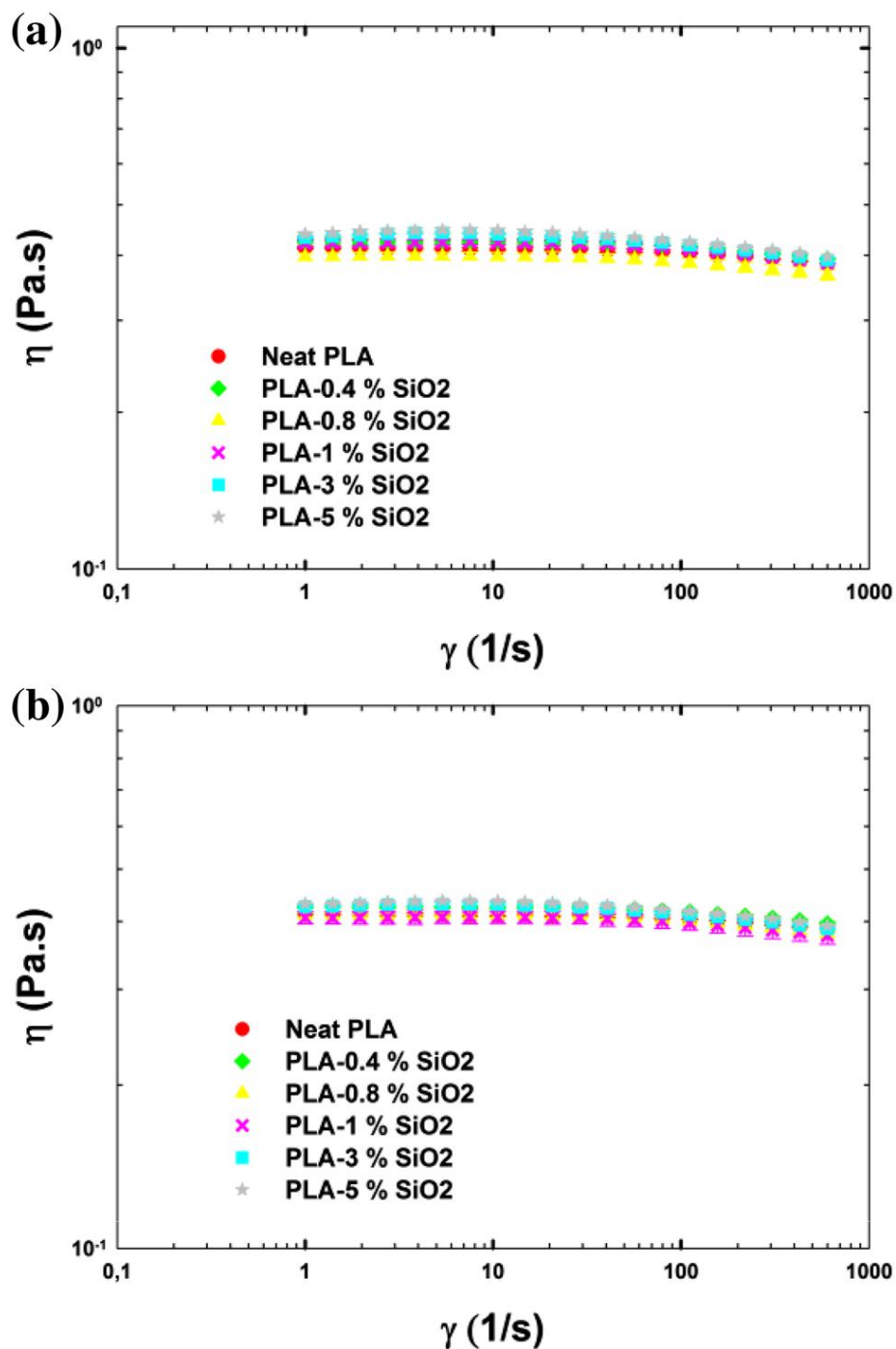


Figure 5.7: Viscosity of PLA solutions with different contents of SiO₂ as a function of shear rate in TFE at 25 °C **a** 5 days; and **b** 25 days after the preparation of solutions.

For the TiO₂ NPs, from 0.4 to 3 wt %, the viscosity decreased slightly below the neat PLA viscosity and rose again at 5 wt %. After 25 days (Figure 5.8b), there was no significant change in viscosity for each solution.

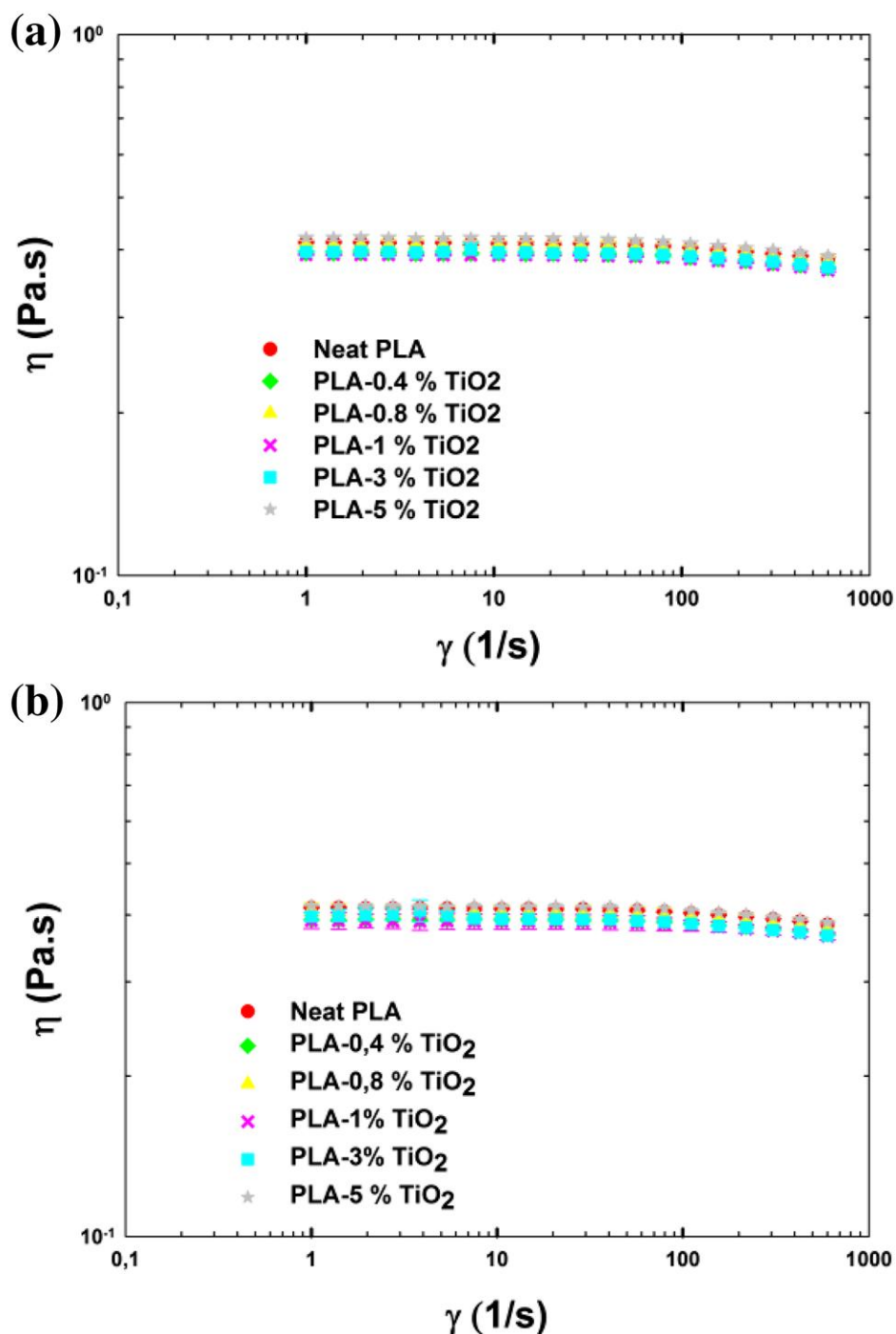


Figure 5.8: Viscosity of the PLA solutions with different contents of TiO₂ as a function of shear rate in TFE at 25 °C: **a** 5 days; and **b** 25 days after the preparation of the solutions.

5.4.2 Acid Value Analysis

The Av corresponds to the amount of carboxylic acid groups in polyester resins and is given in mg KOH per g of sample. In this study, by following the Av of the PLA dissolved in different solvents, with and without the presence of four different NPs, it is possible to estimate the amount of carboxylic acid groups in each environment. Figure 5.9a, b show the numbers of Av for the same solutions in chloroform and TFE, respectively. The Av increased from 3.15 mg KOH/g PLA for the neat PLA firstly dissolved in TFE, to 7.51 mg KOH/g PLA for the PLA dissolved with ZnO-NPs (Figure 5.9b). This indicates that in the presence of both ZnO-NPs and TFE, the formation of carboxylic acid groups is accelerated. This can be explained by the hydrolytic degradation of PLA in these suspensions. The solutions containing either 3 wt % ZnO-UVM-7 or SiO₂ NPs also exhibited Av higher than for neat PLA. This increase can be due to some interactions between the NPs and KOH molecules, which could increase the consumption of KOH. As opposed to what happens in TFE solutions, the PLA/CF/ZnO solutions, illustrated in Figure 5.9a, didn't show any increase in Av compared to neat PLA Av. This proves that ZnO-NPs are stable in the presence of both PLA and chloroform.

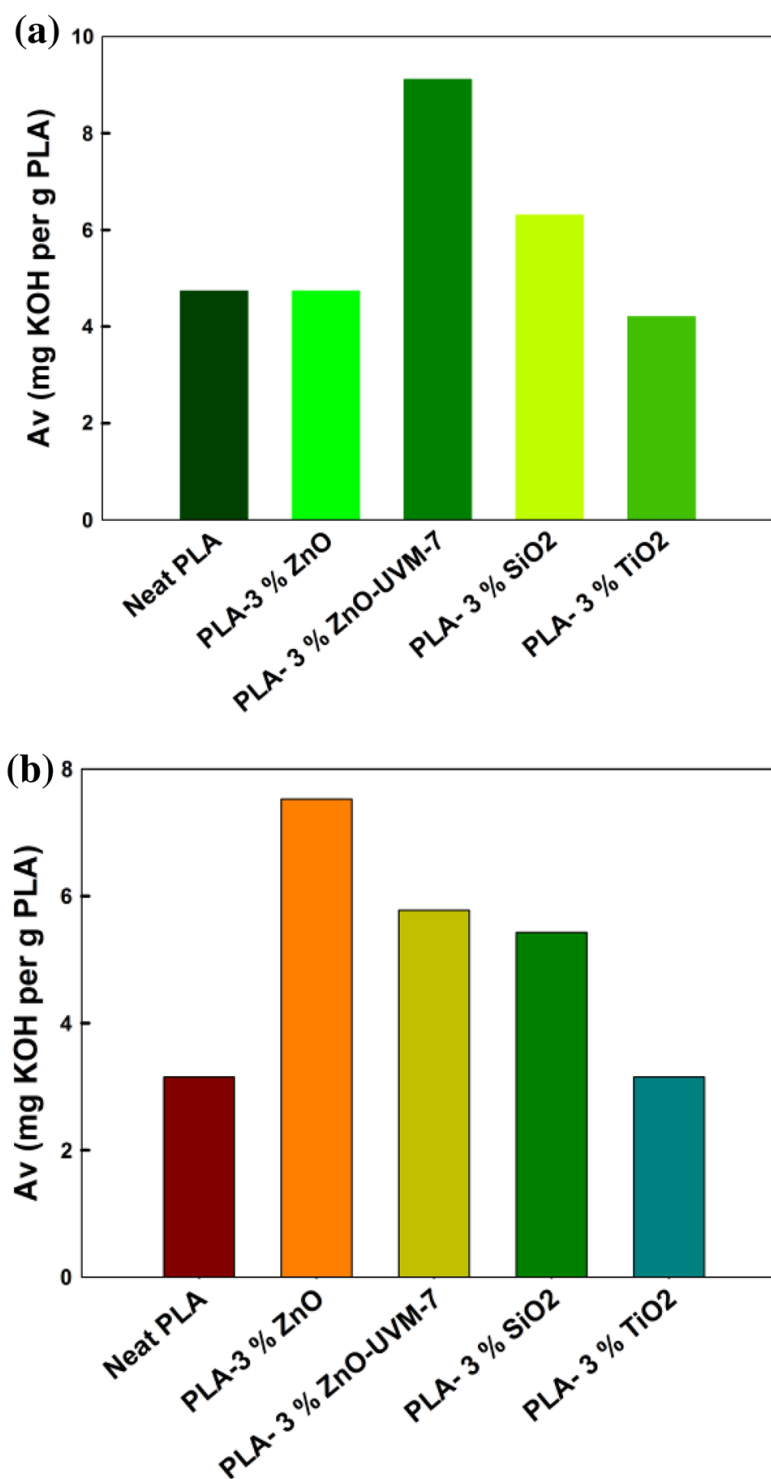


Figure 5.9: Av of neat PLA and PLA/NPs solutions in: **a** chloroform; and **b** TFE at 25 °C.

5.4.3 Infrared Spectroscopy

Infra-red (IR) spectroscopy was used to probe the chemical structure of the suspensions to detect whether ZnO-NPs and PLA undergo chemical reactions in TFE suspensions. The FT-IR spectra of PLA, TFE, and PLA/TFE solutions are shown in Figure 5.10. Figure 5.10a, b show the FT-IR spectra of PLA pellets, TFE solvent, PLA/TFE suspensions and PLA/ZnO/TFE suspensions. The FT-IR spectrum of PLA pellets (Figure 5.10a) depicts characteristic absorption bands which represent the backbone of the ester group of PLA. The absorption band related to C=O stretching vibration is observed at 1744 cm^{-1} , while a C-H deformation vibration is detected at 1440 and 1373 cm^{-1} and C-O-C stretching vibration is noted at 1188 and 1084 cm^{-1} [41]. The C=O stretching vibration peak of the PLA-TFE solutions decreased in intensity relative to the PLA pellet one but kept the same position at 1744 cm^{-1} . Whereas the C-O-C peaks increased in intensity and shifted from 1088 to 1184 for the PLA pellet to 1077 and 1144 cm^{-1} , respectively for the PLA/TFE solution (Figure 5.10a). The sharp peak at 1736 cm^{-1} indicates the presence of the acetate group of PLA, which is the result of the partial hydrolysis of the PLA ester bond in TFE suspensions mentioned earlier. This peak had maximum intensity for TFE solutions containing 2 % of ZnO-NPs (Figure 5.10a). Theoretically, the stretching vibration of Zn-O band related to the ZnO-NPs should be observed around 430 cm^{-1} [41], but this was not possible during this characterization since the lower limit of the FT-IR equipment used was 600 cm^{-1} . For the PLA/ZnO/TFE, the appearance of a small peak around 3670 cm^{-1} (Figure 5.10b) was recorded which, could be assigned to the -OH groups on the surface of ZnO-NPs. It is believed that the presence of OH groups is due to the adsorption of the water vapor on the surface of the dry ZnO-NPs.

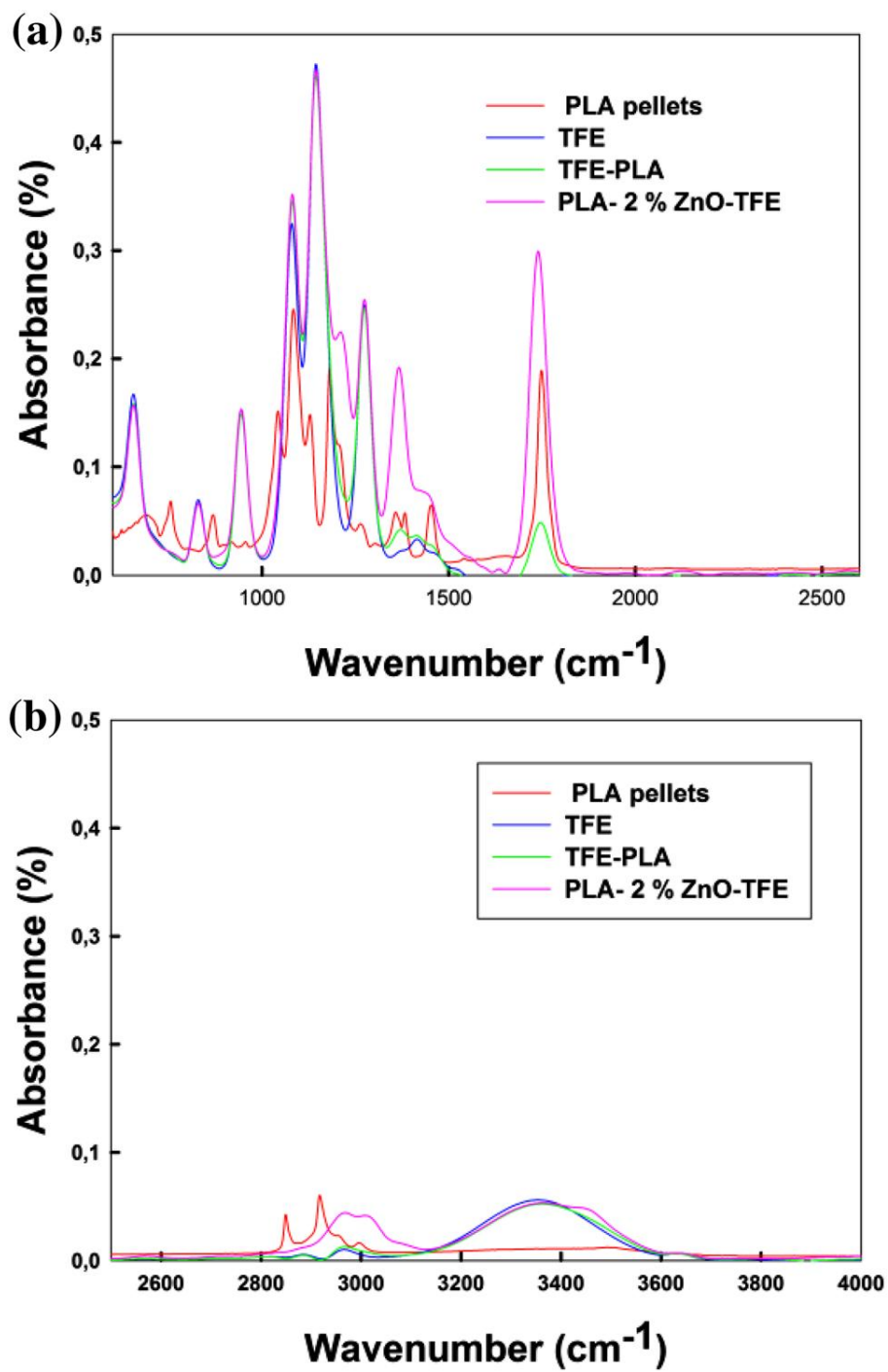


Figure 5.10: FT-IR spectra of PLA pellets, PLA-TFE and PLA-2 % ZnO TFE suspensions.

5.4.4 Scanning Electron Microscopy (SEM)

In this study, SEM was used for observation of the effect of the solutions viscosity's decrease used to elaborate PLA/ZnO nanocomposite mats by the electrospinning process. The SEM images of the neat PLA-TFE and PLA-ZnO NFs mats are illustrated in Figure 5.11a, b, respectively. They both show a network of randomly oriented fibers, and for Figure 5.11b beaded-fibers were formed. The generation of beaded fibers could be attributed to the decrease in viscosity in PLA-ZnO suspensions generated by the degradation of PLA in TFE suspensions.

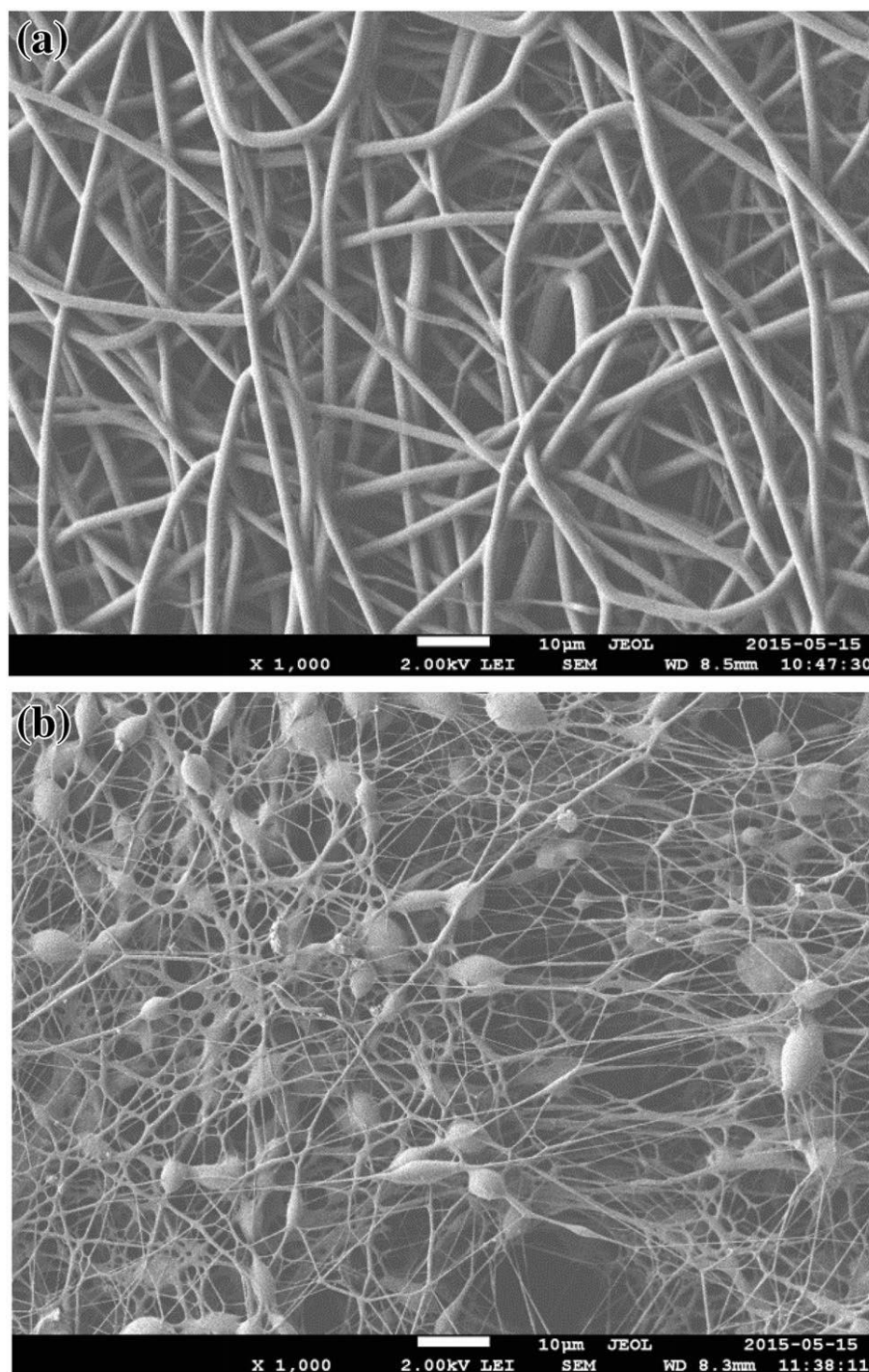


Figure 5.11: SEM images of: **a** Neat PLA-TFE; and **b** PLA-TFE-5 % ZnO mats produced by the electrospinning process (1 mL/h, 15 cm, 20 KV) from suspension kept 60 days after preparation.

Noei et al. [42] have studied the interaction of water with ZnO-NPs using diffuse reflectance infrared spectroscopy (DRIFTS) and ultra-high vacuum FT-IR spectroscopy (UHV-FTIRS), and

found that exposing ZnO powder to water at 323 K leads to both molecular and dissociative adsorption of H₂O forming a large number of hydroxyl species. Based on the vibration and thermal stability data for the ZnO single crystal surfaces, have proved that almost all the OH bands can be assigned to hydroxyl groups bound to the different sites of the various exposed facets. It was also noted that that two different types of –OH groups could result from the interaction of ZnO powders with hydrogen at room temperature. Type I corresponds to a reversible dissociative adsorption of hydrogen on both O and Zn sites yielding strong IR bands which were assigned to the stretching vibrations of -OH and ZnH species, respectively. Whereas type II is an irreversible chemisorption of H₂ leading to the formation of O–H···O and Zn–H···Zn species characterized by weak IR bands [42]. Tang et al. [43] also proved that conventional inorganic NPs such as ZnO possess some –OH groups on the surface

because of the impact of moisture. These groups were identified by the FT-IR analysis of the ZnO powder since they noticed the appearance of a peak at 3410 cm^{-1} that indicates the presence of –OH on the surface of ZnO-NPs. The same group mentioned that these hydroxyl groups of nano-ZnO particle surface could interact with the carboxyl group (COO[–]) of polymethacrylic acid (PMMA) in aqueous solutions and form a poly(zinc methacrylate) complex on the surface of ZnO. The TGA confirmed that the PMMA molecules chains were anchored or grafted on the surface of nano-ZnO, and estimated the PMMA grafted content to 5.25 % [43]. Qu et al. [44] studied the catalytic effect of ZnO-NPs on the hydrolytic degradation of PLA at temperatures below its glass transition temperature (T_g) and they considered two different ZnO-NPs which are ZnO₄₀ and ZnO₂₅₀, with an average particle diameter of 40 and 250 nm, respectively. For this study, it was assumed that the hydroxylation on ZnO surfaces affords ZnO-NPs to anchor polymer chains on their surfaces. Also, the acid end group of PLA could help anchoring the polymer chain on the surface of ZnO, and the hydroxylation could assist the hydrolysis of PLA adsorbed on ZnO-NPs. They confirmed the adsorption of PLA on the surface of ZnO-NPs by TGA analysis of the PLA/ZnO composite and FTIR-ATR of the recovered ZnO particles from the same composite. FTIR-ATR spectrum showed the absorption of carbonyl stretching at 1761 cm^{-1} confirming the adsorption of PLA on the surface of ZnO-NPs. The kinetics of the hydrolytic degradation was followed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) measurements and the results indicated that faster kinetics of water adsorption happened in the case of PLA/ZnO. They also found that the activation energy of ZnO which catalyzed PLA hydrolysis was about 38

% lower than that for pure PLA [44]. By analogy, we can speculate that ZnO-NPs might be hydroxylated in an organic solvent. The adsorption of the –OH on the surface of ZnO-NPs could be possible because of the adsorption of the ambient moisture. The adsorption of such groups on the surface of the NPs was confirmed by the appearance of the peak around 3670 cm^{-1} (Figure 5.7b) which could be assigned to the –OH groups on the surface of ZnO-NPs. The hydroxylation on ZnO surfaces affords ZnO particles some crucial functionalities which include anchoring polymer chains onto their surfaces. Thereby, acid end groups of PLA chains could help to anchor the PLA chains on the surface of the ZnO-NPs that have been already hydroxylated in solution. This hydroxylation could initiate and assist the hydrolysis of the PLA ester bond. ZnO-NPs could be considered as a catalyst for PLA hydrolysis in solution. In this study, the decrease of the solution viscosity was the confirmation of the PLA hydrolysis in solutions, which resulted automatically in a substantial reduction of the PLA molecular weight. In the case where the PLA was dissolved in TFE with commercial ZnO-NPs, the viscosity decrease was especially pronounced when the solutions were kept 25 days before their characterization. In the case where PLA was dissolved in the presence of chloroform and ZnO-NPs, there was no decrease in the viscosity of the solutions during the rheological measurement of the 25-days juncture. The same was observed for solutions prepared by dissolving PLA in TFE in the presence of TiO_2 , SiO_2 or ZnO-UVM-7 NPs. These results suggest that the PLA/TFE/ZnO can be an enabling environment for PLA hydrolysis at room temperature. The hypothesis that PLA was hydrolyzed in the presence of TFE and ZnO-NPs was then confirmed by the results of the Av analysis that demonstrated that the PLA/TFE suspensions with 3 wt % of ZnO-NPs were characterized by an Av number three times larger than the neat PLA. Thus, PLA was degrading by hydrolyzing its ester bonds, thus forming polymeric chains of low molecular weight with acid end groups. So during the Av measurement, it took more KOH molecules to neutralize the acid groups.

5.5 Conclusions

The present work has exposed for the first time the influence of ZnO-NPs on the rheological properties of PLA solutions in TFE, and in turn, their effect on the final morphology of the PLA nanocomposites fibers obtained from the electrospinning process. In fact, PLA does not form stable suspensions in the presence of TFE and bare ZnO-NPs. Whereas, chloroform/PLA/ZnO present stable ones that can be used during the electrospinning process to produce PLA

nanocomposite mats. This combination can avoid PLA hydrolysis in solution that is manifested by an important decrease in PLA/TFE solution viscosity. As a degradation mechanism, we have proposed that ZnO-NPs, which have been already hydroxylated because of moisture, were able to adsorb PLA chains on their surfaces and next, assist in PLA degradation by the hydrolysis of the ester bond.

Acknowledgements Financial support from 3S Pack NSERC/Saputo/Prolamina Industrial Research Chair is gratefully acknowledged.

5.6 References

1. Therias S et al (2012) Photochemical behavior of polylactide/ZnO nanocomposite films. *Biomacromolecules* 13(10):3283–3291
2. Garlotta D (2001) A literature review of poly(lactic acid). *J Polym Environ* 9(2):63–84
3. Marsh K, Bugusu B (2007) Food packaging—roles, materials, and environmental issues. *J Food Sci* 72(3):R39–R55
4. Espitia PJP et al (2012) Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food Bioprocess Technol* 5(5):1447–1464
5. Rajendra R et al (2010) Use of zinc oxide nano particles for production of antimicrobial textiles. *Int J Eng Sci Technol* 2(1):202–208
6. Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC (2011) Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir* 27(7):4020–4028
7. Sawai J (2003) Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *J Microbiol Methods* 54(2):177–182
8. Sawai J, Yoshikawa T (2004) Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. *J Appl Microbiol* 96(4):803–809
9. Ng AMC et al (2013) Antibacterial and photocatalytic activity of TiO₂ and ZnO nanomaterials in phosphate buffer and saline solution. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(12):5565–5573

10. Jin T et al (2009) Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, and *Escherichia coli* O157: H7. J Food Sci 74(1):M46-M52
11. Nair MG et al (2011) Structural, optical, photo catalytic and antibacterial activity of ZnO and Co doped ZnO nanoparticles. Mater Lett 65(12):1797–1800
12. Dutta RK et al (2010) Differential susceptibility of *Escherichia coli* cells toward transition metal-doped and matrix-embedded ZnO nanoparticles. J Phys Chem B 114(16):5594–5599
13. Zhang L et al (2007) Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). J Nanopart Res 9(3):479–489
14. Jones N et al (2008) Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. FEMS Microbiol Lett 279(1):71–76
15. Yamamoto O (2001) Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. Int J Inorg Mater 3(7):643–646
16. Shi L-E et al (2014) Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: a review. Food Addit Contam A 31(2):173–186
17. Pantani R et al (2013) PLA-ZnO nanocomposite films: Water vapor barrier properties and specific end-use characteristics. Eur Polymer J 49(11):3471–3482
18. Applerot G et al (2009) Coating of glass with ZnO via ultrasonic irradiation and a study of its antibacterial properties. Appl Surf Sci 256(3):S3-S8
19. Emamifar A et al (2010) Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice. Innov Food Sci Emerg Technol 11(4):742–748
20. Emamifar A et al (2011) Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice. Food Control 22(3):408–413
21. Emamifar A, Mohammadizadeh M (2015) Preparation and application of LDPE/ZnO nanocomposites for extending shelf life of fresh strawberries. Food Technol Biotechnol 53(4):488–495
22. Lepot N et al (2011) Influence of incorporation of ZnO nanoparticles and biaxial orientation on mechanical and oxygen barrier properties of polypropylene films for food packaging applications. J Appl Polym Sci 120(3):1616–1623
23. Li J et al (2009) Effects of ZnO nanoparticles on the mechanical and antibacterial properties of polyurethane coatings. Prog Org Coat 64(4):504–509

24. Ghule K et al (2006) Preparation and characterization of ZnO nanoparticles coated paper and its antibacterial activity study. *Green Chem* 8(12):1034–1041
25. Wang Y et al (2012) Characterisation and cooperative antimicrobial properties of chitosan/nano-ZnO composite nanofibrous membranes. *Food Chem* 132(1):419–427
26. Vicentini DS, Smania A, Laranjeira MC (2010) Chitosan/poly(vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers. *Mater Sci Eng C* 30(4):503–508
27. Gao Y et al (2014) Electrospun antibacterial nanofibers: production, activity, and in vivo applications. *J Appl Polym Sci* 131(18)
28. Bhardwaj N, Kundu SC (2010) Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv* 28(3):325–347
29. Huang Z-M et al (2003) A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol* 63(15):2223–2253
30. Zeng J et al (2003) Poly-l-lactide nanofibers by electrospinning—influence of solution viscosity and electrical conductivity on fiber diameter and fiber morphology. *e-Polymers* 3(1):102–110
31. Kim ES, Kim SH, Lee CH (2010) Electrospinning of polylactide fibers containing silver nanoparticles. *Macromol Res* 18(3):215–221
32. Virovska D et al (2014) Electrospinning/electrospraying vs. electrospinning: a comparative study on the design of poly (l-lactide)/zinc oxide non-woven textile. *Appl Surf Sci* 311:842–850
33. Rodríguez-Tobías H, Morales G, Grande D (2016) Improvement of mechanical properties and antibacterial activity of electrospun poly (d, l-lactide)-based mats by incorporation of ZnO-graft-poly(d, l-lactide) nanoparticles. *Mater Chem Phys* 182:324–331
34. Rodríguez-Tobías H et al (2014) Novel antibacterial electrospun mats based on poly (d, l-lactide) nanofibers and zinc oxide nanoparticles. *J Mater Sci* 49(24):8373–8385
35. Nataraj S et al (2008) Electrospun nanocomposite fiber mats of zinc-oxide loaded polyacrylonitrile. *Carbon Lett* 9(2):108–114
36. Chae DW, Kim BC (2010) Effects of interface affinity on the rheological properties of zinc oxide nanoparticle-suspended polymer solutions. *Macromol Res* 18(8):772–776
37. El Haskouri J et al (2009) ZnO nanoparticles embedded in UVM-7-like mesoporous silica materials: synthesis and characterization. *Physica E* 42(1):25–31

38. El Haskouri J et al (2002) Silica-based powders and monoliths with bimodal pore systems. *Chem Commun* 2002(4):330–331
39. Cabrera S et al (2000) Generalised syntheses of ordered mesoporous oxides: the atrane route. *Solid State Sci* 2(4):405–420
40. Corre Y-M et al (2011) Melt strengthening of poly (lactic acid) through reactive extrusion with epoxy-functionalized chains. *Rheol Acta* 50(7–8):613–629
41. Jamnongkan T et al (2014) Effect of ZnO nanoparticles on the electrospinning of poly (vinyl alcohol) from aqueous solution: influence of particle size. *Polym Eng Sci* 54(9):1969–1975
42. Noei H et al (2008) The identification of hydroxyl groups on ZnO nanoparticles by infrared spectroscopy. *Phys Chem Chem Phys* 10(47):7092–7097
43. Tang E et al (2006) Surface modification of zinc oxide nanoparticle by PMAA and its dispersion in aqueous system. *Appl Surf Sci* 252(14):5227–5232
44. Qu M et al (2014) Zinc oxide nanoparticles catalyze rapid hydrolysis of poly (lactic acid) at low temperatures. *J Appl Polym Sci* 131(11)

CHAPITRE 6 ARTICLE 3: ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF LOW-DENSITY POLYETHYLENE-BASED FILMS COATED WITH ZNO NANOPARTICLES FOR POTENTIAL USE IN FOOD PACKAGING.

Hajer Rokbani^a, France Daigle^b and Abdellah Ajji^{a,}*

a 3SPack, CREPEC, Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal, P.O. Box 6079, Station Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3A7

*b Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Pavillon Roger-Gaudry, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7 ;
france.daigle@umontreal.ca*

(Cet article a été accepté pour publication après révision le 5 Février 2018 au journal *Food Packaging And Shelf Life*)

6.1 Abstract

Concerns in food safety and the need for high quality foods have increased the demand for extending the shelf-life of packaged foods. Subsequently, promoting and investigating the development of antibacterial (AB) materials for food packaging has become inevitable. ZnO nanoparticles (ZnO-NPs) have attracted a great deal of attention lately owing to their multifunctional properties, especially antibacterial activity (ABA). For this study, AB low-density polyethylene (LDPE) films were prepared by coating ZnO-NPs onto their surface. The ABA of the LDPE films were evaluated toward Gram-positive and Gram-negative bacteria. The Scanning Electron Microscopy (SEM) images showed that the use of anhydride-modified low-density polyethylene (LDPE-g-AM) resin has permitted improvements in the distribution of ZnO-NPs on the surface of LDPE films, reduced the sizes of the agglomerates and reinforced the bonding of ZnO-NPs to the surface of the LDPE film. It was found that the coated LDPE films exhibited high ABA against both strains. The AB tests also proved that the coated films retained their AB efficiency toward *Escherichia coli* (*E. coli*), even after 8 months, with a reduction rate higher than 99.9 %. Whereas for *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) the AB properties for the FPS films (processed from FPSs 317A resin) decreased at 8 months but were improved for the

LDPE-g-AM films. When the coated films were laminated, only the LDPE-g-AM was still active against *E.coli* provided that the lamination thickness does not go beyond 8 μm . This research demonstrated that the coated LDPE films have excellent attributes when being used as an active coating in the food packaging industry.

Keywords: Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs), Low-density polyethylene (LDPE), Food packaging, Antimicrobial activity (AB), Coating.

6.2 Introduction

Recent innovations in the food packaging industry have transformed passive packaging which, was simply a container or insulating barrier for food and beverage from the outer environment into a more active role in the packaging industry [1]. As such, the role of active packaging can be used to prevent; gains or losses in moisture, microbial contamination and acts as a barrier against gases such as oxygen, carbon dioxide, water vapor and other compounds such as flavor [2]. Correspondingly, in recent years, incidences of food-borne diseases have been a cause for concern in the packaging, distribution, and storage of food. Even though techniques in sanitation and the inspection of food production have evolved, microorganisms that cause food spoilage and carry diseases have presented risks during food processing, packaging, shipping, storage and distribution [3]. AB-active films have been introduced as an innovative concept in food packaging developed in response to satisfy consumer expectations for safe food free from contamination [4]. In fact, AB food packaging systems are polymeric materials in which a certain amount of additives with pronounced AB properties are embedded into the plastic packaging material (for rigid or flexible packaging) and to extend the shelf life of food [5], by controlling the growth of pathogenic and spoilage microorganisms.

Advances in nanotechnology in the food packaging industry is aimed to provide solutions to the challenges in the food packaging industry addressing problems such as a short shelf life and better performances in AB packaging [6]. Metal oxides like TiO_2 , ZnO, CaO and MgO including metals such as silver and gold, have been developed for the preparation of AB packaging films due to their strong AB characteristics, high stability, robustness and long shelf life compared with organic AB agents [2]. The AB efficiency of these agents has been widely investigated by many

researchers [7-9]. Silver is commonly used in AB nanocomposites for food packaging, and is well known for its strong toxicity against a wide range of microorganisms [10]. However, ZnO-NPs can compete favorably with silver NPs, especially because of their simple and inexpensive synthesis, greater efficiency, cost-effectiveness, lower levels of toxicity [2, 11] and their toxicity which is selective toward a broad range of both Gram-positive and Gram-negative bacteria, including harmful food-borne organisms such as *E. coli*, *Listeria* and *S. aureus* [12-15]. Moreover, ZnO-NPs show an ABA without photo-activation compared to TiO₂ [12, 15, 16].

ZnO is used in daily applications, for example, in drug delivery, cosmetics and medical industries due to its potent AB effect against a wide spectrum of microorganisms [17]. Moreover, the Food and Drug Administration (FDA) currently lists ZnO as generally recognized as safe (GRAS) material. The ABA of ZnO-NPs depends on concentration and particle size [15], with shape and structure being inconsequential [18]. Higher concentrations and larger surface areas have displayed better activity [14]. When incorporated into an AB packaging, features such as mechanical strength, barrier properties, and stability are improved by ZnO-NPs [13, 19]. As the most commonly used food packaging materials are natural and synthetic polymers [20], and because of their better physical and barrier properties, higher strength and elongation, lower cost and lightness, plastic films are expected to play an important role in food distribution [21]. ZnO-NPs have been integrated into various material using different methods; including polylactide (PLA) [22, 23], glass [24], LDPE [6, 25, 26], polypropylene (PP) [23, 27], polyurethane (PU) [28], poly(vinyl chloride) (PVC) [18], poly(butylene succinate) (PBS) [29], polyethylene terephthalate (PET) [30], paper [31] and chitosan [32, 33]. LDPE is primarily used as it possesses desirable properties such as good flexibility, transparency, economical cost efficiency, ability to be processed easily and thermal stability [6]. The processing method for the preparation of ZnO-coated films is greatly dependent on the type of the system being developed. Basically, the AB system can be either in direct or indirect contact. If a direct contact is needed, the AB system should be a non-migratory system. Thus dry or thermo-mechanical techniques including standard conventional techniques used in the plastics industry such as extrusion, compression molding, blow molding and injection molding should be used. Whereas with a volatile releasing system, the coating method can be used where an AB agent with a high concentration is applied to the surface of the polymeric films [34]. Some of the most commonly accepted mechanisms of AB action of ZnO-NPs is the formation of reactive oxygen species (ROS) [12, 35-37], the interaction

of NPs with bacteria [14, 38-40] and the release of Zn^{2+} ions [41, 42]. For ROS whose amount generated should increase with the concentration of ZnO-NPs [12, 42], they are expected to oxidize the lipid membrane of the cell wall of *E. coli*. The direct interaction between ZnO-NPs and the cell surface affects the permeability of the membrane [14, 40], allows the internalization of NPs [38] and induce oxidative stress in bacteria cell [43]. The solubility of Zn^{2+} ions in the micro-organisms medium could be the cause in the toxicity of ZnO-NPs [13, 19]. Research has shown that ZnO-NPs possess better activity toward *E. coli* as Gram-negative bacteria than toward *S. aureus* as Gram-positive bacteria. The high resistance of *S. aureus* to ZnO-NPs can be interpreted to the structural differences in the bacterial membranes and the intracellular antioxidant content of *S. aureus* [44].

This study is aimed at exploring the feasibility of producing AB-LDPE films by coating with ZnO-NPs in the last step of the extrusion process. The use of LDPE-g-AM to enhance the distribution of ZnO-NPs on the surface of the polymeric film and decrease in their agglomeration will be evaluated. To the best of our knowledge, this coating method has never been used to develop AB coated films with ZnO-NPs. The main objectives are to evaluate the AB efficiency of the prepared films and its ability to impede the growth of food-borne bacteria such as *E. coli* and *S. aureus* at different times after films preparation and after being treated in an ultrasonic bath. The distribution and the concentration of the ZnO-NPs on the surface of the coated-films before and after treatment were investigated by EDS-SEM (Energy-dispersive X-ray spectroscopy). Finally, the ABA of these films was compared to that of the films after thin pure LDPE layer lamination and to those of ZnO-NPs blended with LDPE via the melt compounding.

6.3 Methodology

6.3.1 Materials

In this study different polymeric matrices were used. Surpass FPs 317-A Octene sLLDPE film resin obtained from Nova chemicals (Calgary, Alberta, Canada) with a melt flow index of 4 g/10 min. Bynel 42E703 adhesive resin was purchased from DuPont (Mississauga, Ontario, Canada) which is an LDPE-g-AM resin with a melt flow index and maleic anhydride (MAH) content of 5.7g/10 min and 0.08 (wt %). Commercially produced ZnO nanofillers were purchased from SkySpring Nanomaterials Inc (Houston, TX, USA) and were used without any additional

purification where the average diameter is 20 nm, and the specific surface area is 30 to 50 m²/g. Cultures of non-pathogen *E. coli* (DH5 α) and pathogen *S. aureus* (54-73), Luria Bertani (LB) broth, which is a nutritional-rich medium, LB agar and phosphate-buffered saline (PBS) solutions, used during the AB tests were obtained from the Department of Microbiology, Infectiology, and Immunology at Université de Montréal.

6.3.2 Preparation of ZnO-coated LDPE films

LDPE films were prepared by melt blending in a tightly intermeshing co-rotating twin screw extruder (TSE) (Leistritz ZSE-18HP-40D, Germany) having a screw diameter of 18 mm and L/D = 40. All the LDPE films were produced by using constant speed screw of 100 rpm, temperature profiles as shown in Table 6.1 and a cast film die connected to the TSE. The ZnO-NPs were spread, at the exit of the die, manually with the help of a strainer. To laminate the coated-LDPE films, the dipping method was used. A xylene solution was prepared at 120 °C, with 2 % wt of FPSs 317A resin. Once the resin is completely dissolved, the solution is cooled to 70 °C, and the films were dipped for 1-2 second then dried under the hood. In fact FPS-T1, FPS-T2 and FPS-T3 films were processed from FPSs 317A resin at 190, 200 and 220 °C, respectively. Whereas, Bynel-T3 films were produced from Bynel 42E703 resin at 220 °C.

Table 6.1: Different temperature profiles used to produce the LDPE films by the TSE, where T1= 190, T2= 200 and T3= 220 °C.

Zones	1	2	3	4	5	6	7	8	9
FPS-T1	190 °C	190 °C	190 °C	190 °C	190 °C	190 °C	190 °C	190 °C	190 °C
FPS-T2	200 °C	200 °C	200 °C	200 °C	200 °C	200 °C	200 °C	200 °C	200 °C
FPS-T3	200 °C	200 °C	200 °C	200 °C	220 °C	220 °C	220 °C	220 °C	220 °C
Bynel-T3	200 °C	200 °C	200 °C	200 °C	220 °C	220 °C	220 °C	220 °C	220 °C

6.4 Characterization

6.4.1 Antibacterial tests

The AB efficiency of the nanocomposites films were quantified using the strains *E. coli* (DH5 α) and *S. aureus* (54-73). These bacteria were grown in LB broth under constant agitation for 24 h at 37 °C, to reach a density of 10⁹ Colony Forming Units (CFU)/mL. The bacteria culture was diluted in the same medium after 24 h, in order to reach a density of 10⁵ CFU/mL. AB tests were conducted on the films produced by ZnO coating and melt mixing according to the standard ISO 22196:2011 and as described in Abdali and Ajji's work [3]. Both active and blank samples were cut out into discs of 4 to 5 cm in diameter. ISO 22196:2011 standards require that the surface of contact between the two polymer layers should be between 400 and 1600 mm². Blank discs should be sterilized by washing with 70 % ethanol before the test, whereas active films were sterilized under UV light (λ = 254 nm) for 20 minutes. The two discs (one blank and the other active) are sandwiched together after 200 μ L of 10⁵ CFU/mL culture is deposited between them. Both films are rubbed against each other, so that the surface is contaminated. These are placed in a Petri dish and incubated at 37 °C for a period of 24 h. The next day, both discs are quenched in a test tube with 2 mL of PBS solution. Then, for each tube, six serial dilutions of PBS solution (10⁻¹ to 10⁻⁶) were conducted. Three samples were taken from each of the six dilutions and 10 μ L droplets were applied onto the LB agar plates which were incubated overnight at 37 °C for the counting of the surviving bacteria (CFU/mL). Each sample is made in triplicate, along with the negative control containing two blank discs. In order to study how well the ZnO-NPs adhere to the film, the ABA of the ZnO-coated LDPE films before and after shaking were investigated. The samples were immersed in a beaker with distilled water and were shaken at a constant temperature in an ultrasonic bath (Thermo Fischer, 40 KHz) for 20 minutes. All the AB tests were conducted in the Department of Microbiology, Infectology, and Immunology at Université de Montréal.

6.4.2 Morphology

The ZnO-NPs distribution on the surface of LDPE films was assessed using a Field Emission Gun-Scanning Electron Microscopy JSM-7600TFE (FEG-SEM) (Calgary, Alberta, Canada) operating at 5-10 KV. The analysis of the surface composition was performed in the same SEM equipment under energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) mode operated at 10 KV.

6.5 Results and discussion

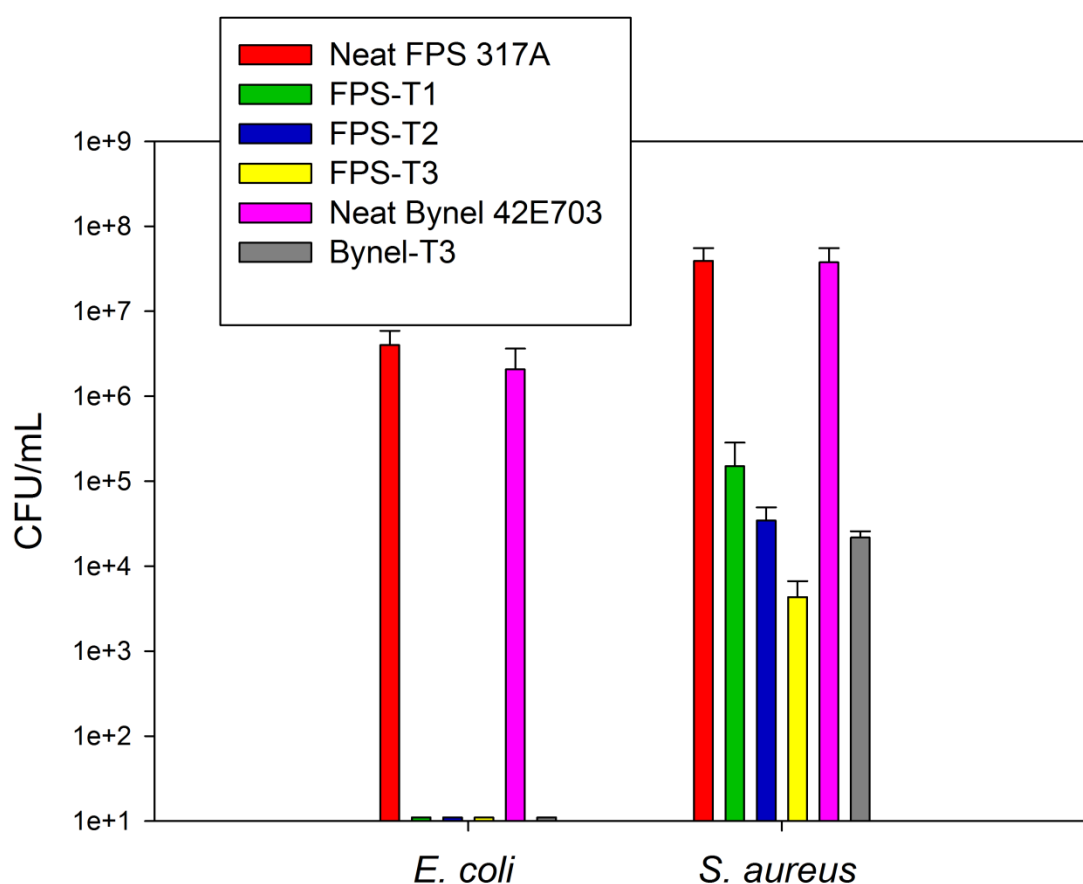
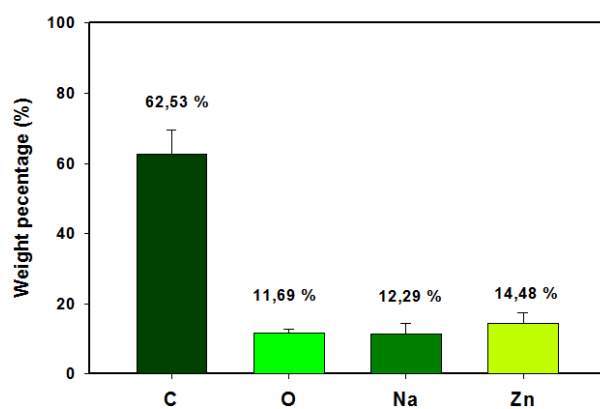
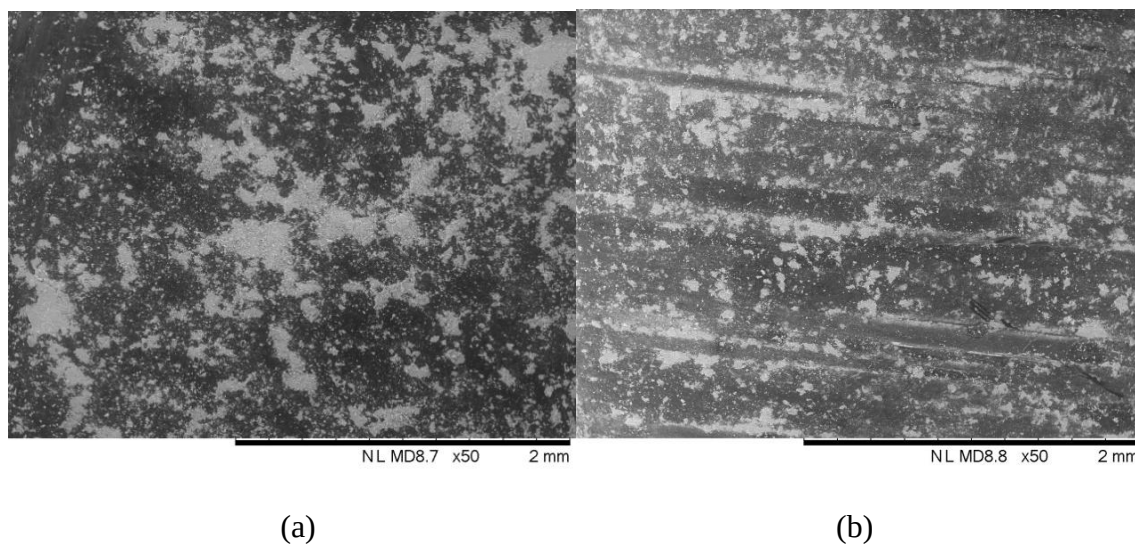


Figure 6.1: Inhibitory effects of different FPS and Bynel films toward *E. coli* and *S. aureus* at 1 month post-preparation.

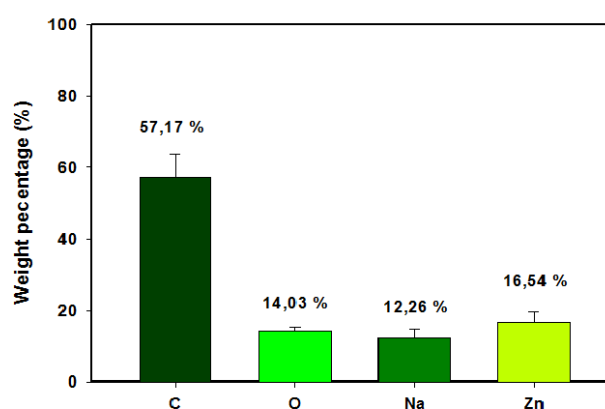
The ABA of LDPE films was tested against two bacterial strain, and was measured by viable cell counts after incubation for 24 h at 37 °C, and the results are shown in Figure 6.1. The results showed a complete eradication of the *E. coli* population when compared with the control samples and a reduction rate higher than 99.9 %. Whereas for *S. aureus*, for both FPS and Bynel films, a reduction higher than 2 logs (CFU/mL) was observed for all the samples. These results also proved that the increase in the extrusion temperature from 190 (FPS-T1) to 220 °C (FPS-T3) allowed to improve the AB activity of these films. In fact the increase in the processing temperature has probably allowed to impregnate higher concentration of ZnO-NPs on the surface of the coated LDPE films. The increase of the concentration of ZnO-NPs on the surface decreased the *S. aureus* population from $1.5 \cdot 10^5$ CFU/mL for FPS-T1 films, to $4.3 \cdot 10^3$ CFU/mL for FPS-T3 films processed at 190 and 220 °C, respectively. This study showed that the ZnO-coated LDPE films exhibited increased ABA on inhibiting the growth of Gram-negative (*E. coli*) than the Gram-positive (*S. aureus*) bacteria. Several studies indicate that Gram-positive (*S. aureus*) bacteria have better resistance to ZnO-NPs due to the intracellular content of *S. aureus* and the structural difference in the bacterial membranes compared to *E. coli* [44].

To observe and compare the ZnO-NPs distribution across the surface of the LDPE films, FPS-T3 and Bynel-T3 were analyzed by SEM, since these two samples were processed at the same conditions (200-220 °C). The SEM micrographs, presented in Figure 6.2a and b, allowed the observation of the distribution of the ZnO-NPs on the surface of the coated films. The results demonstrated obviously that the distribution of the ZnO-NPs on the surface of the Bynel-T3 film was more uniform, whereas agglomerations were observed on the surface of FPS-T3, possibly because of the strong interactions between ZnO-NPs. In fact, Bynel-T3 was processed from LDPE-g-AM. The presence of MAH acts as a disruptor of agglomerations on the surface of the Bynel-T3 samples and as a compatibilizer [45]. Thus, dispersion of ZnO-NPs was improved for Bynel-T3 samples, showing smaller aggregates. Moreover, the use of PE-g-AM has probably reinforced the bonding of ZnO-NPs to the surface of Bynel-T3 films. EDS analysis results, presented in Figure 6.2c and d allowed to estimate the concentration of ZnO-NPs on the surface of these films by using the mapping mode in the SEM-EDS equipment. The concentration of ZnO-NPs on the surface of Bynel-T3 films was around 17 wt % a little bit higher than the concentration of FPS-T3 films which was around 14 wt %. These results are congruent with the

hypothesis proposed above saying that the presence of MAH attached more ZnO-NPs to the film surface and caused a good interaction between LDPE surface and ZnO-NPs [6].



(c)



(d)

Figure 6.2: SEM and EDS analysis (by SEM) of the surface of (a), (c): FPS-T3 and (b), (d): Bynel-T3 films. For EDS samples were analyzed with a mapping mode operating at 15 KV.

To the best of our knowledge, it was the first time that this method was used to produce coated polymeric films with ZnO-NPs or with others AB metallic NPs. Otherwise, several methods have been used to produce ZnO coatings on different polymeric substrate. Thin films of ZnO and ZnO-Ag were deposited on polyethylene terephthalate (PET) and silicon (Si) substrates by reactive DC magnetron sputtering [30]. In another study, ZnO thin films were applied to biaxially oriented poly(lactic) acid (BOPLA) and polypropylene (BOPP) by atomic layer deposition at low temperatures [23]. In an earlier study, ZnO suspensions were coated on the surface of PVC film. After drying, the film was pressed at 100 °C for 10 min and then, it was peeled carefully after cooling at room temperature [18]. In the three studies listed above, the ABA of the coated polymeric films was evaluated by different methods. One of the interesting results is the one related to the PET substrate. In that study, it was found that the samples having thinner coatings (50 and 100 nm) exhibited less ABA than the thicker coatings (200-600 nm), which were not only able to decrease the growth rate but also reduce the amount of bacteria cells observed at the end of the experiments by 45 %. This result is extremely useful for food packaging applications because it may reduce bacterial presence [30].

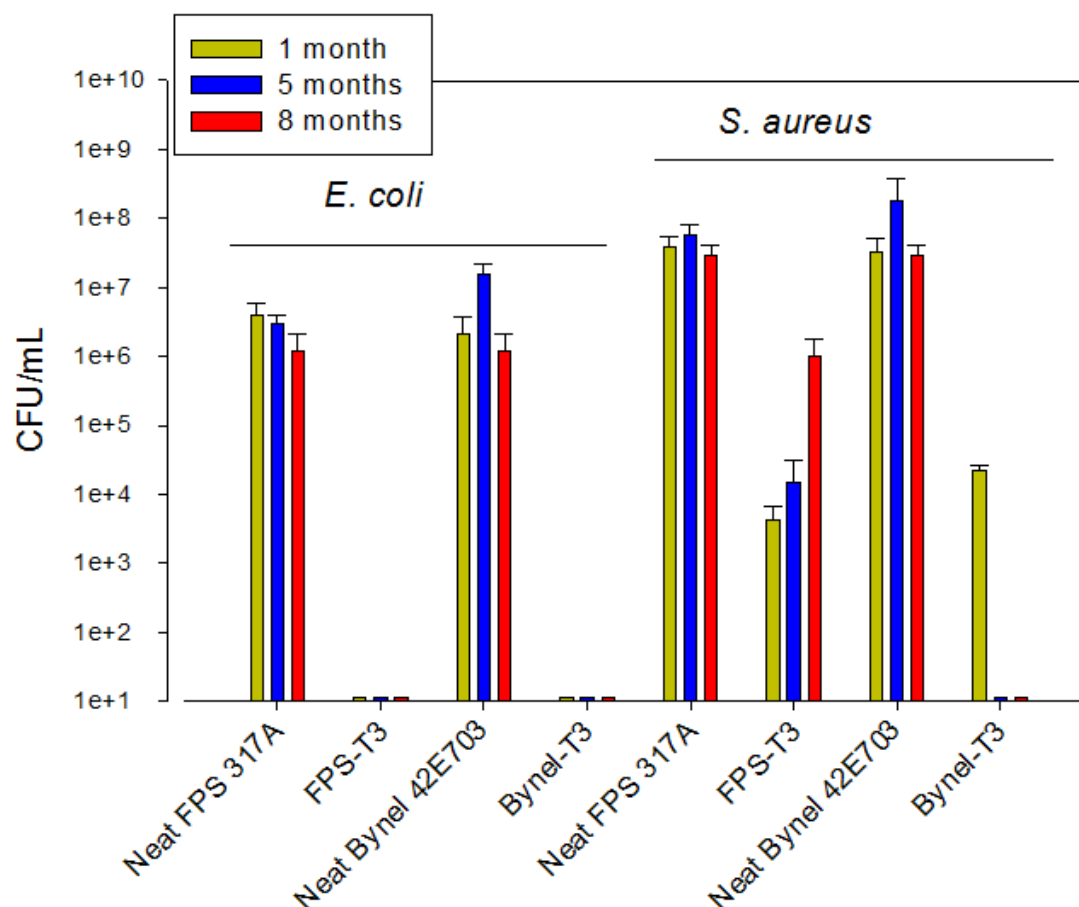


Figure 6.3: Inhibitory effects of FPS-T3 and Bynel-T3 films towards *E. coli* and *S. aureus* at 1, 5 and 8 months after their preparation.

After their preparation, the FPS and Bynel films were stored, and their ABA was tested at 5 and 8 months following the same steps to verify if their ABA will change with time.

The results presented in Figure 6.3 proved that after 5 and 8 months, FPS-T3 and Bynel-T3 samples retained their AB properties, and the ZnO-NPS were able to decrease the *E. coli* population by more than 99.9 %. For the Gram-positive strain (*S. aureus*), at 1 month after its preparation, the FPS-T3 films decreased the bacterial growth by approximately 4 logs (CFU/mL) to reach a population of 4.3×10^3 CFU/mL. 4 months later, the *S. aureus* population was around 1.5×10^4 CFU/mL, but the inhibition was considerable since the control population was reduced by 3 logs (CFU/mL). At 8 months after the films preparation, the FPS-T3 films reduced the bacterial

population to 9.8×10^5 CFU/mL reducing thus the population by 1 log (CFU/mL). The slight loss of the AB activity of the FPS-T3 films between 1 and 8 months, can be attributed to a partial loss of the ZnO-NPs during storage. For the Bynel-T3 sample, the first test performed at 1 month post-preparation, has revealed a reduction rate of 3 logs (CFU/mL), and then for the subsequent tests, the reduction rate exceeded 99.9 %. This finding consolidated what was discussed above; ZnO-NPs were well impregnated on the surface of the PE-g-MA. Considering the quantity of ZnO-NPs that can be lost by handling the samples, sufficient concentration of ZnO-NPs was still well attached to the surface of the film 8 months after its preparation reducing thus more than 99.9 % of the bacterial population.

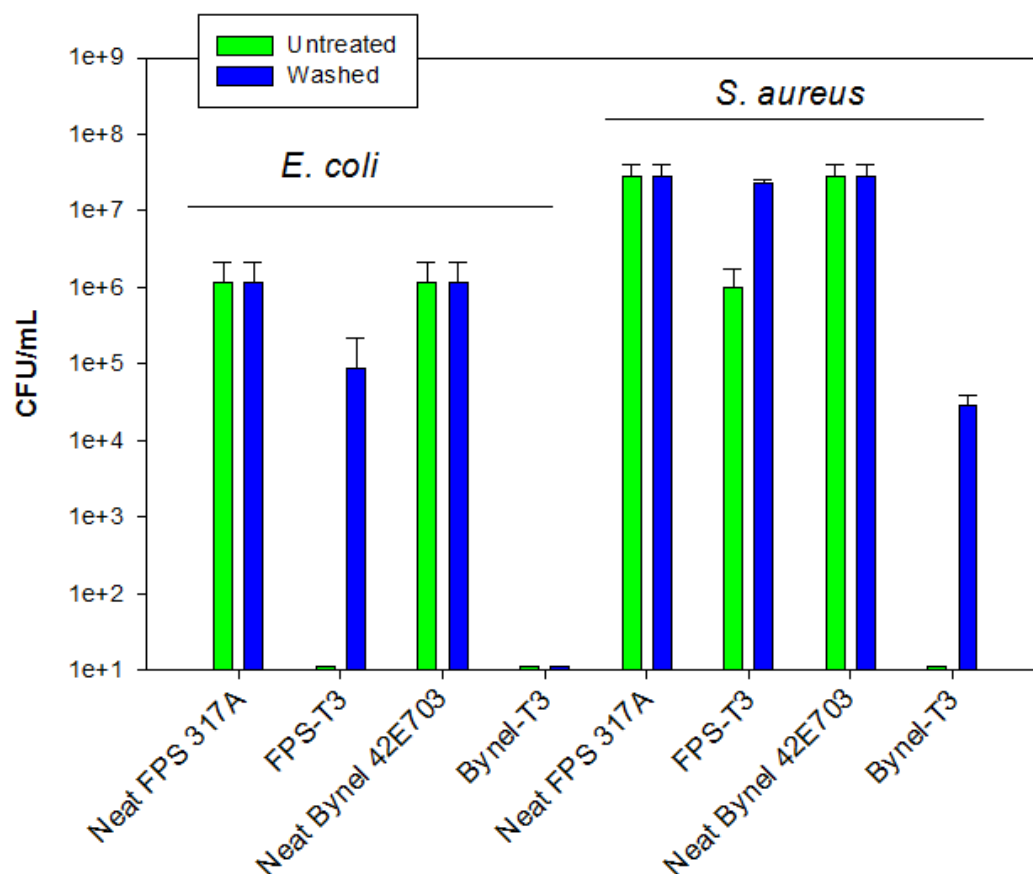
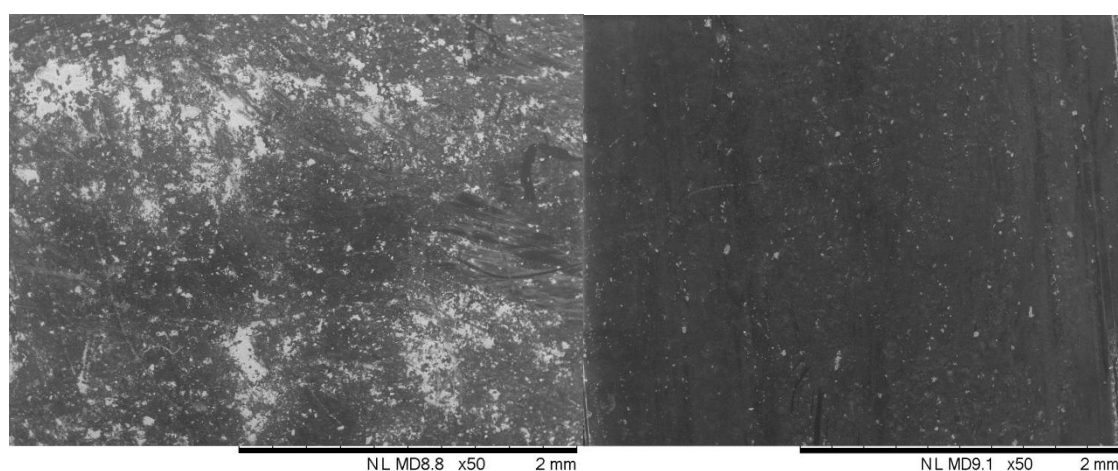


Figure 6.4: Inhibitory effects of treated and untreated FPS-T3 and Bynel-T3 films toward *E. coli* and *S. aureus*. The films were shaken in an ultrasonic bath during 20 minutes and then dried in air.

To confirm if the ZnO-NPs are well attached to LDPE films, the films were shaken in an ultrasonic bath for 20 minutes and then dried in air. During their preparation for the AB test, and before their inoculation, the films were sterilized by UV light during 20 minutes.

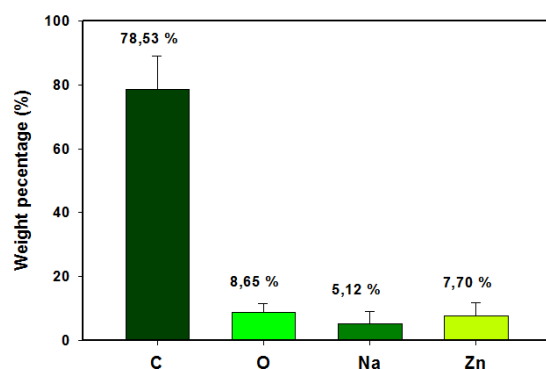
Figure 6.4 reports the AB properties of the treated and untreated films. According to the results, for the Gram-negative bacteria, the washed FPS-T3 films have reduced the *E. coli* growth by just 1 log (CFU/mL), whereas before washing the same film was able to kill all the bacterial population (more than 99.9 %). By contrast, Bynel-T3 films still displayed a high ABA and a decrease of more than 99.9 % of the bacterial density was achieved before and after washing. For

the *S. aureus* strain, the washed FPS-T3 films did not exhibit antibacterial properties when compared to the same film before washing that provided 2 logs (CFU/mL) reduction, while the washed Bynel-T3 films reduced the bacterial density by about 3 logs (CFU/mL). These films had lost much of their effectiveness since, before washing, they reduced the *S. aureus* density by approximately 7 logs (CFU/mL).

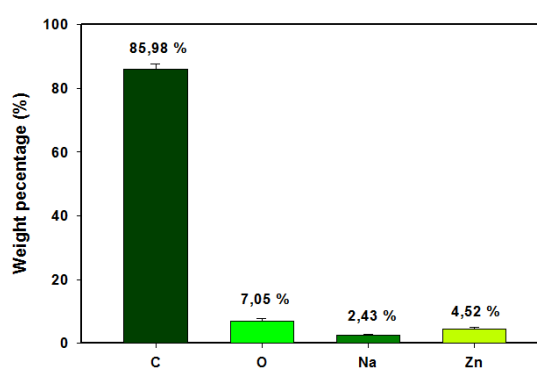


(a)

(b)



(c)



(d)

Figure 6.5: SEM and EDS analysis of the surface of (a), (c): FPS-T3 and (b), (d): Bynel-T3 films surface after washing 20 minutes in a ultrasonic bath. EDS samples were analyzed with a mapping mode operating at 15 KV.

Taking into account the previous results, it is imperative to determinate the amount of ZnO-NPs that remained on the surface of the films after the washing. EDS analysis, presented in Figure 6.5c and d allowed to estimate ZnO-NPs concentrations on the surface of these films by using the SEM-EDS mapping mode. The concentration of ZnO-NPs on the surface of the washed FPS-T3 and Bynel-T3 films was around 7.7 and 4.5 wt %, respectively. The observation of the SEM images consolidated the results discussed previously saying that the distribution of ZnO-NPs on the surface of the films is more uniform in the case of the Bynel-T3 films which was well illustrated in Figure 6.5a and b. It's obvious that after washing, a large amount of ZnO-NPs has been removed. According to EDS results, the surface of the washed Bynel-T3 films was characterized by a ZnO-NPs concentration of 4.5 wt %, which is far below the concentration on the surface of washed FPS-T3 films. Even though, the ABA of the washed Bynel-T3 films was higher than that of the washed FPS-T3 films for both bacterial strain. In fact, the washed Bynel-T3 films decreased more than 99.9 % of the *E. coli* population, whereas the washed FPS-T3 ones reduced the same bacterial population by only 1 log (CFU/mL). For *S. aureus*, the washed Bynel-T3 films reduced the bacterial density by about 3 logs (CFU/mL), while no ABA was recorded for the washed FPS-T3 films.

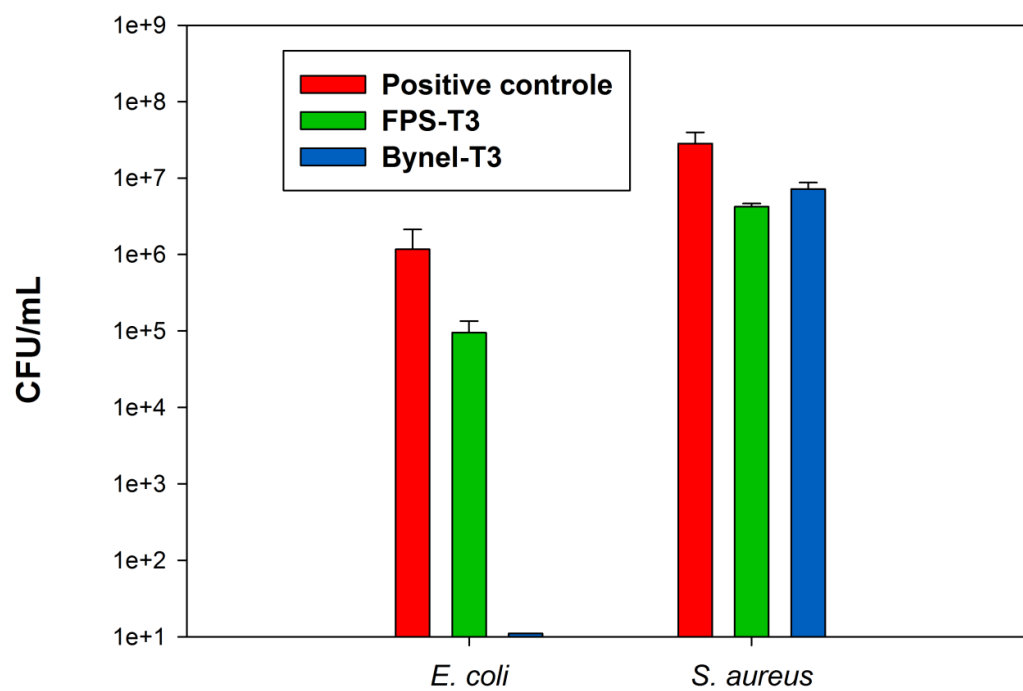
From the discussion above, it can be concluded that the distribution of the ZnO-NPs has a large effect on their ABA. A lower concentration with better distribution was more efficient toward both bacterial strains. This effect was due to the use of PE-g-AM that increased the compatibility between the polymeric matrix and ZnO-NPs, allowing a better adhesion to the surface with the formation of smaller ZnO-NPs agglomerates. Thereby, more surface area was available to cope with the bacteria. In fact, one of the parameters involved in ZnO-NPs antibacterial properties is the specific surface area. It increases for reduced particle size, thus enhancing particle surface reactivity [14, 15, 42, 46]. Moreover, generation of H_2O_2 is mainly dependent on the surface area of ZnO-NPs [42, 47]. Padmavathy and Vijayaraghavan [42] studied the AMA of ZnO suspensions against *E. coli* with various particle size (12 nm, 45 nm and 2 μ m), using a standard microbial method. They concluded that using small nanoparticles, thus having a larger surface area, will generate a higher concentration of ROS on the surface and will result in greater ABA. More precisely, for smaller ZnO-NPs, more particles are needed to cover the bacterial colony (2 μ m), resulting in a larger number of ROS, killing bacteria more effectively [42]. By analogy, it

can be assumed that smaller agglomeration of the ZnO-NPs, could provide more surface area and more ROS to ensure better ABA.

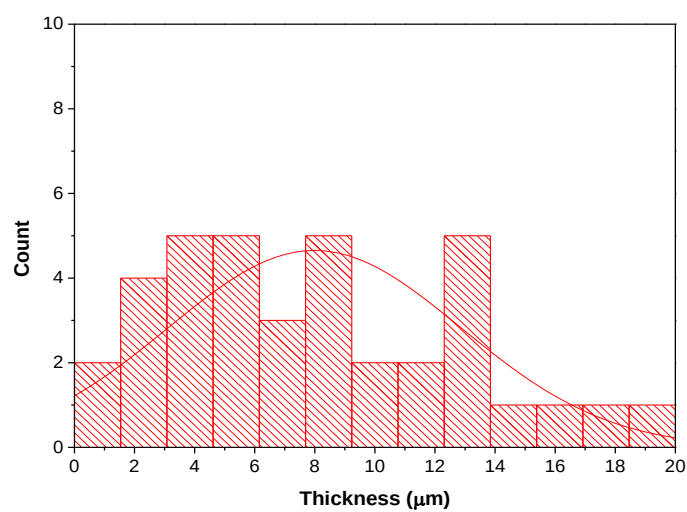
But if the ZnO-NPs will be blended with LDPE via the melt compounding, are they going to retain the same AB properties? To answer this question, a master batch with a 20 wt % of ZnO-NPs was prepared. Then, they were diluted to produce cast films with 5 wt % ZnO-NPs, the first one was processed from the Bynel resin and the second was a blend of FPS and Bynel resin. The results of the AB evaluation did not show any interesting performance neither for Gram-positive nor the Gram-negative bacteria.

These results were predictable since the extrusion process as well as solvent casting are more suitable for migratory AB systems where the release of a volatile AB agent from the packaging material to the packaging headspace or the surface of the food product is required.

It is obvious that only when the ZnO-NPs are coated on the surface of the LDPE films and remain in direct contact with bacteria that they ensure efficient ABA against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. It remains to be seen if the sprayed ZnO-NPs will retain their activity if they were laminated with another polymer layer or their effectiveness will be lost.



(a)



(b)

Figure 6. 6: (a) Inhibitory effects of different FPS and Bynel films towards *E. coli* and *S. aureus*. The films were coated by dipping in FPS 317A /xylene solution. (b) Distribution of the thickness of the coating layer in μm .

The results of AB tests of the laminated Bynel and FPS films presented in

Figure 6. 6a show that the dipped FPS-T3 films reduced the *E. coli* population by just 1 log (CFU/mL), while the dipped Bynel-T3 was still efficient toward the bacteria and destroyed more than 99.9 % of the bacterial density. For *S. aureus*, the reduction has not even reached 1 log (CFU/mL) for both films. FPS-T3 films registered only 1 log (CFU/mL) reduction, while before lamination they were able to reduce more than 99.9 % from the bacterial population. The distribution of the thickness of the coating layer is presented in

Figure 6. 6b and it shows that the average thickness was around 8 μm for each side of the dipped films. According to these results, one can assume that, for coating thicknesses that does not exceed 8 μm , the coated Bynel-T3 could retain their activity toward *E. coli*. These films were characterized by a good adhesion of the ZnO-NPs to the LDPE surface. So to estimate the limit of this hypothesis, FPS-T3 were laminated with a hot press with PE films having different thickness (18, 21 and 38 μm). Then the ABA of these films were evaluated. The results (not shown here) showed that the films did not register any ABA toward *E. coli* and *S. aureus*, compared to the control samples. It is obvious that when the thickness of the lamination layer increased beyond 8 μm , the ZnO-NPs will be far away from the bacterial cells and lose their AB performance. To be efficient toward bacteria, ZnO-NPs should be in direct contact or close to the bacteria cells to ensure a good ABA.

6.6 Conclusions

This study presented a new approach to coat LDPE films with metallic AB agents. Both LDPE and LDPE-g-AM coated films showed considerable inhibition against *E. coli* and *S. aureus*. For the FPS films, the efficiency of the ZnO-NPs toward *S. aureus* was improved by increasing the processing temperature. SEM images of ZnO-coated LDPE films clearly showed that, in the case of the use of LDPE-g-AM, the distribution of the ZnO-NPs was more uniform, showing smaller aggregates. In this case, the compatibility between the polymeric matrix and the metal oxide NPs increased where the NPs were well attached to the surface of the film. The AB tests showed that the FPS film retained the same AB efficiency toward *E. coli* between 1 and 8 months post-

preparation. For *S. aureus*, the AB properties of the FPS-T3 films were slightly reduced, which may be due to a partial loss of the ZnO-NPs during storage or during samples preparation for the AB tests, since ZnO-NPs are not well attached to LDPE film surface. For the Bynel-T3 films, the ABA was improved between 1 and 8 months. When treated by shaking in water, the FPS-T3 films lost their AB properties toward *E. coli* and *S. aureus* by contrast to Bynel-T3 films that were able to keep a reduction rate higher than 3 logs (CFU/mL). To maintain desired ABA, it is recommended that the Bynel-T3 should be laminated with a film layer whose thickness does not exceed 8 μm . This coating approach guaranteed a good ABA of the ZnO-NPs that were absent in the case where NPs were compounded with the polymer in the melt state.

Acknowledgment

Financial support of 3S Pack NSERC/Saputo/Prolamina Industrial Research Chair from the natural Sciences and Engineering research council Canada and Industrial partners is gratefully acknowledged.

Compliance with Ethical Standards:

Funding: This study was funded by 3S Pack NSERC/Saputo/Prolamina Industrial Research Chair from the natural Sciences and Engineering research council Canada and Industrial partners.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

6.7 References

1. J. Bruna, A. Peñaloza, A. Guarda, F. Rodríguez, and M. Galotto, "Development of MtCu 2+/LDPE nanocomposites with antimicrobial activity for potential use in food packaging," *Applied clay science*, vol. 58, pp. 79-87, 2012.
2. J.-W. Rhim, H.-M. Park, and C.-S. Ha, "Bio-nanocomposites for food packaging applications," *Progress in Polymer Science*, vol. 38, pp. 1629-1652, 2013.
3. H. Abdali and A. Ajji, "Development of antibacterial structures and films using clove bud powder," *Industrial Crops and Products*, vol. 72, pp. 214-219, 2015.

4. D. Garlotta, "A literature review of poly (lactic acid)," *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 9, pp. 63-84, 2001.
5. M. Del Nobile, A. Conte, G. Buonocore, A. Incoronato, A. Massaro, and O. Panza, "Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers," *Journal of Food Engineering*, vol. 93, pp. 1-6, 2009.
6. A. Emamifar and M. Mohammadizadeh, "Preparation and Application of LDPE/ZnO Nanocomposites for Extending Shelf Life of Fresh Strawberries," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 53, pp. 488-495, 2015.
7. J. Sawai, "Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 54, pp. 177-182, 2003.
8. J. Sawai and T. Yoshikawa, "Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay," *Journal of applied microbiology*, vol. 96, pp. 803-809, 2004.
9. A. M. C. Ng, C. M. N. Chan, M. Y. Guo, Y. H. Leung, A. B. Djurišić, X. Hu, *et al.*, "Antibacterial and photocatalytic activity of TiO₂ and ZnO nanomaterials in phosphate buffer and saline solution," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 97, pp. 5565-5573, 2013.
10. H. M. De Azeredo, "Nanocomposites for food packaging applications," *Food research international*, vol. 42, pp. 1240-1253, 2009.
11. N. Bumbudsanpharoke and S. Ko, "Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations," *Journal of food science*, vol. 80, 2015.
12. N. Jones, B. Ray, K. T. Ranjit, and A. C. Manna, "Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms," *FEMS microbiology letters*, vol. 279, pp. 71-76, 2008.
13. L.-E. Shi, Z.-H. Li, W. Zheng, Y.-F. Zhao, Y.-F. Jin, and Z.-X. Tang, "Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: a review," *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 31, pp. 173-186, 2014.
14. L. Zhang, Y. Jiang, Y. Ding, M. Povey, and D. York, "Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids)," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 9, pp. 479-489, 2007.

15. O. Yamamoto, "Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide," *International Journal of Inorganic Materials*, vol. 3, pp. 643-646, 2001.
16. P. K. Stoimenov, R. L. Klinger, G. L. Marchin, and K. J. Klabunde, "Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents," *Langmuir*, vol. 18, pp. 6679-6686, 2002.
17. R. K. Dutta, P. K. Sharma, R. Bhargava, N. Kumar, and A. C. Pandey, "Differential susceptibility of Escherichia coli cells toward transition metal-doped and matrix-embedded ZnO nanoparticles," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 114, pp. 5594-5599, 2010.
18. X. Li, Y. Xing, W. Li, Y. Jiang, and Y. Ding, "Antibacterial and physical properties of poly (vinyl chloride)-based film coated with ZnO nanoparticles," *Revista de Agaroquimica y Tecnologia de Alimentos*, vol. 16, pp. 225-232, 2010.
19. P. J. P. Espitia, N. d. F. F. Soares, J. S. dos Reis Coimbra, N. J. de Andrade, R. S. Cruz, and E. A. A. Medeiros, "Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications," *Food and Bioprocess Technology*, vol. 5, pp. 1447-1464, 2012.
- [20] K. Petersen, P. V. Nielsen, G. Bertelsen, M. Lawther, M. B. Olsen, N. H. Nilsson, *et al.*, "Potential of biobased materials for food packaging," *Trends in food science & technology*, vol. 10, pp. 52-68, 1999.
21. I. Arvanitoyannis, E. Psomiadou, C. G. Biliaderis, H. Ogawa, N. Kawasaki, and A. Nakayama, "Biodegradable films made from low density polyethylene (LDPE), ethylene acrylic acid (EAA), polycaprolactone (PCL) and wheat starch for food packaging applications: Part 3," *Starch-Stärke*, vol. 49, pp. 306-322, 1997.
22. R. Pantani, G. Gorrasi, G. Vigliotta, M. Murariu, and P. Dubois, "PLA-ZnO nanocomposite films: Water vapor barrier properties and specific end-use characteristics," *European Polymer Journal*, vol. 49, pp. 3471-3482, 2013.
23. M. Vähä-Nissi, M. Pitkänen, E. Salo, E. Kenttä, A. Tanskanen, T. Sajavaara, *et al.*, "Antibacterial and barrier properties of oriented polymer films with ZnO thin films applied with atomic layer deposition at low temperatures," *Thin Solid Films*, vol. 562, pp. 331-337, 2014.
24. G. Applerot, N. Perkash, G. Amirian, O. Girshevitz, and A. Gedanken, "Coating of glass with ZnO via ultrasonic irradiation and a study of its antibacterial properties," *Applied surface science*, vol. 256, pp. S3-S8, 2009.

25. A. Emamifar, M. Kadivar, M. Shahedi, and S. Soleimanian-Zad, "Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice," *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 11, pp. 742-748, 2010.
26. A. Emamifar, M. Kadivar, M. Shahedi, and S. Soleimanian-Zad, "Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice," *Food Control*, vol. 22, pp. 408-413, 2011.
27. N. Lepot, M. Van Bael, H. Van den Rul, J. D'Haen, R. Peeters, D. Franco, *et al.*, "Influence of incorporation of ZnO nanoparticles and biaxial orientation on mechanical and oxygen barrier properties of polypropylene films for food packaging applications," *Journal of applied polymer science*, vol. 120, pp. 1616-1623, 2011.
28. J. Li, R. Hong, M. Li, H. Li, Y. Zheng, and J. Ding, "Effects of ZnO nanoparticles on the mechanical and antibacterial properties of polyurethane coatings," *Progress in Organic Coatings*, vol. 64, pp. 504-509, 2009.
29. N. Petchwattana, S. Covavisaruch, S. Wibooranawong, and P. Naknaen, "Antimicrobial food packaging prepared from poly (butylene succinate) and zinc oxide," *Measurement*, vol. 93, pp. 442-448, 2016.
30. P. Carvalho, P. Sampaio, S. Azevedo, C. Vaz, J. Espinós, V. Teixeira, *et al.*, "Influence of thickness and coatings morphology in the antimicrobial performance of zinc oxide coatings," *Applied surface science*, vol. 307, pp. 548-557, 2014.
31. K. Ghule, A. V. Ghule, B.-J. Chen, and Y.-C. Ling, "Preparation and characterization of ZnO nanoparticles coated paper and its antibacterial activity study," *Green Chemistry*, vol. 8, pp. 1034-1041, 2006.
32. Y. Wang, Q. Zhang, C.-I. Zhang, and P. Li, "Characterisation and cooperative antimicrobial properties of chitosan/nano-ZnO composite nanofibrous membranes," *Food Chemistry*, vol. 132, pp. 419-427, 2012.
33. D. S. Vicentini, A. Smania, and M. C. Laranjeira, "Chitosan/poly (vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 30, pp. 503-508, 2010.
34. I. S. Tawakkal, M. J. Cran, J. Miltz, and S. W. Bigger, "A Review of Poly (Lactic Acid)-Based Materials for Antimicrobial Packaging," *Journal of food science*, vol. 79, pp. R1477-R1490, 2014.

35. R. Jalal, E. K. Goharshadi, M. Abareshi, M. Moosavi, A. Yousefi, and P. Nancarrow, "ZnO nanofluids: green synthesis, characterization, and antibacterial activity," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 121, pp. 198-201, 2010.
36. J. Sawai, S. Shoji, H. Igarashi, A. Hashimoto, T. Kokugan, M. Shimizu, *et al.*, "Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry," *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 86, pp. 521-522, 1998.
37. A. Lipovsky, Y. Nitzan, A. Gedanken, and R. Lubart, "Antifungal activity of ZnO nanoparticles—the role of ROS mediated cell injury," *Nanotechnology*, vol. 22, p. 105101, 2011.
38. R. Brayner, R. Ferrari-Iliou, N. Brivois, S. Djediat, M. F. Benedetti, and F. Fiévet, "Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium," *Nano Letters*, vol. 6, pp. 866-870, 2006.
39. L. K. Adams, D. Y. Lyon, and P. J. Alvarez, "Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions," *Water research*, vol. 40, pp. 3527-3532, 2006.
40. L. Zhang, Y. Ding, M. Povey, and D. York, "ZnO nanofluids—A potential antibacterial agent," *Progress in Natural Science*, vol. 18, pp. 939-944, 2008.
41. K. M. Reddy, K. Feris, J. Bell, D. G. Wingett, C. Hanley, and A. Punnoose, "Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems," *Applied physics letters*, vol. 90, p. 213902, 2007.
42. N. Padmavathy and R. Vijayaraghavan, "Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study," *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 9, p. 035004, 2008.
43. Y. Xie, Y. He, P. L. Irwin, T. Jin, and X. Shi, "Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against Campylobacter jejuni," *Applied and environmental microbiology*, vol. 77, pp. 2325-2331, 2011.
44. G. Applerot, A. Lipovsky, R. Dror, N. Perkash, Y. Nitzan, R. Lubart, *et al.*, "Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury," *Advanced Functional Materials*, vol. 19, pp. 842-852, 2009.
45. R. A. Majid, H. Ismail, and R. M. Taib, "Effects of polyethylene-g-maleic anhydride on properties of low density polyethylene/thermoplastic sago starch reinforced kenaf fibre composites," *Iran. Polym. J.*, vol. 19, pp. 501-510, 2010.

46. L. Zhang, Y. Jiang, Y. Ding, N. Daskalakis, L. Jeuken, M. Povey, *et al.*, "Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against E. coli," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 12, pp. 1625-1636, 2010.
47. T. Ohira and O. Yamamoto, "Correlation between antibacterial activity and crystallite size on ceramics," *Chemical engineering science*, vol. 68, pp. 355-361, 2012.

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

La validation de l'activité antibactérienne des oxydes métalliques en suspensions est une étape indispensable avant leur incorporation au sein de matrices polymériques pour former de nouveaux nanocomposites antibactériens. Cette validation s'est montrée indispensable à cause de la non-reproductibilité des résultats des tests antibactériens sur des mats de nanofibres de PLA à base de ces nanoparticules. De plus, cette étape est primordiale puisqu'une fois incorporés dans des nanocomposites, l'efficacité des oxydes métalliques a été comparée, une évaluation de leur activité quand ils ne sont pas influencés par la présence d'autres éléments (polymère) était cruciale. S'il est vrai que plusieurs études ont rapporté l'efficacité de ces oxydes, leurs propriétés intrinsèques (taille, propriétés de surface, présence de groupements fonctionnels), les méthodes de quantification de l'activité antibactérienne, ainsi que les souches bactériennes exploitées étaient assez variables et donc il était difficile de faire des extrapolations. L'influence des propriétés intrinsèques du ZnO (taille, concentration, propriétés de surface) ainsi que celles des souches bactériennes (Gram-négatif, Gram-positif) a été largement étudiée, mais rares sont les études qui se sont focalisées sur les prétraitements que peuvent recevoir les suspensions d'oxydes métalliques avant leur contamination. Un intérêt spécial a été porté aux vibrations ultrasonores comme prétraitement pour les solutions des nanoparticules. En effet, il est connu que l'un des problèmes majeurs survenus lors de l'utilisation des nanoparticules de ZnO est leur tendance à l'agglomération en solutions. Celle-ci découle essentiellement de leur énergie de surface ainsi que de leur hydrophobicité assez élevée. Durant l'une des rares études portant sur l'effet des vibrations ultrasonores sur les suspensions de ZnO, une contamination avait eu lieu avant le traitement des suspensions. En outre, cette étude s'est intéressée principalement à l'effet que peuvent avoir ces vibrations sur les interactions physiques entre les nanoparticules de ZnO et la membrane bactérienne. Les tests *in vitro* menés au cours de ce projet ont montré que les vibrations ultrasonores combinées avec la stérilisation des suspensions ont engendré un effet synergique sur l'amélioration de l'efficacité antibactérienne des nanoparticules de ZnO. Cette amélioration s'est manifestée par une diminution considérable des CMBs des suspensions d'oxydes métalliques. Les vibrations ultrasonores ont probablement aidé à dissocier les agglomérats des nanoparticules de

ZnO et à mieux les solubiliser en ions Zn^{2+} . Ainsi, une meilleure internalisation des nanoparticules et une concentration plus élevée en Zn^{2+} peuvent être la cause de l'augmentation du taux d'inhibition de la bactérie *E. coli* par les suspensions de ZnO.

Les résultats de l'étude comparative menée sur les nanoparticules de ZnO et de ZnO-UVM-7 ont également souligné l'amélioration de l'activité antibactérienne engendrée par le dopage de la silice par des nanoparticules de ZnO. Ces résultats sont en cohérence avec la littérature et peuvent être expliqués principalement par la diminution de l'agglomération et du diamètre de ces nanoparticules, ce qui augmente la surface active disponible des oxydes métalliques.

Le procédé d'électrofilage a été sélectionné d'une part en raison de sa simplicité, la facilité de son utilisation et son moindre coût et d'autre part en vue des avantages que peuvent apporter les structures en nanofibres tels qu'une surface spécifique et un rapport d'aspect assez élevés. Parmi les divers polyesters dégradables aliphatiques, le PLA a été considéré comme l'un des matériaux biodégradables les plus intéressants et les plus prometteurs pour le développement de matériaux d'emballage antibactériens. Comme il a reçu le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) par la FDA (Food and Drug Administration), le PLA a été approuvé pour les utilisations dans les emballages alimentaires, y compris les applications de contact direct. En outre, il convient également à la production de nanofibres électrofilées minces et uniformes et peut être dissout dans de nombreux solvants courants.

Malgré la simplicité du procédé d'électrofilage, l'obtention des fibres à base de nanoparticules de ZnO était une tâche complexe en raison de la mauvaise solubilisation et de l'agglomération des nanoparticules de ZnO en suspensions. Vu que la concentration finale des nanoparticules de ZnO quantifiée dans les nanofibres de PLA était variable d'un échantillon à un autre, il fallait au moins utiliser le même mat de fibres pour les échantillons d'un même triplicata pour une teneur donnée en ZnO. Ce détail a rendu la tâche plus fastidieuse, puisque l'allongement du temps de l'électrofilage favorisait davantage la sédimentation des nanoparticules au fond de la seringue pendant le procédé, diminuant ainsi la concentration finale en nanoparticules de ZnO dans les nanofibres obtenues. Ainsi, l'instabilité de ces suspensions a exigé une étude de leurs propriétés rhéologiques. Les résultats ont prouvé que les suspensions de ZnO et de TFE représentent un milieu favorable pour la dégradation du PLA en solution, ce qui s'est traduit par une diminution importante de la viscosité des solutions. Cette chute de viscosité était encore plus prononcée au

dessus d'une certaine concentration seuil de ZnO où l'agglomération est favorisée davantage. Cela pourrait avoir des répercussions négatives sur la fonction antibactérienne des nanofibres de PLA, puisque des billes de PLA ont été formées en même temps que les nanofibres avec formation de gros agglomérats. Ceci pourrait probablement modifier la surface spécifique disponible des nanoparticules. En effet, la validation de cette baisse de la viscosité par une mesure directe du poids moléculaire des solutions avant et après l'exposition aux nanoparticules de ZnO n'était pas possible à cause de la présence des nanoparticules en solutions.

Par conséquent, pour développer des nanofibres à base de nanoparticules de ZnO, il faut choisir judicieusement le solvant, ainsi que les teneurs adéquates en ZnO permettant à la fois de réduire la prolifération des souches bactériennes tout en évitant leur agglomération. Pour être efficaces au sein d'un emballage alimentaire antibactérien, ces nanofibres à base de ZnO doivent être intégrées à la couche interne de l'emballage qui est généralement constituée de PE. Cette condition représente un frein quant à l'utilisation des ces nanofibres comme partie intégrante d'un emballage alimentaire actif et ce en raison de la faible adhésion des nanofibres due à la différence de polarité et au manque d'affinité entre le PLA et le PE. Pour surmonter ce frein, l'électrofilage peut se faire directement sur des films de PE ayant déjà subis un traitement plasma ou corona. Un autre élément qui peut faire obstacle à l'exploitation des nanofibres dans un emballage alimentaire actif est le fait que leur efficacité exige strictement un contact direct avec l'aliment emballé (tel que discuté dans la littérature). Ceci pourrait limiter l'utilisation de ces nanofibres à certains types d'emballage ayant un contact direct avec l'aliment dont les emballages sous vide pour la viande fraîche, le poulet ou le poisson. Néanmoins, malgré ces obstacles, les demandes pour des emballages alimentaires à la fois biodégradables et antibactériens pouvant allonger la durée de conservation des aliments ne cesse de croître et aujourd'hui elle est plus forte que jamais. Dans la dernière partie de ce travail, on s'est focalisé sur le développement de films antibactériens en combinant le procédé d'extrusion qui demeure le procédé le plus couramment utilisé pour développer les films d'emballages et la technique de revêtement. Les films actifs à base de PE ont été sélectionnés grâce à leurs bonnes propriétés de scellage et leur transparence qui sont deux caractéristiques absentes pour les mats de nanofibres à base de PLA.

Une attention particulière a été accordée à l'utilisation des revêtements à base de nanoparticules dans les emballages alimentaires. La nouvelle méthode de revêtement des films de PE proposée dans ce projet, est une méthode simple et ne nécessite l'utilisation ni de solvants ni d'équipements

spécifiques. Un tel revêtement maximise l'efficacité antibactérienne des nanoparticules de ZnO qui sont disponibles à la surface du film de PE en contact direct avec la surface contaminée. Ce nouveau procédé convient parfaitement aux agents antibactériens non-migrateurs comme le ZnO. Les résultats *in vitro* ont prouvé que l'activité antibactérienne de ces films est Gram-dépendante avec une plus grande sensibilité de la bactérie *E. coli* comparativement à *S aureus*. L'augmentation de la température au cours du procédé d'extrusion ainsi que l'utilisation d'un grade de PE greffé avec l'anhydride maléique ont largement favorisé l'attachement ainsi que la distribution uniforme des nanoparticules de ZnO à la surface des films de PE. Ces films ont retenu leur efficacité antibactérienne vis-à-vis de la bactérie *E. coli* après 8 mois de leur préparation avec un taux de réduction qui dépassait 99.9 %.

Quand ces films ont été laminés avec une fine couche de PE pur, ils ont conservé un taux d'inhibition considérable pour *E. coli* seulement dans les cas où l'épaisseur des films de laminage ne dépassait pas 8 μm . En effet, cette épaisseur constitue probablement la distance maximale à travers laquelle les espèces réactives générées par les nanoparticules de ZnO pourraient migrer pour être en contact avec les parois cellulaires. L'idée derrière ce procédé de laminage est de limiter le contact direct entre les nanoparticules et la surface de l'aliment emballé pour le rendre plus sécuritaire. Des recherches approfondies devraient être menées pour consolider cette idée, développer ce procédé de revêtement pour l'amener à l'échelle industrielle et élaborer ainsi un emballage actif qui soit plus sécuritaire. Une autre alternative serait d'exploiter un troisième élément autre que la matrice polymérique et l'oxyde antibactérien pour stimuler la migration des nanoparticules de ZnO à la surface des films pendant leur formation.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des nanoparticules d'oxydes métalliques à travers les trois parties de ce travail de recherche a permis de comparer leurs performances antibactériennes en solution et en nanocomposites en exploitant des matrices polymériques et des procédés différents.

Les huiles essentielles ont été aussi exploitées durant ce travail comme agent antibactériens. Le thymol a été incorporé à la matrice polymérique à l'état fondu. Les mélanges de PE et de thymol ont été réalisés à l'aide du procédé d'extrusion et du mélangeur interne. Les films de PE incorporés avec le thymol n'ont pas prouvé une activité antibactérienne importante et durable à cause de la grande volatilité du thymol.

Il est vrai que le secteur des emballages alimentaires pourrait largement bénéficier des nanocomposites antibactériens pour réduire ou inhiber la prolifération de la flore d'altération ou de la flore pathogène à la surface des aliments emballés. Néanmoins des préoccupations concernant la sécurité de ces nanoparticules doivent être considérées.

En effet, l'exposition aux nanoparticules présentes dans les emballages alimentaires peut se produire à travers le contact avec la peau, l'inhalation mais surtout l'ingestion des nanoparticules qui ont migré vers l'aliment. Par exemple, selon une étude menée par Sahrma et al. [86], il s'est avéré que les nanoparticules de ZnO pourraient avoir une toxicité sur les cellules épidermiques humaines, même si le ZnO ("bulk") n'est pas toxique. Malgré cela, on peut constater que les données scientifiques disponibles sur la migration des nanoparticules des emballages vers les aliments sont bien limitées. Ces études sont généralement menées à l'aide de simulant de denrées alimentaires, et non pas sur des vrais aliments. Aussi, la réglementation canadienne concernant l'utilisation des nanoparticules de ZnO n'est pas encore claire. Citons que les seules données disponibles sur le taux de migration des nanoparticules de ZnO proviennent d'une réglementation européenne et spécifient la concentration maximale autorisée de ZnO à 25 mg/Kg d'aliment [87]. Un niveau indéfini de la toxicité des nanoparticules et le manque de connaissance sur leur effet sur la santé humaine et sur l'évaluation des risques pourraient expliquer le manque actuel d'emballages à base de nanoparticules de ZnO sur le marché Nord-Américain. Bien que les États-Unis soient un des principaux pays leaders dans le développement de ressources de sécurité en nanomatériaux pour les aliments et les emballages alimentaires, une approche réglementaire définitive sur l'utilisation des nanomatériaux au contact des aliments est encore en cours de développement par la FDA. Par ailleurs, chaque gouvernement doit prendre des mesures de coopération internationale pour la mise en place d'un système d'alerte, car les nanoparticules peuvent être difficiles à détecter dans les produits emballés importés et transférés d'un pays à l'autre [88].

CHAPITRE 8 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

8.1 Conclusions

Ce travail de recherche s'est concentré sur la production de nanocomposites à base de nanoparticules de ZnO en vue d'une potentielle utilisation comme matériaux d'emballage alimentaire à caractère antibactérien. Pour ce faire, l'évaluation des propriétés antibactériennes des poudres à base de ZnO a d'abord été effectuée en solutions. Par la suite, deux méthodes d'incorporation différentes ont été testées et l'efficacité antibactérienne des nanocomposites obtenus a été examinée.

La première partie de cette étude a évalué l'effet des prétraitements tels que les vibrations ultrasonores et la stérilisation sur l'activité antibactérienne de suspensions de poudres de ZnO. Les résultats ont démontré que ces propriétés sont améliorées grâce à un effet synergique des vibrations ultrasonores et de la stérilisation. Cette amélioration s'est traduite par une diminution considérable des CMBs, où l'effet bactériostatique/bactéricide a été constaté pour des concentrations beaucoup plus faibles pour deux poudres différentes d'oxydes de zinc. Le dopage de la silice avec les nanoparticules de ZnO avait lui aussi contribué à l'amélioration de cette activité. L'incorporation des nanoparticules de ZnO au sein des nanofibres de PLA produites par le procédé d'électrofilage a indiqué que l'agglomération des nanoparticules peut constituer un obstacle pour l'optimisation des propriétés antibactériennes des nanofibres.

La deuxième partie s'est focalisée sur les propriétés rhéologiques des solutions d'électrofilage et l'effet qu'elles peuvent avoir sur la morphologie des nanofibres de PLA/ZnO. Les résultats ont montré que le PLA se dégrade en solution en présence du TFE et des nanoparticules de ZnO. Cette dégradation, qui se traduit par une chute considérable de la viscosité en solution, est favorisée par l'augmentation de la concentration en nanoparticules de ZnO en solutions et par l'allongement de la durée de conservation des solutions. Les nanofibres produites à partir de solutions de très faible viscosité, ont engendré la formation simultanée de nanofibres et de nanobilles avec la présence de gros agglomérats de ZnO. Les résultats suggèrent que le choix du chloroforme comme solvant, parmi ceux testés, permet d'obtenir des suspensions d'électrofilage stables avec une viscosité constante au cours du temps.

Finalement la troisième partie de ce travail a permis le développement d'une nouvelle méthode de revêtement à base de ZnO, assez facile à reproduire. Les résultats ont prouvé que pour une optimisation maximale de leur activité antibactérienne, les nanoparticules de ZnO doivent être à la surface des films plastiques en contact direct avec la surface contaminée. Cette activité a été conservée même 8 mois après la production des films. Par ailleurs, si la surface du revêtement est séparée de la surface contaminée par une fine couche de polymère pure, les nanoparticules de ZnO peuvent conserver une action antibactérienne acceptable à condition que l'épaisseur de cette couche ne dépasse pas 8 μm . Les résultats ont aussi souligné que l'activité des nanoparticules de ZnO est Gram-dépendante.

8.2 Recommandations

Les points suivants sont recommandés pour les travaux futurs :

- 1) Évaluer les propriétés antibactériennes des suspensions de ZnO contre *S. aureus* et l'effet des prétraitements (vibrations ultrasonores, stérilisation) sur l'amélioration de ces propriétés.
- 2) Tester l'efficacité des nanoparticules de ZnO dont la surface a été modifiée quand elles sont incorporées dans des nanofibres de PLA pour atténuer leur tendance à l'agglomération et favoriser leur action antibactérienne.
- 3) Élaborer des fibres de PLA/ZnO à l'aide d'un procédé simultané d'électrofilage de PLA/électro-pulvérisation de ZnO pour maximiser la présence des nanoparticules de ZnO à la surface des nanofibres de PLA.
- 4) Tester l'efficacité antibactérienne des nanofibres développées en présence de nanoparticules de ZnO modifiées ainsi que celle produites par le procédé simultané d'électrofilage/électro-pulvérisation vis-à-vis des bactéries d'origine pathogène dont *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, ou *L. monocytogenes*.
- 5) Évaluer les propriétés antibactériennes des nanofibres de PLA/ZnO *in situ* sur des aliments tels que la viande, le poulet ou le poisson frais.
- 6) Déposer, à l'aide du procédé de co-extrusion, la couche de laminage qui protégera le film de PE revêtu avec du ZnO pour uniformiser et minimiser l'épaisseur sur toute la surface.

- 7) Tester l'activité des films de LDPE/ZnO sur d'autres bactéries d'origine pathogène dont *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, ou *L. monocytogenes* et notamment des souches provenant de la banque American Type Culture Collection (ATCC).
- 8) Tester l'activité antibactérienne des films produits par revêtement de ZnO *in situ* sur des aliments tels que la viande, le poulet ou le poisson frais et évaluer l'allongement de la DLC engendré.
- 9) Étudier le taux de migration ou de libération suite à l'utilisation des films avec un revêtement de ZnO.
- 10) Évaluer l'effet des films produits par revêtement de ZnO sur les propriétés organoleptiques des aliments testés en termes d'odeur, saveur, aspect visuel et texture.
- 11) Incorporer les nanoparticules de ZnO au PE à l'état fondu en utilisant un troisième composé qui agira de sorte de favoriser la migration des nanoparticules de ZnO à la surface de ZnO.

RÉFÉRENCES

- [1] I. S. Tremblay, "Comment réduire le gaspillage alimentaire dans l'industrie agroalimentaire au Québec ?," Université Sherbrooke, 2015.
- [2] J. I. Cho, S. H. Lee, J. S. Lim, Y. J. Koh, H. S. Kwak, and I. G. Hwang, "Detection and distribution of food-borne bacteria in ready-to-eat foods in Korea," *Food Science and Biotechnology*, vol. 20, p. 525, 2011.
- [3] A. Llorens, E. Lloret, P. A. Picouet, R. Trbojevich, and A. Fernandez, "Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 24, pp. 19-29, 2012/03/01/ 2012.
- [4] P.H.A.C. (2013). *Food Safety*. Available: www.publichealth.gc.ca
- [5] C. Weeks, "More Canadians suffer food poisoning," 2005-2010.
- [6] R. Tankhiwale and S. Bajpai, "Preparation, characterization and antibacterial applications of ZnO-nanoparticles coated polyethylene films for food packaging," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 90, pp. 16-20, 2012.
- [7] P. Carvalho, P. Sampaio, S. Azevedo, C. Vaz, J. Espinós, V. Teixeira, *et al.*, "Influence of thickness and coatings morphology in the antimicrobial performance of zinc oxide coatings," *Applied surface science*, vol. 307, pp. 548-557, 2014.
- [8] Y. Liu, L. He, A. Mustapha, H. Li, Z. Hu, and M. Lin, "Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157: H7," *Journal of applied microbiology*, vol. 107, pp. 1193-1201, 2009.
- [9] H. M. De Azeredo, "Nanocomposites for food packaging applications," *Food research international*, vol. 42, pp. 1240-1253, 2009.
- [10] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials," *Biotechnology advances*, vol. 27, pp. 76-83, 2009.
- [11] A. Kołodziejczak-Radzimska and T. Jesionowski, "Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review," *Materials*, vol. 7, p. 2833, 2014.

- [12] L. Schmidt-Mende and J. L. MacManus-Driscoll, "ZnO – nanostructures, defects, and devices," *Materials Today*, vol. 10, pp. 40-48, 2007/05/01/ 2007.
- [13] A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seenii, N. H. M. Kaus, L. C. Ann, S. K. M. Bakhori, *et al.*, "Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism," *Nano-Micro Letters*, vol. 7, pp. 219-242, 2015.
- [14] M. Vaseem, A. Umar, and Y.-B. Hahn, "ZnO nanoparticles: growth, properties, and applications," *Metal oxide nanostructures and their applications*, vol. 5, pp. 1-36, 2010.
- [15] P. J. P. Espitia, N. d. F. F. Soares, J. S. dos Reis Coimbra, N. J. de Andrade, R. S. Cruz, and E. A. A. Medeiros, "Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications," *Food and Bioprocess Technology*, vol. 5, pp. 1447-1464, 2012.
- [16] L.-E. Shi, Z.-H. Li, W. Zheng, Y.-F. Zhao, Y.-F. Jin, and Z.-X. Tang, "Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: a review," *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 31, pp. 173-186, 2014.
- [17] S. B. Kulkarni, U. M. Patil, R. R. Salunkhe, S. S. Joshi, and C. D. Lokhande, "Temperature impact on morphological evolution of ZnO and its consequent effect on physico-chemical properties," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 509, pp. 3486-3492, 2011/02/24/ 2011.
- [18] E. Tang, G. Cheng, X. Ma, X. Pang, and Q. Zhao, "Surface modification of zinc oxide nanoparticle by PMAA and its dispersion in aqueous system," *Applied Surface Science*, vol. 252, pp. 5227-5232, 2006.
- [19] J. El Haskouri, D. O. de Zárate, C. Guillem, J. Latorre, M. Caldés, A. Beltrán, *et al.*, "Silica-based powders and monoliths with bimodal pore systems," *Chemical Communications*, pp. 330-331, 2002.
- [20] F. Yuan, H. Peng, Y. Yin, Y. Chunlei, and H. Ryu, "Preparation of zinc oxide nanoparticles coated with homogeneous Al₂O₃ layer," *Materials Science and Engineering: B*, vol. 122, pp. 55-60, 2005.
- [21] H. Chen, Z. Guo, and L. Jia, "Preparation and surface modification of highly dispersed nano-ZnO with stearic acid activated by N, N'-carbonyldiimidazole," *Materials Letters*, vol. 82, pp. 167-170, 2012.

- [22] M. Kotecha, W. Veeman, B. Rohe, and M. Tausch, "NMR investigations of silane-coated nano-sized ZnO particles," *Microporous and mesoporous materials*, vol. 95, pp. 66-75, 2006.
- [23] Z. Yuan, W. Zhou, T. Hu, Y. Chen, F. Li, Z. Xu, *et al.*, "Fabrication and properties of silicone rubber/ZnO nanocomposites via in situ surface hydrosilylation," *Surface Review and Letters*, vol. 18, pp. 33-38, 2011.
- [24] W. Rathnayake, H. Ismail, A. Baharin, I. Bandara, and S. Rajapakse, "Enhancement of the antibacterial activity of natural rubber latex foam by the incorporation of zinc oxide nanoparticles," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 131, 2014.
- [25] S. Tjong and G. Liang, "Electrical properties of low-density polyethylene/ZnO nanocomposites," *Materials chemistry and physics*, vol. 100, pp. 1-5, 2006.
- [26] Z. Song, T. A. Kelf, W. H. Sanchez, M. S. Roberts, J. Rička, M. Frenz, *et al.*, "Characterization of optical properties of ZnO nanoparticles for quantitative imaging of transdermal transport," *Biomedical Optics Express*, vol. 2, pp. 3321-3333, 2011/12/01 2011.
- [27] S. E. Cross, B. Innes, M. S. Roberts, T. Tsuzuki, T. A. Robertson, and P. McCormick, "Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation," *Skin pharmacology and physiology*, vol. 20, pp. 148-154, 2007.
- [28] J. T. Seil and T. J. Webster, "Reduced Staphylococcus aureus proliferation and biofilm formation on zinc oxide nanoparticle PVC composite surfaces," *Acta biomaterialia*, vol. 7, pp. 2579-2584, 2011.
- [29] A. Yadav, V. Prasad, A. Kathe, S. Raj, D. Yadav, C. Sundaramoorthy, *et al.*, "Functional finishing in cotton fabrics using zinc oxide nanoparticles," *Bulletin of Materials Science*, vol. 29, pp. 641-645, 2006.
- [30] H. Nawaz, B. Solangi, B. Zehra, and U. Nadeem, "Preparation of nano zinc oxide and its application in leather as a retanning and antibacterial agent," *Canadian Journal on Scientific and Industrial Research*, vol. 2, pp. 164-170, 2011.
- [31] R. Rajendra, C. Balakumar, H. M. Ahammed, S. Jayakumar, K. Vaideki, and E. Rajesh, "Use of zinc oxide nano particles for production of antimicrobial textiles," *International Journal of Engineering, Science and Technology*, vol. 2, pp. 202-208, 2010.

- [32] W. Zhang, G. Tu, H. Zhang, Y. Zheng, and L. Yang, "Synthesis and antibacterial activity of mesoporous zinc oxide particle with high specific surface area," *Materials Letters*, vol. 114, pp. 119-121, 2014.
- [33] A. Hatamie, A. Khan, M. Golabi, A. P. Turner, V. Beni, W. C. Mak, *et al.*, "Zinc oxide nanostructure-modified textile and its application to biosensing, photocatalysis, and as antibacterial material," *Langmuir*, vol. 31, pp. 10913-10921, 2015.
- [34] R. Wahab, A. Mishra, S.-I. Yun, Y.-S. Kim, and H.-S. Shin, "Antibacterial activity of ZnO nanoparticles prepared via non-hydrolytic solution route," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 87, pp. 1917-1925, 2010.
- [35] Y. Xie, Y. He, P. L. Irwin, T. Jin, and X. Shi, "Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*," *Applied and environmental microbiology*, vol. 77, pp. 2325-2331, 2011.
- [36] X. H. Li, W. L. Li, Y. G. Xing, Y. H. Jiang, Y. L. Ding, and P. P. Zhang, "Effects of Nano-ZnO Power-Coated PVC Film on the Physiological Properties and Microbiological Changes of Fresh-Cut" Fuji" Apple," in *Advanced Materials Research*, 2011, pp. 450-453.
- [37] A. Emamifar, M. Kadivar, M. Shahedi, and S. Soleimani-Zad, "Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice," *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 11, pp. 742-748, 2010.
- [38] A. Emamifar, M. Kadivar, M. Shahedi, and S. Soleimani-Zad, "Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice," *Food Control*, vol. 22, pp. 408-413, 2011/03/01/ 2011.
- [39] A. Emamifar and M. Mohammadzadeh, "Preparation and Application of LDPE/ZnO Nanocomposites for Extending Shelf Life of Fresh Strawberries," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 53, pp. 488-495, 2015.
- [40] T. Jin and J. Gurtler, "Inactivation of *Salmonella* in liquid egg albumen by antimicrobial bottle coatings infused with allyl isothiocyanate, nisin and zinc oxide nanoparticles," *Journal of applied microbiology*, vol. 110, pp. 704-712, 2011.
- [41] B. Panea, G. Ripoll, J. González, Á. Fernández-Cuello, and P. Albertí, "Effect of nanocomposite packaging containing different proportions of ZnO and Ag on chicken breast meat quality," *Journal of Food Engineering*, vol. 123, pp. 104-112, 2014.

- [42] A. Akbar and A. K. Anal, "Zinc oxide nanoparticles loaded active packaging, a challenge study against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat poultry meat," *Food Control*, vol. 38, pp. 88-95, 2014.
- [43] R. Pantani, G. Gorrasi, G. Vigliotta, M. Murariu, and P. Dubois, "PLA-ZnO nanocomposite films: Water vapor barrier properties and specific end-use characteristics," *European Polymer Journal*, vol. 49, pp. 3471-3482, 2013.
- [44] X. Li, Y. Xing, W. Li, Y. Jiang, and Y. Ding, "Antibacterial and physical properties of poly (vinyl chloride)-based film coated with ZnO nanoparticles," *Revista de Agaroquimica y Tecnologia de Alimentos*, vol. 16, pp. 225-232, 2010.
- [45] X. Li, Y. Xing, Y. Jiang, Y. Ding, and W. Li, "Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens," *International journal of food science & technology*, vol. 44, pp. 2161-2168, 2009.
- [46] N. Petchwattana, S. Covavisaruch, S. Wibooranawong, and P. Naknaen, "Antimicrobial food packaging prepared from poly (butylene succinate) and zinc oxide," *Measurement*, vol. 93, pp. 442-448, 2016.
- [47] J. Sawai, S. Shoji, H. Igarashi, A. Hashimoto, T. Kokugan, M. Shimizu, *et al.*, "Detection of Active Oxygen Generated from Ceramic Powders Having Antibacterial Activity," *JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN*, vol. 29, pp. 627-633, 1996.
- [48] J. Sawai, S. Shoji, H. Igarashi, A. Hashimoto, T. Kokugan, M. Shimizu, *et al.*, "Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry," *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 86, pp. 521-522, 1998.
- [49] J. Sawai, "Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay," *Journal of microbiological methods*, vol. 54, pp. 177-182, 2003.
- [50] L. K. Adams, D. Y. Lyon, and P. J. Alvarez, "Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions," *Water research*, vol. 40, pp. 3527-3532, 2006.
- [51] Z. Emami-Karvani and P. Chehrizi, "Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on gram-positive and gram-negative bacteria," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 5, pp. 1368-1373, 2011.

- [52] N. Jones, B. Ray, K. T. Ranjit, and A. C. Manna, "Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms," *FEMS microbiology letters*, vol. 279, pp. 71-76, 2008.
- [53] L. Zhang, Y. Jiang, Y. Ding, M. Povey, and D. York, "Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids)," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 9, pp. 479-489, 2007.
- [54] R. Brayner, R. Ferrari-Iliou, N. Brivois, S. Djediat, M. F. Benedetti, and F. Fiévet, "Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium," *Nano Letters*, vol. 6, pp. 866-870, 2006.
- [55] J. Sawai and T. Yoshikawa, "Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay," *Journal of applied microbiology*, vol. 96, pp. 803-809, 2004.
- [56] A. Lipovsky, Y. Nitzan, A. Gedanken, and R. Lubart, "Antifungal activity of ZnO nanoparticles—the role of ROS mediated cell injury," *Nanotechnology*, vol. 22, p. 105101, 2011.
- [57] O. Yamamoto, "Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide," *International Journal of Inorganic Materials*, vol. 3, pp. 643-646, 2001.
- [58] K. M. Reddy, K. Feris, J. Bell, D. G. Wingett, C. Hanley, and A. Punnoose, "Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems," *Applied physics letters*, vol. 90, p. 213902, 2007.
- [59] R. Jalal, E. K. Goharshadi, M. Abareshi, M. Moosavi, A. Yousefi, and P. Nancarrow, "ZnO nanofluids: green synthesis, characterization, and antibacterial activity," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 121, pp. 198-201, 2010.
- [60] N. Padmavathy and R. Vijayaraghavan, "Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study," *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 9, p. 035004, 2008.
- [61] L. Zhang, Y. Ding, M. Povey, and D. York, "ZnO nanofluids—A potential antibacterial agent," *Progress in Natural Science*, vol. 18, pp. 939-944, 2008.
- [62] A. A. Tayel, W. F. EL-TRAS, S. Moussa, A. F. EL-BAZ, H. Mahrous, M. F. Salem, *et al.*, "Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens," *Journal of Food Safety*, vol. 31, pp. 211-218, 2011.

- [63] K. Hirota, M. Sugimoto, M. Kato, K. Tsukagoshi, T. Tanigawa, and H. Sugimoto, "Preparation of zinc oxide ceramics with a sustainable antibacterial activity under dark conditions," *Ceramics International*, vol. 36, pp. 497-506, 2010.
- [64] K. R. Raghupathi, R. T. Koodali, and A. C. Manna, "Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles," *Langmuir*, vol. 27, pp. 4020-4028, 2011.
- [65] W. Jiang, H. Mashayekhi, and B. Xing, "Bacterial toxicity comparison between nano-and micro-scaled oxide particles," *Environmental pollution*, vol. 157, pp. 1619-1625, 2009.
- [66] P. K. Stoimenov, R. L. Klinger, G. L. Marchin, and K. J. Klabunde, "Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents," *Langmuir*, vol. 18, pp. 6679-6686, 2002.
- [67] M. Ramani, S. Ponnusamy, and C. Muthamizhchelvan, "Preliminary investigations on the antibacterial activity of zinc oxide nanostructures," *Journal of nanoparticle research*, vol. 15, p. 1557, 2013.
- [68] H. Yang, C. Liu, D. Yang, H. Zhang, and Z. Xi, "Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 29, pp. 69-78, 2009.
- [69] K. Kairyte, A. Kadys, and Z. Luksiene, "Antibacterial and antifungal activity of photoactivated ZnO nanoparticles in suspension," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 128, pp. 78-84, 2013.
- [70] G. Applerot, N. Perkash, G. Amirian, O. Girshevitz, and A. Gedanken, "Coating of glass with ZnO via ultrasonic irradiation and a study of its antibacterial properties," *Applied surface science*, vol. 256, pp. S3-S8, 2009.
- [71] M. Premanathan, K. Karthikeyan, K. Jeyasubramanian, and G. Manivannan, "Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 7, pp. 184-192, 2011.
- [72] A. Russell, "Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 52, pp. 750-763, 2003.
- [73] T. Gordon, B. Perlstein, O. Houbara, I. Felner, E. Banin, and S. Margel, "Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial

- properties," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 374, pp. 1-8, 2011.
- [74] H. Rodríguez-Tobías, G. Morales, and D. Grande, "Improvement of mechanical properties and antibacterial activity of electrospun poly(d,l-lactide)-based mats by incorporation of ZnO-graft-poly(d,l-lactide) nanoparticles," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 182, pp. 324-331, 10/1/ 2016.
- [75] H. Rodríguez-Tobías, G. Morales, A. Ledezma, J. Romero, and D. Grande, "Novel antibacterial electrospun mats based on poly (D, L-lactide) nanofibers and zinc oxide nanoparticles," *Journal of materials science*, vol. 49, pp. 8373-8385, 2014.
- [76] R. Augustine, H. N. Malik, D. K. Singhal, A. Mukherjee, D. Malakar, N. Kalarikkal, *et al.*, "Electrospun polycaprolactone/ZnO nanocomposite membranes as biomaterials with antibacterial and cell adhesion properties," *Journal of Polymer Research*, vol. 21, p. 347, 2014.
- [77] D. Virovska, D. Paneva, N. Manolova, I. Rashkov, and D. Karashanova, "Electrospinning/electrospraying vs. electrospinning: a comparative study on the design of poly (l-lactide)/zinc oxide non-woven textile," *Applied Surface Science*, vol. 311, pp. 842-850, 2014.
- [78] K. Shalumon, K. Anulekha, S. V. Nair, S. Nair, K. Chennazhi, and R. Jayakumar, "Sodium alginate/poly (vinyl alcohol)/nano ZnO composite nanofibers for antibacterial wound dressings," *International journal of biological macromolecules*, vol. 49, pp. 247-254, 2011.
- [79] S. Lee, "Multifunctionality of layered fabric systems based on electrospun polyurethane/zinc oxide nanocomposite fibers," *Journal of applied polymer science*, vol. 114, pp. 3652-3658, 2009.
- [80] S. Anitha, B. Brabu, D. J. Thiruvadigal, C. Gopalakrishnan, and T. S. Natarajan, "Optical, bactericidal and water repellent properties of electrospun nano-composite membranes of cellulose acetate and ZnO," *Carbohydrate Polymers*, vol. 87, pp. 1065-1072, 2012/01/15/ 2012.
- [81] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnology advances*, vol. 28, pp. 325-347, 2010.

- [82] S. Nataraj, B. Kim, J. Yun, D. Lee, T. Aminabhavi, and K. Yang, "Electrospun nanocomposite fiber mats of zinc-oxide loaded polyacrylonitrile," *Carbon letters*, vol. 9, pp. 108-114, 2008.
- [83] I. S. Tawakkal, M. J. Cran, J. Miltz, and S. W. Bigger, "A Review of Poly (Lactic Acid)-Based Materials for Antimicrobial Packaging," *Journal of food science*, vol. 79, pp. R1477-R1490, 2014.
- [84] S. Mihindukulasuriya and L.-T. Lim, "Nanotechnology development in food packaging: A review," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 40, pp. 149-167, 2014.
- [85] J. H. Li, R. Y. Hong, M. Y. Li, H. Z. Li, Y. Zheng, and J. Ding, "Effects of ZnO nanoparticles on the mechanical and antibacterial properties of polyurethane coatings," *Progress in Organic Coatings*, vol. 64, pp. 504-509, 2009/03/01/ 2009.
- [86] V. Sharma, R. K. Shukla, N. Saxena, D. Parmar, M. Das, and A. Dhawan, "DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells," *Toxicology letters*, vol. 185, pp. 211-218, 2009.
- [87] *COMMISSION REGULATION (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food*
- [88] N. Bumbudsanpharoke and S. Ko, "Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations," *Journal of Food Science*, vol. 80, pp. R910-R923, 2015.