



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL "PLASMA ACTIVATED WATER" (PAW) SULLA COMPONENTE ACIDICA DI FILETTI DI SARDINA PILCHARDUS

EVALUATION OF "PLASMA ACTIVATED WATER" (PAW) EFFECTS ON THE FATTY ACID PROFILE OF SARDINA PILCHARDUS FILLETS

TIPO TESI: sperimentale

Studente:

NICOLE RANGO

Relatore:

DOTT.SSA ROBERTA FOLIGNI

Correlatore:

DOTT.SSA CINZIA MANNOZZI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

SOMMARIO

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	4
CAPITOLO 1: "IL PLASMA"	6
1.1 "Che cos'è il plasma"	6
2.1 "Classificazione del plasma"	
1.2.1 "Temperatura elettronica"	7
1.2.2 "Pressione"	9
1.2.3 "Densità e grado di ionizzazione"	9
CAPITOLO 2: "GENERATORI DI PLASMA NON TERMICI"	10
2.1 "Dispositivi per generazione di plasma freddo"	10
2.1.1 "Scarico corona"	11
2.1.2 "Scarica di barriera dielettrica (DBD)"	12
2.1.3 "Plasmi indotti a microonde"	13
2.1.4 "Scarica a radiofrequenza"	14
CAPITOLO 3 EFFETTI DEL PLASMA SUI COSTITUENTI E SULLE MICROSTRUTTURE ALIMENTARI	16
3.1 Effetto antimicrobico	16
3.2 Effetto di inibizione degli enzimi	17
3.3 Effetti su muffe e micotossine	18
3.4 Effetti sull'amido	19
3.5 Effetti sui lipidi	20
CAPITOLO 4 MATERIALI E METODI	23
4.1 Materia prima	23
4.2 Trattamento con plasma freddo	24
4.3 Estrazione a freddo cloroformio metanolo della frazione grassa. Errore. Il segnalibro non è definito.	
4.4 Determinazione acidi grassi	26
4.5 Determinazione dieni e trieni	28

CAPITOLO 5 RISULTATI E DISCUSSIONE	30
5.1 Ossidazione lipidica	30
5.2 Dieni e trieni	31
5.3 Acidi grassi	34
CONCLUSIONI	37
BIBLIOGRAFIA	38

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

INTRODUZIONE

Alla base di questo studio vi è una tecnologia innovativa, il plasma, la sua classificazione, i diversi generatori di plasma e la sua applicazione in diverse matrici alimentari. In particolare si pone l'attenzione sugli effetti che questo provoca sulla frazione lipidica.

Il plasma non termico, che sarà quello preso principalmente in considerazione, è un metodo moderno, economico e rispettoso dell'ambiente che sta guadagnando popolarità in vari tipi di industrie. E' stato applicato con successo in medicina, agricoltura, protezione dell'ambiente o industrie energetiche e tessili. Questa tecnologia ha anche guadagnato molto interesse nel settore alimentare.

La motivazione, che mi ha spinto ad approfondire tale tema, è principalmente quella di capire se effettivamente è possibile avere un'alternativa valida ai trattamenti termici, in quanto la domanda da parte dei consumatori di prodotti alimentari sani, con un'alterazione minima della qualità a costi ragionevoli è diventata la norma.

E' stato infatti provato che alcuni prodotti alimentari possono essere alterati dalla pastorizzazione termica convenzionale e dalla sterilizzazione.

Le limitazioni associate alle tecnologie termiche convenzionali hanno quindi creato molto interesse per le tecnologie non termiche, come i plasmi non termici che hanno appunto la capacità di lavorare all'interno di intervalli di bassa temperatura senza causare cambiamenti significativi alle matrici alimentari sensibili al calore riducendo al minimo la degradazione dei nutrienti e delle proprietà sensoriali.

Attualmente gli effetti del plasma freddo su alcuni componenti alimentari, come amido e proteine, sono considerati positivi, ma al contrario, l'effetto provocato sulla frazione lipidica viene considerato indesiderato poichè porta alla formazione di odori e sapori sgradevoli e ad un abbassamento della qualità del prodotto in conseguenza al grado di ossidazione determinato.

L'obiettivo della tesi è quindi quello di valutare, attraverso analisi sperimentali, l'entità del grado di ossidazione lipidica, attraverso la valutazione qualitativa e quantitativa di dieni, trieni e acidi grassi, in filetti di *Sardina pilchardus* trattati con acqua attivata al plasma (PAW).

Capitolo 1

IL PLASMA

1.1 Cos'è il plasma?

Il termine "plasma" è stato impiegato per la prima volta da Irving Langmuir nel 1928 per definire questo quarto stato della materia, dopo gli stati di solido, liquido e gas e costituisce più del 99% della materia dell'universo. Il cambiamento di fase da solido a liquido e ulteriormente a gas si verifica quando aumentiamo l'input di energia, allo stesso modo aumentando l'input di energia, oltre un certo livello nello stato del gas, si assiste alla ionizzazione delle molecole che produce lo stato del plasma. [1]

Esso non è altro che un gas parzialmente o totalmente ionizzato, in cui osserviamo una composizione chimica particolarmente complessa, vi troviamo diverse specie atomiche, molecolari, ioniche e radicali eccitate, che coesistono con numerose specie reattive, tra cui elettroni, ioni positivi e negativi, radicali liberi, atomi di gas, fotoni UV e luce visibile (figura 1), che hanno energia sufficiente per avviare reazioni chimiche. [2]

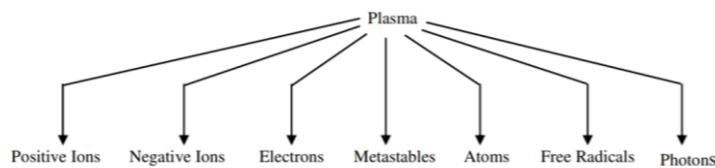


Figura 1. Costituenti del plasma [3]

1.2 Classificazione del plasma

A seconda del tipo di alimentazione di energia e delle quantità di energia trasferita al plasma, le proprietà del plasma cambiano, in termini di temperatura elettronica, di pressione del gas, di densità e del grado di ionizzazione.

1.2.1 *Temperatura elettronica*

Per quanto riguarda la temperatura elettronica, distinguiamo i plasmi ad alta temperatura o fusione e le cosiddette basse temperature o scariche di gas. Il plasma ad alta temperatura o plasma termico implica che tutte le specie (elettroni, ioni e specie neutre) si trovino in uno stato di equilibrio termico. Il plasma a bassa temperatura, invece, è ulteriormente suddiviso in plasma termico, chiamato anche plasma in quasi-equilibrio, che è in uno stato di equilibrio termico locale (LTE), e plasma non termico, chiamato anche plasma di non equilibrio termico locale (non-LTE) o plasma freddo.

I plasmi ad alta temperatura o plasmi termici (TP) sono caratterizzati da un equilibrio o da una quasi uguaglianza tra elettroni, ioni e neutri ($T_e = T_{ioni} = T_{neutri}$). I dispositivi di generazione di plasma termico, comunemente utilizzati, sono quelli prodotti da torce al plasma e dispositivi a microonde. Queste fonti producono un elevato flusso di calore e sono utilizzate principalmente in settori quali la lavorazione del materiale plasmatico e il trattamento al plasma dei materiali di scarto. L'alta temperatura dei TP può processare anche i rifiuti più recalcitranti tra cui solidi urbani, tossici, medici, rischi biologici, industriali e nucleari in forma elementale, riducendo in ultima analisi l'inquinamento ambientale causato da loro, ma per diverse applicazioni tecnologiche, la caratteristica ad alta temperatura dei TP non è né richiesta né desiderata, e in alcuni casi diventa persino proibitiva [3].

I plasmi a bassa temperatura, invece, possono essere distinti in:

- Plasmi di equilibrio termodinamico (o termico) locale (LTE)
- Plasmi di equilibrio termodinamico non locale (non-LTE).

Il plasma LTE richiede che le transizioni e le reazioni chimiche siano governate da collisioni e non da processi radiativi. Inoltre, i fenomeni di collisione devono essere micro-reversibili. Significa che ogni tipo di collisione deve essere bilanciata dalla sua inversa (eccitazione/deeccitazione; ionizzazione/ricombinazione; equilibrio cinetico).

Inoltre, LTE, richiede che i gradienti locali delle proprietà plasmatiche (temperatura, densità, conducibilità termica) siano sufficientemente bassi da permettere a una particella nel plasma di raggiungere l'equilibrio: il tempo di diffusione deve essere simile o superiore al tempo necessario alla particella per raggiungere l'equilibrio [4].

I plasmi non-LTE o plasmi freddi possono invece essere descritti da un modello a due temperature: una temperatura degli elettroni (T_e) e una temperatura delle particelle pesanti

(T_h). Per quanto riguarda l'enorme differenza di massa tra elettroni e particelle pesanti, la temperatura del plasma (o temperatura del gas) è fissata da T_h .

(La Tabella 1 riassume le principali caratteristiche dei plasmi LTE e non LTE).

I plasmi freddi, si riferiscono quindi, ai plasmi in cui la maggior parte dell'energia elettrica accoppiata, viene incanalata principalmente alla componente elettronica del plasma, producendo così elettroni energetici invece di riscaldare l'intero flusso di gas; mentre gli ioni plasma e i componenti neutri rimangono a temperatura ambiente o vicino. Poiché gli ioni e i neutri rimangono relativamente freddi, questa caratteristica offre la possibilità di utilizzare plasmi freddi per la chimica del plasma a bassa temperatura e per il trattamento di materiali sensibili al calore tra cui polimeri e tessuti biologici [3].

	Plasmi LTE	Plasmi non-LTE
Nome corrente	Plasmi termici	Plasmi freddi
Proprietà	$T_e = T_h$ Elevata densità di elettroni $10^{21} - 10^{26} m^{-3}$ Le collisioni non elastiche tra elettroni e particelle pesanti creano le specie reattive al plasma, mentre le collisioni elastiche riscaldano le particelle pesanti (l'energia degli elettroni viene così consumata)	$T_e \gg T_h$ Densità di elettroni inferiore: $< 10^{19} m^{-3}$ Le collisioni non elastiche tra elettroni e particelle pesanti inducono la chimica del plasma. Le particelle pesanti sono leggermente riscaldate da alcune collisioni elastiche (ecco perché l'energia degli elettroni rimane molto elevata)
Alcuni esempi	Plasma ad arco $T_e = T_h \approx 10,000 \text{ K}$	Scariche luminose (bagliore del plasma) $T_e \approx 10,000 - 100,000 \text{ K}$ $T_h \approx 300 - 1000 \text{ K}$

Tabella 1. Caratteristiche principali del plasma LTE e non-LTE [4]

1.2.2 Pressione

La pressione è un ulteriore parametro utilizzato per caratterizzare i plasmi freddi: si possono distinguere plasmi in vuoto o a bassa pressione (Low Pressure Discharge o LPD) oppure plasmi a pressione atmosferica (Atmospheric Pressure Discharge o APD).

I plasmi a bassa pressione (da 10^{-4} a 10^{-2} kPa) non sono LTE, in quanto la temperatura delle particelle pesanti è inferiore a quella elettronica.

Le collisioni anelastiche tra elettroni e particelle pesanti sono eccitanti o ionizzanti. Queste collisioni non aumentano la temperatura delle particelle pesanti.

Quando la pressione diventa più alta, le collisioni si intensificano. Inducono sia la chimica del plasma (da collisioni anelastiche) che il riscaldamento di particelle pesanti (da collisioni elastiche). La differenza tra T_e e T_h è ridotta: lo stato plasmatico si avvicina all'LTE ma non lo raggiunge.

Inoltre a causa del basso requisito di pressione (vuoto) per il plasma da creare, i sistemi al plasma a bassa pressione non sono stati ampiamente utilizzati per il trattamento alimentare. Negli ultimi anni però c'è stato uno sviluppo sostanziale dei sistemi al plasma a pressione atmosferica, che consente di trattare gli alimenti, campioni in modo più semplice ed economico [5].

1.2.3 Densità e grado di ionizzazione

Un ultimo parametro molto importante è la densità delle specie componenti (espressa in unità di misura $1/m^3$), ovvero gli elettroni (n_e), gli ioni (n_i) e le specie neutre (n_0).

Definita la densità per le specie è possibile ricavare il grado di ionizzazione

$$a = n_i / (n_i + n_0);$$

si possono così distinguere gas debolmente ionizzati in cui "a" tende a 0 (valori tipici di 10^{-6} per plasmi industriali e da laboratorio); oppure altamente ionizzati in cui "a" tende a 1, fino ad avere plasmi totalmente ionizzati se "a" è pari a 1 (per sistemi di plasma termonucleare: come tokamak, stellarator, plasma pinches ed altri).

Capitolo 2

GENERATORI DI PLASMA NON TERMICI

I plasmi vengono generati fornendo energia a un gas neutro al fine di riorganizzare la struttura elettronica della specie (atomi, molecole) e produrre specie e ioni eccitati. Questa energia può essere termica o trasportata da una corrente elettrica o da radiazioni elettromagnetiche. Ci sono vari modi per far fornire l'energia necessaria al gas neutro per la generazione di plasma.

Il plasma non termico (NTP), in particolare, può essere generato applicando energia elettrica o a microonde a gas (aria atmosferica o sintetica, ossigeno, azoto, elio, idrogeno, argon) o combinazioni di gas che sono a pressioni basse o atmosferiche.

Ci concentreremo sull'NTP generato a pressione atmosferica a causa dei suoi vantaggi per l'industria alimentare e perché non richiede condizioni di processo estreme [5].

Dopo l'applicazione di un campo elettrico al gas, diverse specie reattive vengono generate durante la collisione di elettroni, particelle di gas e atomi. Sulla base dell'equilibrio termodinamico, le collisioni elastiche portano al trasferimento e alla redistribuzione di una frazione dell'energia cinetica ad altre particelle.

L'energia immagazzinata negli elettroni liberi è solo la temperatura degli elettroni (T_e) raggiunge i valori più alti di 104 K, molto più alti della temperatura degli ioni neutri (T_n) quasi a temperatura ambiente ($T_e \gg T_n$) e dell'intera temperatura del gas di processo, T_g ($T_e \gg T_g$), permettendo così all'NTP di mantenere condizioni di temperatura relativamente basse.

D'altra parte, le collisioni anelastiche trasferiscono energia superiore a 15 eV, consentendo così varie reazioni plasma-chimiche, come eccitazione, dissociazione o ionizzazione. Questi processi portano alla generazione di specie reattive del plasma (RS) come: specie reattive dell'ossigeno (ROS), specie di azoto reattivo (RNS), particelle cariche, elettroni e fotoni UV / VUV [6-8].

2.1 Dispositivi per la generazione del plasma freddo

Esistono diversi dispositivi di generazione NTP. I principi di generazione delle scariche elettriche dipendono dalla configurazione dell'apparecchiatura e sono costituiti da getto di plasma, scarica corona, scarica a microonde, scarica a radiofrequenza e scarica di barriera dielettrica.

La configurazione dei componenti differisce da un'apparecchiatura all'altra, dando origine a diverse terminologie plasmatiche: scariche di barriera dielettrica (DBD), scarica a corona (CD), plasmi indotti a microonde (MIP), scarica a radiofrequenza (RFP) e getto di plasma a pressione atmosferica (APPJ). Alcune delle scariche al plasma e delle configurazioni delle apparecchiature sono brevemente discusse.

2.1.1 Scarico corona (CD)

Il primo schema che è stato utilizzato per generare NTP è stato lo scarico della corona. Lo scarico corona [9] è uno scarico non-LTE con bassa densità di corrente. Esiste in diverse forme, a seconda della polarità del campo e della configurazione geometrica dell'elettrodo.

Il dispositivo (Figura 2) consiste di un catodo a forma di filo, un anodo (il materiale trattato) e un generatore di corrente continua pulsata. Il plasma crea una corona di luce attorno al filo, per questo la scarica viene definita "a corona". Gli ioni positivi vengono accelerati verso il filo emettendo elettroni secondari che vengono accelerati verso il plasma: questo fronte ad alta energia di elettroni in movimento (circa 10 eV) seguito da una coda di elettroni ad energia più bassa (circa 1 eV) viene chiamato streamer (filamento). Le collisioni anelastiche tra gli elettroni altamente energetici e le particelle pesanti porta alla formazione di specie chimiche reattive.

Siccome in questa struttura il volume del plasma risulta essere molto ridotto, il principale inconveniente della corona in caso di trattamenti superficiali è costituito dalla piccola porzione trattabile di materiale. Per ovviare a questo problema, il filo che costituisce il catodo può essere sostituito con un elettrodo planare, disposto parallelamente alla superficie da trattare: in questo modo si generano streamers perpendicolari alle due superfici, nell'intercapedine. Tuttavia insorge un ulteriore problema: gli streamers infatti si accendono sempre negli stessi punti predefiniti del materiale, ossia nei punti di concentrazione delle cariche, causando un trattamento non omogeneo sulla superficie del materiale. Per risolvere questo inconveniente è stata sviluppata la scarica a barriera dielettrica.

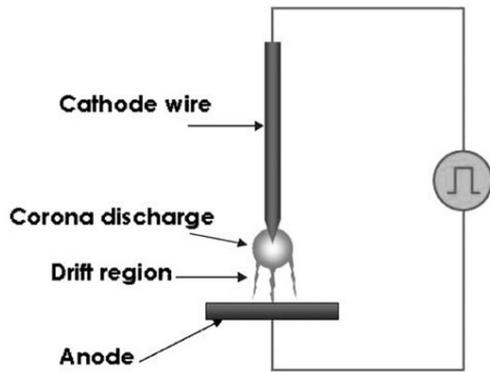


Figura 2. Principio di carica della corona [4]

2.1.2 Scarica di barriera dielettrica (DBD)

Il dispositivo DBD (vedi Fig. 3) è costituito da due elettrodi metallici piano-paralleli: almeno uno di questi elettrodi è coperto da uno strato dielettrico. Per garantire un funzionamento stabile del plasma, la distanza che separa gli elettrodi è limitata a pochi millimetri di larghezza. Il gas plasma scorre nel vuoto. La scarica viene accesa per mezzo di una fonte di alimentazione sinusoidale o pulsata. A seconda della composizione del gas di lavoro, della tensione e dell'eccitazione di frequenza, la scarica può essere filamentosa o incandescente [10].

Lo strato dielettrico svolge due ruoli importanti in quanto limita la corrente di carica ed evita la transizione dell'arco che consente di lavorare in modalità continua o pulsata e inoltre distribuisce in modo casuale streamer sulla superficie dell'elettrodo e garantisce un trattamento omogeneo. La creazione dello streamer è dovuta all'accumulo di elettroni sullo strato dielettrico.

Nel 1857, Siemens usò questo tipo di scarica per la generazione di ozono dall'aria o dall'ossigeno. Oggi, questi ozonizzatori a scarica silenziosa sono strumenti efficaci e un gran numero di impianti di ozono e vengono utilizzati in tutto il mondo per il trattamento delle acque.

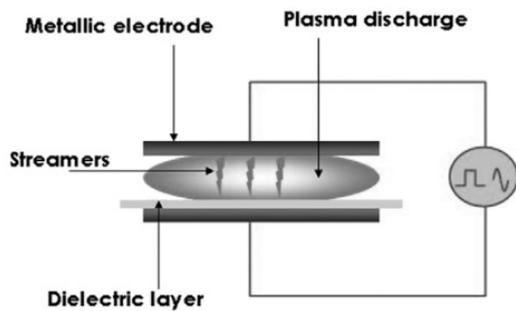


Figura 3. Principio di scarica della barriera dielettrica (figura: plasma diffuso in non equilibrio a pressione atmosferica [11]).

2.1.3 Plasmi indotti a microonde

I sistemi a microonde sono senza elettrodi e funzionano tutti secondo lo stesso principio. Le microonde sono guidate lungo il sistema e trasmettono energia agli elettroni del gas plasma. Si verificano collisioni elastiche tra elettroni e particelle pesanti. A causa della grande massa di particelle pesanti, gli elettroni collisi rimbalzano mentre le particelle pesanti rimangono statiche. Gli elettroni sono quindi accelerati (ottengono energia cinetica) e le particelle pesanti sono leggermente riscaldate. Dopo diverse collisioni elastiche (che seguono leggi probabilistiche), gli elettroni ottengono energia sufficiente per produrre collisioni anelastiche eccitanti o anche ionizzanti. Il gas è parzialmente ionizzato e diventa plasma che supporta la propagazione a microonde [4].

Le sorgenti di plasma a microonde sono tutte progettate secondo la stessa idea. Sono costituite da:

- una fonte di alimentazione a microonde (alimentatore, magnetron e circolatore per proteggere il magnetron dalla potenza riflessa);
- apparecchiature a microonde (guide d'onda, sistema di sintonizzazione);
- un sistema di accensione;
- iniezioni di gas.

Inoltre l'accensione a scarica è la chiave per le fonti di microonde. Infatti, un'autoaccensione della scarica garantisce condizioni di funzionamento flessibili e consente l'industrializzazione del processo. L'energia, trasmessa agli elettroni gassosi, deve essere abbastanza alta da innescare il plasma.

2.1.4 Scarica a radiofrequenza

L'apparecchiatura di scarica a radiofrequenza (RF) è costituita da un generatore RF, un ugello ceramico con un elettrodo di tensione RF e un sistema di alimentazione del gas. L'ugello è accoppiato con due elettrodi: un ago ed elettrodi ad anello a terra. La generazione di scarica al plasma avviene sulla punta di questo elettrodo e si estende verso l'esterno, verso il bersaglio, con l'aiuto di gas che scorre. L'intensità dei pennacchi plasmatici dipende dalla portata del gas e dalla potenza applicata [12]

Per quanto riguarda la potenza applicata, le sorgenti RF possono funzionare con un alimentatore ad alta o bassa potenza e questo influenza le proprietà del plasma e quindi le sue potenziali applicazioni.

Un'applicazione di nostro interesse riguarda il Getto di plasma a pressione atmosferica (APPJ):

L'APPJ [9] è una piccola torcia al plasma RF ($L < 20$ cm) che funziona a bassa potenza. È stato sviluppato da J.Y. Jeong (University of California, Los Angeles) in collaborazione con J. Park (Los Alamos National Laboratory).

Questo sistema (vedi Fig. 4) è costituito da due elettrodi concentrici attraverso i quali scorre il gas di lavoro. Applicando l'alimentazione RF all'elettrodo interno ad una tensione compresa tra 100 e 150 V, lo scarico del gas si accende. Il gas ionizzato esce attraverso un ugello poiché la velocità del gas è di circa 12 m s^{-1} . La bassa potenza iniettata consente alla torcia di produrre una scarica stabile ed evita la transizione dell'arco.

Un gruppo di ricerca (Park and coworkers, UCLA) ha progettato una versione rettangolare dell'APPJ. Questa sorgente produce una scarica volumetrica e omogenea in uno spazio largo 1,6 mm tra due elettrodi planari in alluminio. Entrambi gli elettrodi sono perforati per consentire al gas plasma di fluire attraverso di essi. L'elettrodo superiore è collegato all'alimentazione RF mentre l'elettrodo inferiore è collegato a terra. È stato recentemente applicato alla deposizione di silicio amorfo idrogenato con silano aggiunto a valle del plasma idrogeno-elio. Entrambe le fonti sono commercializzate.

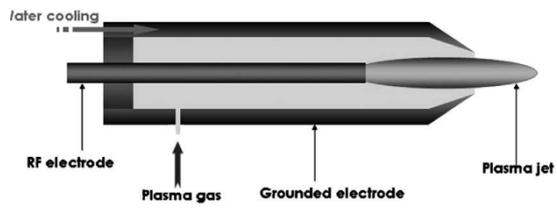


Figura 4. APPJ [4]

Capitolo 3

EFFETTI DEL PLASMA SUI COSTITUENTI E SULLE MICROSTRUTTURE ALIMENTARI

3.1 Effetto antimicrobico

Il metodo più utilizzato per l'inattivazione di microrganismi negli alimenti è l'utilizzo di calore, attraverso processi come la pastorizzazione o la sterilizzazione. Tuttavia, le alte temperature possono causare anche l'alterazione delle caratteristiche qualitative (colore, aroma e sapore) ma anche di quelle nutrizionali, a causa della perdita di composti bioattivi. Per questo motivo, un filone di ricerca molto importante nelle tecnologie alimentari, si è dedicato allo studio di tecnologie alternative per la sanificazione dei prodotti. Tali tecnologie, definite "non termiche", includono, per esempio, le alte pressioni idrostatiche, le radiazioni UV, i campi elettrici pulsati e il plasma freddo.

Nel 1960, per la prima volta, la proprietà di sterilizzazione del plasma è stata introdotta ed è stato riportato che la distruzione di 10^6 spore nella superficie interna delle fiale si è verificata in meno di un secondo, utilizzando plasma argon mediante plasma atmosferico pulsato in campo RF. Una serie di brevetti è stata depositata anche da Ashman e Menashi (1972), Boucher (1980) e Bithell (1982) che hanno riferito che le scariche elettriche, in particolare i gas, possono portare alla completa sterilizzazione.

Il primo lavoro con il plasma è stato realizzato attraverso l'uso di ossigeno, e la sua attività è stata definita letale in quanto interferisce con la materia biologica. Nelson e Berger (1989) hanno riferito che il plasma O_2 ha mostrato un'efficace azione biocida su *B. subtilis* e *Clostridium sporogenes* in quanto questi due batteri sono stati considerati i più resistenti. I plasmi generati a 200 W erano sufficienti a ridurre la popolazione di *B. subtilis* di più di 3,5 \log_{10} in 5 min. Da allora l'utilizzo del plasma per la sterilizzazione è stato commercializzato [1].

Il trattamento al plasma, può quindi inattivare efficacemente un'ampia gamma di microrganismi, tra cui spore e virus. Feichtinger (2003) ha riferito che la tecnologia del plasma freddo è preferito come fonte alternativa per il processo di sterilizzazione e disinfezione

superficiale che può agire sia sulle cellule vegetative che sulle spore con periodi di tempo più brevi.

Durante l'applicazione del plasma, i microrganismi sono esposti a un intenso bombardamento da parte dei radicali, che molto probabilmente promuovono lesioni superficiali che la cellula vivente non è in grado di riparare in modo sufficientemente veloce, questo processo viene definito "incisione".

Il plasma freddo può essere impiegato con successo per la distruzione microbica su prodotti freschi, per aumentare la durata di conservazione. Infatti in una recente indagine di Misra (2014) è stato riportato che la diminuzione della conta mesofila totale era del 12–85 %, il lievito e la conta delle muffe del 44– 95 % nelle fragole trattate con plasma freddo. Anche il latte crudo è stato trattato per la distruzione di *E. coli* usando plasma a bassa temperatura da Gurol (2012), ed è stata osservata una riduzione del 54% di *E.coli* dopo il trattamento di 3 min con plasma freddo.

I risultati sperimentali di diversi autori hanno suggerito che l'efficacia del plasma freddo su un particolare microrganismo dipende dalla superficie trattata. Ad esempio, la distruzione della *Listeria monocytogenes* era elevata nel formaggio affettato rispetto al prosciutto affettato [13].

3.2 Effetto di inibizione degli enzimi

Negli alimenti, sono naturalmente presenti diversi enzimi (polifenolossidasi, perossidasi, pectinesterasi, lipasi, amilasi ecc.), che possono essere indesiderati nel cibo, in quanto la loro attività può causare effetti negativi sulla qualità dei prodotti (come un imbrunimento superficiale o la perdita di sapori e vitamine) e portare, così, ad una riduzione della loro shelf-life. Esempi di tali attività includono la perossidasi (POD), il polifenolo ossidasi (PPO) e la tirosinasi. Questi enzimi sono appunto noti per causare perdite nutrizionali attraverso reazioni di doratura enzimatica (reazione chimica che coinvolge la polifenolo ossidasi (PPO), la catecol ossidasi e altri enzimi che creano melanine e benzochinone dai fenoli naturali) e formazione di off-flavor attraverso la decomposizione lipidica da parte delle lipasi [14]. Per questo motivo, l'effettiva inattivazione degli enzimi presenti negli alimenti risulta fondamentale al fine di preservarne la qualità.

Gli enzimi sono, per la maggior parte, proteine capaci di catalizzare alcune reazioni biologiche, interagendo con specifici substrati. La loro funzionalità è strettamente connessa

con la loro struttura, (in particolare con la loro conformazione tridimensionale); pertanto, l'inattivazione degli enzimi potrebbe essere ottenuta attraverso qualsiasi trattamento che influenzi tale struttura [14]. Così come per i microrganismi, il metodo più tradizionale per l'inattivazione enzimatica si basa sull'utilizzo del calore, che provoca la denaturazione delle proteine e la perdita della funzionalità enzimatica.

L'effetto del plasma sull'attività di vari enzimi di interesse alimentare è stato studiato in diverse matrici alimentari (principalmente di origine vegetale), mostrando come l'elevato potere ossidante delle specie reattive, che costituiscono il plasma, sia in grado di provocare alterazioni alla struttura enzimatica, causandone un'irreversibile perdita di funzionalità.

Sono state fatte diverse sperimentazioni, ad esempio nelle mele appena tagliate trattate con plasma DBD a bassa frequenza, dove il verificarsi di doratura enzimatica è diminuito drasticamente. L'attività residua di PPO è stata ridotta del 42%, con un corrispondente aumento del tempo di trattamento dopo 30 minuti. La ridotta attività è stata legata agli effetti chimici dei radicali OH e NO sulle strutture amminoacidiche [15].

Tale effetto ha quindi permesso di ridurre il fenomeno dell'imbrunimento enzimatico nelle mele, aumentando, così, la loro potenziale shelf-life. Tuttavia, mentre gli studi riguardanti l'inattivazione microbica sono numerosi e riguardano una vasta gamma di matrici, quelli relativi all'inattivazione enzimatica sono ancora limitati. Sembra, infatti, che, in alcuni casi, l'esposizione al plasma possa provocare un aumento dell'attività di alcuni enzimi, producendo ricadute positive, per esempio, sulla germinazione dei semi [14]. Pertanto, è sicuramente necessaria una maggior comprensione dei vari meccanismi coinvolti e dell'effetto della matrice alimentare.

3.3 Effetti su muffe e micotossine

Le micotossine sono sostanze tossiche prodotte da funghi e muffe e possono dar vita a fenomeni di tossicità acuta e cronica. In caso di cattiva conservazione, alimenti quali i cereali e la frutta secca sono soggetti a contaminazione da parte di muffe (dei generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*), che possono portare all'accumulo di micotossine. Tale contaminazione rappresenta una minaccia significativa e crescente per la salute umana e un onere enorme per l'economia globale.

I metodi di decontaminazione, utilizzati per affrontare questo problema, si basano su principi fisici, chimici e biologici. Nonostante i continui miglioramenti, questi metodi possono ancora risultare inefficienti nella rimozione delle micotossine, dannosi per l'ambiente ed economicamente sfavorevoli. Senza dubbio, l'industria alimentare cerca costantemente approcci più efficaci di decontaminazione dalle micotossine. Dal punto di vista della sicurezza, il plasma freddo è considerato una tecnologia promettente per l'inattivazione delle muffe e la riduzione della contaminazione da micotossine in diversi prodotti secchi.

A livello sperimentale, è stato dimostrato come il plasma freddo sia in grado di inibire la crescita, in maniera efficiente, delle muffe presenti sulla superficie degli alimenti e distruggere le micotossine prodotte da questi organismi. Diversamente da molte tecniche tradizionali di decontaminazione degli alimenti, i metodi basati sull'utilizzo del plasma freddo sono generalmente meno costosi ed ecologicamente più vantaggiosi [16].

Gli studi, relativi all'effetto del plasma freddo su muffe e micotossine, sono stati condotti su diverse matrici alimentari (come cereali, frutta secca e pesce essiccato) e hanno permesso di individuare alcuni dei meccanismi responsabili dell'inattivazione. L'efficacia del trattamento sembra dipendere dalle specie fungine, dal carico microbico, dalla composizione degli alimenti e dalle caratteristiche della superficie trattata. Tuttavia, sono state svolte ancora troppe poche ricerche. Pertanto, per comprendere meglio le complesse reazioni dei funghi al plasma freddo, sono necessari studi su attività antifungine con ceppi e specie più varie, nonché ricerche più approfondite sul comportamento dei funghi in seguito all'uso di questa tecnologia di decontaminazione.

3.4 Effetti sull'Amido

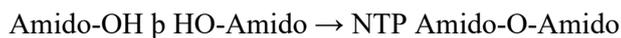
L'amido, essendo di natura semicristallina, è un carboidrato e comprende due polisaccaridi, l'amilosio e l'amilopectina [17]. L'amilosio è una molecola lineare composta da unità di anidroglicosio che sono interconnesse attraverso legami α 1,4 glicosidici con poche ramificazioni. L'altro componente, l'amilopectina, è un polimero ramificato più grande con collegamenti di anidroglicosio α -1,4 e α -1,6 glicosidici che fungono da punti di ramificazione [18].

L'amido nativo è un ingrediente importante in molti prodotti alimentari. La maggior parte dell'amido deriva dal mais, seguito da grano, patate, banana, amaranto e riso [19]. Queste materie prime subiscono diverse operazioni di lavorazione come fresatura, stoccaggio e cottura

prima del consumo. Di conseguenza, i granuli di amido sono soggetti a cambiamenti e modificazioni come la gelatinizzazione e la retrogradazione [20]. Questi cambiamenti sono peculiari di ogni particolare prodotto amidaceo e, in quanto tali, ne ostacolano l'applicabilità nelle industrie alimentari. Pertanto, è necessario un miglioramento funzionale con vari metodi tra cui mezzi fisici e chimici.

Il trattamento NTP, d'altra parte, modifica allo stesso modo alcune proprietà di questi amidi. Sono state riportate diverse modifiche dell'amido NTP, che vanno dall'alterazione delle proprietà reologiche ai cambiamenti nella morfologia superficiale e all'aggiunta di gruppi funzionali.

Le modifiche strutturali dell'amido possono migliorare i loro valori funzionali e diversificare la loro importanza nelle applicazioni alimentari e in altre industrie di trasformazione come la carta, il tessile e l'industria chimica. La modifica dell'amido è attribuita al cross-linking, probabilmente attraverso il seguente meccanismo [21]:



I cambiamenti chimici indotti dall'NTP nell'amido includono il cross-linking, la depolimerizzazione e la formazione e l'aggiunta di nuovi gruppi funzionali.

Ad esempio è stato condotto uno studio sugli effetti del plasma di ossigeno sulle caratteristiche molecolari e sui relativi meccanismi della fecola di mais e di patate. La fecola di patate sembrava essere più soggetta alla degradazione NTP rispetto alla fecola di mais e questo effetto era collegato a più acqua intrappolata nelle molecole di fecola di patate [22]. Inoltre ha sostenuto che le molecole più grandi hanno una maggiore tendenza ad essere degradate dall'NTP rispetto a quelle più piccole.

Il trattamento plasmatico può essere anche utilizzato per ridurre l'elevazione capillare mediante disagglomerazione dei granuli di amido, in quanto nei campioni non trattati è stata osservata agglomerazione di granuli di amido, mentre nei campioni trattati i granuli di amido sono stati separati attribuendo una diminuzione dell'elevazione capillare.

3.5 Effetti sui Lipidi

I lipidi sono grassi che si trovano principalmente negli alimenti a base animale e vegetale.

L'ossidazione lipidica è un fenomeno chimico che causa un enorme impatto sulle caratteristiche sensoriali degli alimenti.

Joshi (2011) ha dichiarato che il ROS, generato a causa dell'esposizione al plasma, produce stress ossidativo, che fa sì che le frazioni di membrana subiscano la perossidazione lipidica in *Escherichia coli* in proporzione alla quantità di energia plasmatica applicata. Inoltre, nell'ossidazione lipidica innescata dal plasma, le reazioni sono azionate da radicali OH, specie simili a perossidi di idrogeno e spazzini ROS come l'α-tocoferolo, o con specie di ossigeno non radicali e radicali (come $1 O_2$, O_3 , H_2O_2 , $ROOH$, $O-2$, OH , RO , ROO), come nel caso di una tecnica di ossidazione non plasmatica la cui azione su parti della membrana cellulare provoca la modifica e la disintegrazione degli acidi grassi insaturi nei perossidi lipidici.

Un numero considerevole di articoli ha riportato ossidazione lipidica in campioni trattati con NTP calcolati mediante misurazione di 2 sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARS; individuazione della malondialdeide, MDA), o misurazione dei valori di perossido che si concentra sulla formazione di perossido di idrogeno. Tutti questi sono formati come prodotti di ossidazione primaria.

Al contrario, la misurazione del valore della para-anisidina; 2-propenale, 2-pentenale ed eptanale; spazio della testa n-esanale; aldeidi; e 2-pentilofurano si formano come prodotti di ossidazione volatile secondaria che significa ossidazione lipidica. La misurazione di quest'ultimo è un approccio più realistico [2].

Nel trattamento al plasma DBD incapsulato del latte a 5 e 10 minuti, il TBARS è leggermente aumentato nel latte trattato dopo un'esposizione di 10 minuti, che non ha causato un notevole deterioramento. Questo era collegato al plasma RS come l'ozono, che può accelerare la formazione di perossido durante l'ossidazione lipidica [23].

Oltre alle apprezzabili riduzioni di *E. coli* ottenute a 5 e 10 minuti di esposizione, i valori TBARS dei campioni trattati con plasma He + O₂ erano più elevati rispetto ad altri campioni, il che è un'indicazione di ossidazione lipidica. Questi aumenti osservati sono stati attribuiti ai radicali liberi, che sono i precursori degli idroperossidi lipidici prodotti a seguito del trattamento al plasma. Analogamente, campioni di pancetta esposti al plasma elio/ossigeno hanno mostrato valori TBARS più elevati dopo 7 giorni di conservazione rispetto ai campioni non trattati. Questo risultato è probabilmente dovuto alle variazioni nella miscela di gas utilizzato, che erano legate a diversi contenuti di grassi e composizione di acidi grassi all'interno di campioni acquistati da varie fonti di mercato [24].

Anche l'olio di soia è stato sottoposto a plasma freddo atmosferico ad alta tensione per 12 ore, utilizzando idrogeno e azoto come gas di processo per produrre olio di soia parzialmente

idrogenato privo di acidi grassi trans. L'aumento degli acidi grassi saturi e degli acidi grassi monoinsaturi è stato rispettivamente del 12 e del 4,6%. Una diminuzione degli acidi grassi polinsaturi del 16,2% è stata registrata dopo il trattamento al plasma. La spettroscopia a emissione ottica mostra che le specie atomiche di idrogeno erano probabilmente responsabili dell'idrogenazione indotta dal plasma. L'assenza di acidi grassi trans nel prodotto finale è stata attribuita alle specie atomiche di idrogeno che si attaccano agli acidi grassi insaturi, cambiando così la struttura chimica dell'olio di soia convertendo i legami C=C in legami singoli [25].

Capitolo 4

MATERIALI E METODI

4.1 Materia prima

Per questa prova sperimentale eseguita presso il laboratorio dell'Università Politecnica delle Marche sono stati utilizzati dei filetti di *Sardina pilchardus* pescati nell'Adriatico.

In laboratorio sono stati eviscerati, decapitati, tagliati a metà e passati sotto getto d'acqua, per circa 30 secondi, e successivamente tamponati con della carta assorbente.

Dopo di che, sono stati pesati e divisi equamente 50g di campione, per ogni beuta (in totale 6 beute), di cui 3 sono stati trattati per immersione in PAW, per 3 tempi di trattamento diversi: 10, 20 e 30 minuti (campioni P10, P20, P30) in rapporto solido-liquido 1:3 mantenendoli in agitazione. Gli altri 3 sono invece stati immersi in acqua distillata, utilizzata come controllo, sempre per 3 tempi diversi: 10, 20 e 30 minuti (campioni C10, C20, C30).

Successivamente al trattamento i campioni sono stati asciugati con della carta assorbente, posti in sacchetti di plastica e stoccati ad una temperatura di -20°C per la successiva estrazione a freddo della frazione grasso.

Per ogni tempo di trattamento sono state eseguite due repliche indipendenti.

Inoltre, due campioni di filetti freschi sono stati congelati tal quali (campioni TQa e TQb).

Codice campione	Descrizione
TQ a	Filetti non trattati
TQ b	Filetti non trattati
C10.1	Filetti trattati con acqua distillata
P 10.1	Filetti trattati con PAW
C 20.1	Filetti trattati con acqua distillata
P 20.1	Filetti trattati con PAW
C 30.1	Filetti trattati con acqua distillata
P 30.1	Filetti trattati con PAW

C 10.2	Filetti trattati con acqua distillata
P 10.2	Filetti trattati con PAW
C 20.2	Filetti trattati con acqua distillata
P 20.2	Filetti trattati con PAW
C 30.2	Filetti trattati con acqua distillata
P 30.2	Filetti trattati con PAW

Tabella 2. Elenco dei campioni.

4.2 Trattamento con plasma freddo

Il plasma freddo può essere utilizzato anche per creare acqua attiva al plasma (PAW). È possibile creare PAW tramite esposizione diretta con scarica di plasma generata direttamente in acqua, o tramite metodo indiretto, dove il plasma viene generato nell'aria e i ROS formati vengono trasferiti nell'acqua. Quest'ultimo è considerato più efficace in termini di efficienza energetica.

Il trattamento indiretto al plasma dell'acqua provoca la formazione di vari ROS nell'acqua, principalmente H₂O₂ e specie reattive all'azoto, come NO₂⁻ e NO₃⁻, nonché ioni metallici, che forniscono azione antimicrobica grazie all'effetto sinergico di ossidazione indotta e calo significativo del pH (sotto 3), parametro molto importante per la decontaminazione, in quanto l'efficienza del trattamento scende rapidamente con l'aumento del pH della PAW anche in presenza di ROS e ioni metallici. [26].

La PAW è stata ottenuta con una sorgente di tipo —Microsecond pulsed coronal, ottimizzata, per dare origine alla maggior produzione possibile di specie reattive, mantenendo però una temperatura sempre inferiore a 40°C. Nella tabella seguente vengono riportate le caratteristiche della sorgente e della PAW prodotta. (Tabella 3)

Elettrodi	Lamine di alluminio
Volume del liquido	500 ml
Frequenza di ripetizione dell'impulso	5 kHz
Tempo di trattamento	1 min
Picco di voltaggio	18 kV
RPM	700

pH	3,9
Nitriti	40-80 mg/l
Perossido di idrogeno	3-10 mg/l

Tabella 3. Caratteristiche della sorgente e della PAW prodotta

Come possiamo vedere dalla tabella 3, gli elettrodi utilizzati per la produzione di plasma, sono lamine di alluminio e il volume di acqua trattato è di 500 ml. Per la produzione di PAW il trattamento ha la durata di 1 min e viene utilizzata una scarica di 18 kV, con una frequenza di ripetizione dell'impulso di 5 kHz. La PAW ottenuta da questo trattamento presenta un contenuto di nitriti di 40-80 mg/l, un contenuto di perossido di idrogeno di 3-10 mg/l e infine presenta un valore di pH di 3,9.

4.3 Estrazione a freddo cloroformio metanolo della frazione grassa

Per l'estrazione della frazione grassa è stato utilizzato il metodo di estrazione a freddo cloroformio-metanolo applicato a 50 gr di filetti di sardina.

Il campione congelato è stato inizialmente tagliato finemente, per una migliore l'omogenizzazione, posto in un beaker, in cui sono stati aggiunti 50 ml di cloroformio e 100 ml di metanolo, ed infine omogenizzato tramite l'Ultra-turrax.

A questo punto il campione omogenizzato è stato filtrato, tramite filtro di carta(2.5-3 μ m).

Il residuo è stato nuovamente omogenizzato con aggiunta di 50 ml di cloroformio e rifiltrato al fine di estrarre il maggior quantitativo di olio presente.

In fine la miscela ottenuta, tramite l'estrazione, è stata posta all'interno dell'imbuto separatore con aggiunta della soluzione KCl a 0,88%, agitato e lasciato a riposo per circa 24 ore.

Successivamente è stata recuperata la parte inferiore presente nell'imbuto separatore, e portata a secco tramite Rotavapor, per ottenimento dell'olio.



Figura 5. Rotavapor

[\[https://www.fishersci.it/it/it/home.html\]](https://www.fishersci.it/it/it/home.html)



Figura 6. Ultra-turrax

[\[https://www.fishersci.it/it/it/home.html\]](https://www.fishersci.it/it/it/home.html)

4.4 Determinazione acidi grassi

Gli acidi grassi presenti nell'olio, per poter essere analizzati per via gascromatografica, vengono trasformati, attraverso transesterificazione diretta mediante catalizzazione acida dei lipidi estratti, nei rispettivi esteri metilici, che presentano una maggiore volatilità ed una minore polarità rispetto ai corrispondenti acidi liberi. La determinazione analitica degli esteri metilici degli acidi grassi permette di ricavare la percentuale di singoli componenti chimici presenti in un olio.

L'analisi degli acidi grassi è stata effettuata mediante TRACE 1300 *Gas Chromatograph* (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti) equipaggiato con una colonna TG-POLAR le cui caratteristiche sono riportate in Tabella 3.

La temperatura del forno è stata impostata a 150° C x 1 minuto ed aumentata di 3° C/min, fino alla temperatura finale di 240° C, che è stata mantenuta per 5 minuti.

Le temperature dell'iniettore e del rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) sono state impostate a 250° C.

La rampa di temperatura è riassunta in Tabella 4.

L'identificazione dei picchi cromatografici è stata effettuata per confronto con i tempi di ritenzione di una miscela standard di 37 FAME.

La composizione degli acidi grassi (% in peso dei singoli FA) è stata calcolata tramite il metodo della normalizzazione delle aree.

Parametro	Descrizione
Fase stazionaria	TG-POLAR
Lunghezza colonna	60 m
I.D.	0,25 mm
Spessore fase stazionaria	0,2 µm
Temperatura massima	260/275° C
Gas carrier	N ₂
Temperatura rivelatore	250° C
Temperatura iniettore	250° C

Tabella 4. Caratteristiche della colonna cromatografica.

N°	T di ritenzione (min)	Salto (° C/min)	Valore target (° C)	Mantenimento temperatura (min)
1	0,000	Corsa		
2	1,000	0,00	150,0	1,00
3	36,000	3,00	240,0	5,00
4		Nuova riga		
5	36,000	Fine corsa		

Tabella 5. Rampa di temperatura gascromatografo.



Figura 7. Gascromatografo

[<https://strumentazioni.unicam.it>]

4.5 Determinazione dieni e trieni

La prova consiste in misure di estinzione alle lunghezze d'onda prescritte sul campione in esame, sciolto in opportuno solvente, con riferimento allo stesso solvente puro.

L'impiego della regione UV dello spettro elettromagnetico (10-400 nm) a scopi analitici è normalmente ristretto all'intervallo 200-400 nm (vicino UV) in conseguenza di una serie di limitazioni strumentali.

Nella zona "utile" della regione UV gli oli e i grassi danno luogo a:

- *Assorbimento non selettivo*, osservato come "coda" di banda molto intensa con massimo al disotto di 200nm; è dovuto alla presenza di doppi legami isolati C=C ma anche C=O (estere, carbossile); acidi grassi saturi e insaturi normalmente presenti nelle sostanze grasse alimentari, e relativi trigliceridi, non presentano bande di assorbimento tipiche capaci di una qualche differenziazione;
- *Assorbimento specifico*, correlabile a caratteristiche strutturali proprie di elementi di neoformazione; è dovuto alla presenza di sistemi polienici coniugati nelle catene idrocarburiche degli acidi grassi, anche con eteroatomi (carbonili).

La presenza di cromofori C=C-C=C (λ_{\max} 230-232 nm) è conseguente alla formazione di idroperossidi nelle prime fasi del processo ossidativo di acidi grassi polinsaturi. Sistemi trienici coniugati hanno origine nella fase di decolorazione con terre e deodorazione:

mostrano una caratteristica tripla banda con picco principale in prossimità di 268-270 nm e minimi adiacenti a circa 262 e 274 nm. L'evoluzione degli idroperossidi può produrre carbonili coniugati a doppi legami C=C che danno luogo ad assorbimenti nelle regioni dienica e trienica.

La prova si esegue su oli perfettamente omogenei ed esenti da impurezze sospese quindi limpidi. Se necessario si filtra su carta a temperatura ambiente. la concentrazione delle soluzioni deve essere tale da fornire letture di assorbanza tra 0,2 e 0,8 AU, come da buona prassi per le misure spettrofotometriche in assorbimento.

Sono stati pesati 100 mg di olio di sardine in un pallone da 10 mL e portati a volume con l'iso-ottano (2,2,4-trimetilpentano) spettrofotometricamente puro.

Dopo di che è stato azzerato lo spettrofotometro con il solvente e successivamente sono state misurate le assorbanze della soluzione a 5 diverse lunghezze d'onda: 232 nm; 266 nm; 270 nm; 274 nm; 315 nm.



Figura 8. Spettrofotometro

[<https://it.wikipedia.org/wiki/Spettrofotometria>]

Capitolo 5

RISULTATI E DISCUSSIONE

Lo scopo dell'esperimento è stato quello di valutare, attraverso analisi sperimentali, l'entità del grado di ossidazione lipidica, attraverso la valutazione qualitativa e quantitativa di dieni, trieni e acidi grassi

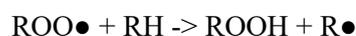
5.1 Ossidazione lipidica

I grassi vengono spesso utilizzati in preparazioni ad alte temperature, sia in ambito industriale che domestico. E' noto però che in tali condizioni (temperature di 160-180 °C) possono andare incontro al processo di ossidazione da parte dell'ossigeno che determina la formazione di molte specie ossidate, tra le quali le primarie sono i perossidi dai quali derivano aldeidi, chetoni e acidi responsabili del caratteristico odore di fritto e, specialmente questi ultimi, dell'odore rancido dei grassi invecchiati.

Dal punto di vista chimico questa reazione è un'ossidazione delle molecole di AG (acidi grassi) ad opera di specie reattive dell'ossigeno (ROS) radicaliche e non. Questa ossidazione porta alla formazione di radicali liberi innescando così una reazione a catena dei restanti AG ancora non ossidati (è una reazione auto catalitica).

Il più importante tra i processi coinvolti nel deterioramento ossidativo dei lipidi (irrancidimento) è appunto l'autossidazione degli acidi grassi. Tale processo può avvenire anche a temperatura ambiente e procede con una velocità direttamente proporzionale al grado d'insaturazione; inoltre è accelerato dalle alte temperature.

L'autossidazione è una reazione radicalica a catena e può essere divisa in tre processi distinti:



Terminazione: $\text{ROO}\bullet + \text{ROO}\bullet \rightarrow$

$\text{ROO}\bullet + \text{R}\bullet \rightarrow$ prodotti non radicalici

$\text{R}\bullet + \text{R}\bullet \rightarrow$

Durante la fase iniziale si forma un radicale R per rimozione di un atomo di idrogeno dalla catena di un acido grasso (R H).

Una volta formatosi, il radicale R reagisce rapidamente con l'ossigeno (che possiede due elettroni spaiati ed è quindi un diradicale in stato di tripletto) per formare il radicale perossilico ROO che a sua volta reagisce con un acido grasso RH per dare un idroperossido ROOH e un altro radicale R: tale passaggio è quello che determina la velocità (rate determining step).

Le reazioni terminano quando due specie radicaliche reagiscono tra loro per formare specie stabili. Tra le varie reazioni di terminazione, solamente la prima è significativa a pressione di ossigeno atmosferica.

Il processo di terminazione può avvenire anche quando tali specie radicaliche reagiscono con sostanze antiossidanti eventualmente presenti (come tocoferoli e polifenoli, vitamina E).

I principali prodotti dell'ossidazione lipidica sono gli idroperossidi lipidici ROOH, mentre tra i prodotti secondari vi sono numerose aldeidi, chetoni, alcoli, esteri, acidi, epossidi, idrocarburi e furani. La maggior parte dei prodotti secondari dell'ossidazione lipidica sono composti volatili.

5.2 Dieni e trieni

I dieni sono polieni contenenti due doppi legami carbonio-carbonio che hanno formula chimica generale $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}$.

Possono essere classificati come in seguito riportato:

- Cumulati, se si trovano in immediata successione. Es. $\text{C}=\text{C}=\text{C}$
- Coniugati, quando sono separati da un legame singolo. Es. $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$
- Isolati, se sono separati da due o più legami singoli. Es. $\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{C}=\text{C}$

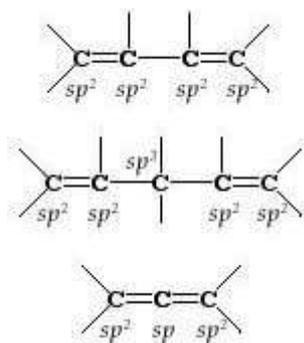


Figura 9. Dall'alto verso il basso: diene coniugato, diene isolato, diene cumulato.

[<https://www.chimica-online.it/organica/dieni.htm>]

Le strutture che hanno due doppi legami carbonio-carbonio cumulati vengono definite alleni, dal nome dell'idrocarburo più semplice della serie (allene).

Le proprietà chimiche dei dieni possono essere molto differenti a seconda che i doppi legami siano cumulati, coniugati o isolati.

I trieni sono polieni contenenti tre doppi legami carbonio-carbonio.

La formazione di alti contenuti di dieni coniugati, quelli maggiormente presi in considerazione, può essere correlata alla presenza di contenuti più elevati di acidi grassi polinsaturi. I dieni coniugati sono i prodotti dell'ossidazione primaria, mentre i trieni coniugati possono essere prodotti per disidratazione di dieni idroperossidi coniugati. [27] In tabella 6 sono riportati i valori medi dei dieni e trieni per i diversi campioni di sardina trattati e non al plasma alle differenti lunghezze d'onda.

λ	TQ	C10	C20	C30	P10	P20	P30
232	9,52±0,14	9,57±1,51	9,93±0,57	12,69±1,97	0,99±0,02	0,77±0,06	1,56±0,70
266	0,49±0,24	0,88±0,13	0,68±0,09	1,03±1,04	4,58±0,03	3,06±2,94	9,69±5,22
270	0,48±0,24	0,87±0,13	0,67±0,08	1,01±3,07	4,54±0,02	3,00±2,91	9,53±3,68
274	0,46±0,23	0,84±0,13	0,64±0,08	0,98±1,09	4,48±0,01	2,95±2,89	9,39±3,59
315	0,10±0,06	0,19±0,02	0,13±0,01	0,24±0,04	1,09±1,09	1,01±1,25	2,56±0,97

Tabella 6. Dieni e trieni coniugati dei diversi campioni di sardina non trattati, trattati con la PAW e Tal Quale, alle diverse lunghezze d'onda: 232 nm, 266 nm, 270 nm, 274 nm, 315 nm.

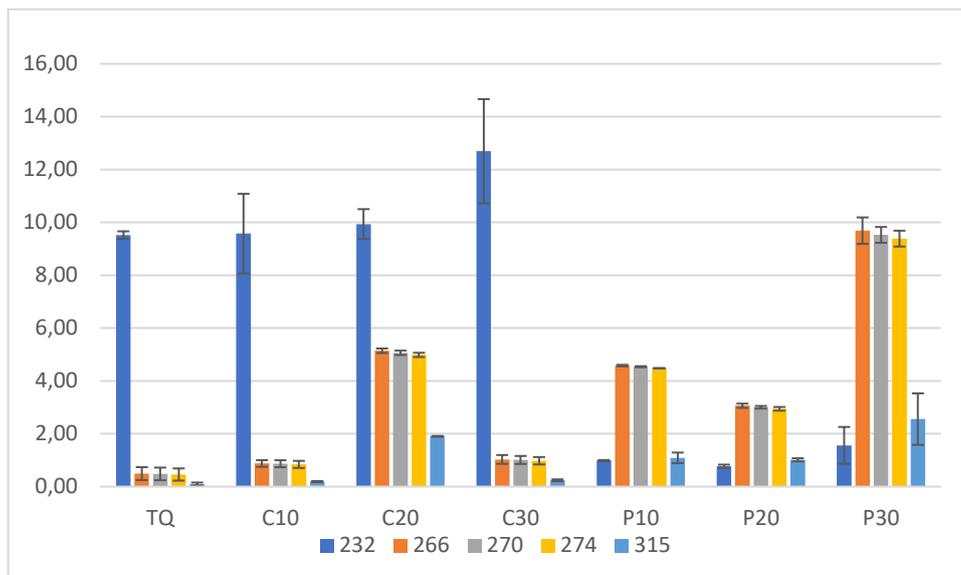


Figura 10. Dieni e trieni coniugati presenti nei diversi campioni di filetti di sardine, alle differenti lunghezze d'onda.

Dal grafico è possibile notare l'andamento dei dieni e trieni, alle diverse lunghezze d'onda prese in considerazione, nei campioni trattati con PAW (P10; P20; P30), rispetto ai controlli (C10; C20; C30) ed al campione tal quale (TQ).

È possibile riscontrare i dieni coniugati alla lunghezza d'onda a 232 nm, mentre i trieni presentano il picco principale in prossimità di 268-270 nm e minimi adiacenti a circa 262 e 274 nm.

Dal grafico è possibile riscontrare elevate quantità di dieni coniugati nel campione tal quale e nei campioni di controllo, in particolare nel campione immerso per 30 minuti.

Mentre nei campioni trattati con la PAW troviamo piccole concentrazioni di dieni coniugati che diminuiscono drasticamente, al contrario vediamo un aumento di trieni coniugati, in particolar modo per i filetti di sardina immersi in PAW per 30 minuti.

Inoltre è possibile osservare che il campione di controllo C20 presenta sia elevate quantità di dieni che di trieni coniugati.

I trieni alla lunghezza d'onda a 315 nm si riscontrano principalmente nel controllo a 20 minuti e nel prodotto trattato con la PAW a 30 minuti.

Per quanto riguarda i trieni, anche se presenti in maggiore quantità nei campioni trattati con la PAW ed immersi per 10 e 30 minuti in essa.

5.3 Acidi grassi

Gli acidi grassi, componenti fondamentali dei lipidi, sono molecole costituite da una catena di atomi di carbonio, denominata catena alifatica, con un solo gruppo carbossilico (-COOH) ad una estremità.

La catena alifatica che li costituisce è tendenzialmente lineare e solo in rari casi si presenta in forma ramificata o ciclica. La lunghezza di questa catena è estremamente importante, in quanto influenza le caratteristiche fisico-chimiche dell'acido grasso. Quindi potremmo classificarli, a seconda della lunghezza della catena carboniosa, in: acidi grassi a catena corta e acidi grassi a catena media e lunga.

Gli acidi grassi possiedono generalmente un numero pari di atomi di carbonio e possono presentare anche uno o più doppi legami nella catena alifatica. La presenza o meno di doppi legami fa variare la temperatura di fusione degli acidi grassi stessi che potremmo perciò classificare in:

- Acidi grassi saturi quando la loro struttura chimica non contiene doppi legami. (es: acido caprilico C8:0, acido palmitico C16:0, acido stearico C18:0)
- Acidi grassi insaturi quando sono presenti uno o più doppi legami: monoinsaturi (MUFA) se ne è presente uno e polinsaturi (PUFA) se ne sono presenti più di uno. (es: acido oleico C18:1, acido linoleico C18:2, acido linolenico C18:3, acido arachidonico C20:4)

I maggiori acidi grassi presenti nel pesce, quindi anche nelle sardine oggetto del presente studio, sono gli acidi grassi polinsaturi (PUFA). Gli acidi grassi polinsaturi sono molecole la cui struttura, che viene chiamata "catena", è basata su atomi di carbonio ed è caratterizzata dalla presenza di 2 o più doppi legami, ciascuno tra due atomi di carbonio adiacenti.

I PUFA sono importanti per la salute delle membrane cellulari di tutto l'organismo, le quali permettono la comunicazione con l'esterno e lo scambio di sostanze ai fini metabolici.

Un'altra importante funzione dei PUFA riguarda il loro ruolo come precursori degli eicosanoidi, una famiglia di mediatori chimici che agiscono assieme modulando le risposte del nostro organismo e regolando in particolare i meccanismi dell'infiammazione.

Possiamo subito fare una prima distinzione tra **omega3** e **omega6**, che consiste nella numerazione degli atomi di carbonio lungo la catena che forma la loro molecola. I due tipi di PUFA a loro volta possono contenere un numero variabile di doppi legami e possono avere una catena più o meno lunga.

Tra gli omega3, i più noti, che riscontriamo anche nel pesce, sono: EPA (acido timnodonico), DPA (acido clupanodonico) e DHA (acido cervonico), che differiscono tra loro appunto per le caratteristiche suddette: lunghezza della catena di atomi di carbonio e numero di doppi legami. Questi sono gli acidi grassi "in forma matura", vale a dire il risultato della "trasformazione".

Oltre a questi vediamo molti altri acidi grassi polinsaturi nei campioni di sardine prese in esame, che troviamo riportati in Tabella 7, con i relativi valori quantificati a seguito dell'analisi gascromatografica.

Sarde	TQ	C10	P10	C20	P20	C30	P30
C10:0	0,06±0,014	0,04±0,014	0,045±0,007	0,05±0,01	0,035±0,007	0,06±0,028	0,025±0,007
C12:0	0,11±0,014	0,225±0,035	0,115±0,035	0,315±0,233	0,15±0,042	0,315±0,106	0,15±0,042
C13:0	0,06±0,01	0,055±0,007	0,06±0,01	0,055±0,007	0,06±0,014	0,065±0,007	0,065±0,007
C14:0	7,04±0,085	7,15±0,580	8,54±0,255	7,455±0,488	7,43±1,315	7,395±0,247	7,735±0,177
iso-C15:0	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,05±0,057	0,03±0,028	0,02±0,014	0,025±0,021
anteiso-C15:0	0,05±0,01	0,05±0,014	0,035±0,007	0,04±0,01	0,03±0,014	0,03±0,01	0,03±0,01
C14:1Δ9	0,145±0,007	0,13±0,01	0,14±0,014	0,14±0,01	0,135±0,035	0,15±0,01	0,15±0,014
C15:0	0,815±0,007	0,785±0,007	0,82±0,085	0,81±0,01	0,805±0,233	0,875±0,064	0,865±0,035
C15:1 Δ10	0,01±0,01	0,01±0,01	0,015±0,007	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01
C16:0	20,575±0,460	20,195±1,308	20,36±0,665	20,615±0,445	21,86±0,750	20,595±0,332	22,05±0,537
iso-C17:0	0,74±0,014	0,73±0,01	0,68±0,014	0,73±0,028	0,805±0,148	0,795±0,021	0,825±0,007
anteiso-C17:0	0,265±0,007	0,255±0,021	0,225±0,021	0,28±0,014	0,285±0,007	0,26±0,01	0,275±0,007
C16:1	6,815±0,205	6,695±0,742	9,4±1,075	7,095±0,714	6,235±0,955	6,22±0,679	6,615±0,997
C17:0	0,97±0,028	0,95±0,042	0,91±0,01	0,95±0,01	0,99±0,141	1,005±0,049	1,045±0,078
C17:1 Δ10	0,47±0,014	0,47±0,071	0,385±0,049	0,4±0,028	0,4±0,014	0,415±0,035	0,44±0,014
C18:0	3,94±0,297	3,965±0,233	3,835±0,163	3,9±0,071	4,175±0,643	4±0,028	4,37±0,156
C18:1 Δ9c	7,36±1,075	6,04±1,669	4,905±0,714	7,02±0,057	7,93±2,673	6,33±0,057	6,135±0,417
vaccenico	2,3±0,014	2,255±0,177	2,45±0,127	2,405±0,007	2,245±0,092	2,31±0,226	2,385±0,191
C18:2 n-6	1,9±0,057	1,98±0,226	1,825±0,007	1,77±0,014	1,77±0,325	1,83±0,014	1,875±0,078
gamma-18:3	0,175±0,007	0,18±0,028	0,225±0,021	0,17±0,014	0,155±0,021	0,16±0,042	0,165±0,021
C20:0	1,645±0,035	1,565±0,587	1,68±0,877	1,455±0,078	1,23±0,042	1,245±0,247	1,29±0,071
alpha-18:3	1,475±0,106	1,745±0,064	1,23±0,283	1,64±0,156	1,575±0,502	1,685±0,007	1,8±0,156
C20:1 Δ11	0,895±0,064	0,685±0,163	0,54±0,057	0,95±0,113	1,03±0,509	0,71±0,099	0,71±0,014
C21:0	0,05±0,01	0,045±0,007	0,045±0,007	0,055±0,007	0,05±0,014	0,075±0,007	0,05±0,01
C20:2 Δ11,14	0,34±0,014	0,365±0,007	0,31±0,01	0,345±0,021	0,345±0,021	0,39±0,014	0,34±0,014
C20:3 n-6	0,11±0,01	0,105±0,007	0,14±0,01	0,11±0,01	0,1±0,014	0,11±0,014	0,1±0,014

C22:0	0,9±0,028	0,905±0,049	0,985±0,064	0,92±0,028	0,84±0,042	1,02±0,028	0,95±0,014
C20:3 n-3+C20:4n6	0,14±0,014	0,11±0,014	0,115±0,007	0,125±0,007	0,15±0,042	0,14±0,014	0,135±0,021
C22:1 Δ13	0,105±0,007	0,08±0,014	0,08±0,01	0,125±0,007	0,115±0,049	0,11±0,028	0,09±0,014
C22:1 Δ11	1,055±0,049	0,975±0,007	0,86±0,057	0,99±0,085	5,015±5,749	0,965±0,007	1,005±0,007
C20:5 n-3	10,335±0,205	10,69±0,665	11,01±0,198	10,23±0,085	5,17±7,269	10,04±0,028	10,06±0,028
C23:0	0,035±0,007	0,025±0,007	0,035±0,007	0,03±0,01	0,03±0,01	0,04±0,014	0,03±0,01
C22:2 Δ13,16	0,025±0,007	0,03±0,01	0,025±0,007	0,03±0,01	0,3±0,382	0,035±0,007	0,025±0,007
C24:0	0,6±0,014	0,605±0,049	0,65±0,014	0,63±0,014	1,065±0,686	0,65±0,014	0,605±0,007
C24:1 Δ15	1,465±0,021	1,365±0,049	1,35±0,106	1,415±0,106	1,365±0,177	1,53±0,071	1,415±0,049
C22:5n3	1,365±0,092	1,37±0,382	1,445±0,120	1,535±0,120	0,63±0,750	1,34±0,170	1,225±0,064
C22:6 n-3	25,64±1,004	27,16±0,806	24,515±1,577	25,165±1,577	25,46±0,481	27,095±1,308	24,94±2,079

Tabella 7. Acidi grassi dei diversi campioni di sardina non trattati, trattati con la PAW e Tal Quale.

È possibile osservare che ad esempio l'acido miristico (C14:0) nel campione tal quale è presente una quantità più bassa rispetto ai diversi campioni controllo e trattato, mentre è maggiormente presente nel campione trattato con la PAW per 10 e 30 minuti.

Un altro acido grasso presente in quantità elevata è l'acido palmitico (C16:0) che vediamo essere presente in maggiore quantità nei campioni sottoposti ad acqua plasmata per 20 e 30 minuti, mentre per i campioni di controllo e il tal quale si osserva valori molto simili tra loro.

L'acido palmitoleico (C16:1) che è presente in quantità molto elevata (9,4 %) nel campione trattato con PAW per 10 minuti, mentre per gli altri campioni è osservabile una differenza minima.

Al contrario, l'acido oleico (C18:1 9c) risulta presente in minore quantità nel campione trattato con PAW per 10 minuti, mentre aumenta con il prolungamento del trattamento a 20 minuti, che va da 4,9 a 7,9%.

Inoltre, elevate quantità anche di EPA (C20:5 n-3) sono presenti già nel campione tal quale aumentando leggermente nei filetti trattati con la PAW per 10 minuti, e diminuendo in quelli con un tempo di trattamento maggiore.

Anche l'acido DPA (C22:5 n-3) come l'EPA presenta un calo significativo per il campione trattato con PAW per 20 minuti, mentre per quanto riguarda gli altri trattamenti ed i rispettivi controlli vediamo delle differenze minime.

Infine il DHA (C22:6 n-3) che risulta essere l'acido maggiormente presente nei filetti di sardina, presenta valori simili in tutti i campioni (24.5 – 27.1%).

CONCLUSIONI

I dati raccolti suggeriscono che i campioni di sarde sottoposte al trattamento PAW presentano acidi grassi polinsaturi e composti lipidici ossidati, dieni e trieni.

Per quanto riguarda i campioni di controllo e il tal quale vediamo che presentano alte quantità di dieni coniugati, in particolare il controllo a 30 minuti, mentre troviamo basse quantità di trieni, tranne per il campione di controllo a 20 minuti, dove osserviamo anche moderate quantità di trieni coniugati.

Mentre i campioni trattati con la PAW mostrano bassi livelli di dieni coniugati, al contrario sono presenti elevate quantità di trieni, in particolare per le sarde trattate per 30 minuti, questo potrebbe significare che il trattamento è troppo prolungato.

Osservando invece i risultati degli acidi grassi è possibile notare un leggero aumento per i campioni sottoposti ad acqua plasmata per 10 e 20 minuti..

Nonostante si osservi un aumento quantitativo dei composti ossidati nei campioni trattati con PAW a 30 minuti, non è stata osservata una diminuzione significativa degli acidi grassi polinsaturi.

I PUFA maggiormente presenti, indipendentemente dal tempo di trattamento sottoposto, sono il DHA (C22:6 n-3); l'EPA (C20:5 n-3); l'acido oleico (C18:1 9c); l'acido palmitoleico (C16:1); l'acido palmitico (C16:0); l'acido miristico (C14:0).

In generale, si può quindi concludere che il trattamento PAW induce un aumento del fenomeno di ossidazione lipidica nei filetti di *Sardina pilchardus*, soprattutto per il campione sottoposto ad immersione per 30 minuti, pur non determinando una diminuzione significativa per quanto riguarda gli acidi grassi polinsaturi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Thirumdas, R., Sarangapani, C. and Annapure, U. S. (2015). Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophysics* 10, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11483-014-9382-z>.
- [2] Muhammad, A. I., Xiang, Q., Liao, X., Liu, D. and Ding, T. (2018). Understanding the Impact of Nonthermal Plasma on Food Constituents and Microstructure. *Food Bioprocess Technol* 11, 463–486. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2042-9>.
- [3] Nehra, V., Kumar, A. and Dwivedi, H. W. (2008). Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources. *International Journal of Engineering*, 2, 53-68. https://is.muni.cz/el/1431/jaro2012/C6900/um/Atmospheric_Non-Thermal_Plasma_Sources.pdf.
- [4] Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmaison, J. and Leprince, P. (2006). Atmospheric pressure plasmas. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61, 2-30 <https://doi.org/10.1016/j.sab.2005.10.003>.
- [5] Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S. M. S. and Cullen, P.J. (2011). Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Engineering Reviews*, 3, 159-170. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9041-9>.
- [6] Surowsky, B., Schlüter, O. and Knorr, D. (2014). Interactions of nonthermal atmospheric pressure plasma with solid and liquid food systems: a review. *Food Engineering Reviews*, 7(2), 82–108. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9088-5>.
- [7] Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J. and Julak, J. (2015). Nonthermal plasma - A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1108–1119. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.002>.
- [8] Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X. and Ding, T. (2017). Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: a review. *Food Control*, 75, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.021>.
- [9] Schutze, A., Jeong, J. Y., Babayan, S. E., Park, J., Selwyn, G. S. and Hicks, R. F. (1998). The atmospheric-pressure plasma jet: a review and comparison to other plasma sources, *IEEE Transactions on Plasma Science*, 26 (6), 1685-1694. <https://doi.org/10.1109/27.747887>.

- [10] Massines, F. and Gouda, G. (1998). A comparison of polypropylene-surface treatment by filamentary, homogeneous and glow discharges in helium at atmospheric pressure. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 31 (24). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/31/24/003>.
- [11] Dr. Mounir Laroussi. Applied Plasma Technology Laboratory. (1998). <http://www.ece.odu.edu/~mlarouss/>.
- [12] Hertwig, C., Reineke, K., Ehlbeck, J., Knorr, D. and Schlüter, O. (2015). Decontamination of whole black pepper using different cold atmospheric pressure plasma applications. *Food Control*, 55, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.003>.
- [13] Song, H. P., Kim, B., Choe, J. H., Yun, H., Kim, Y. J. and Jo, C. (2009) Effect of gamma and electron beam irradiation on the survival of pathogens inoculated into salted, seasoned, and fermented oyster. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1320-1324 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.018>.
- [14] Misra, N. N., Schlüter, O. and Cullen, P. J. (2016). Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications. Pages 1-368. <https://doi.org/10.2307/3885338>.
- [15] Tappi, S., Berardinelli, A., Ragni, L., Dalla Rosa, M., Guarnieri, A., and Rocculi, P. (2014). Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 21, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.09.012>.
- [16] Hojnik, N., Cvelbar, U., Tavcar-Kalcher, G., Walsh, J. and Križaj, I. (2017). Mycotoxin decontamination of food: Cold atmospheric pressure plasma versus “classic” decontamination. *Toxins*, 9(5), 151. <https://doi.org/10.3390/toxins9050151>.
- [17] Kizil, R., Irudayaraj, J. and Seetharaman, K. (2002). Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 3912–3918. <https://doi.org/10.1021/jf011652p>.
- [18] Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., O’Neill, L., Tiwari, B. K., Bourke, P. and Cullen, P. J. (2015). Dielectric barrier discharge atmospheric air plasma treatment of high amylose corn starch films. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 1076–1082. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.027>.
- [19] Thirumdas, R., Kadam, D. and Annapure, U. S. (2017). Cold plasma: an alternative technology for the starch modification. *Food Biophysics*, 12(1), 129–139. <https://doi.org/10.1007/s11483-017-9468-5>.
- [20] Patindol, J., Newton, J. and Wang, Y. J. (2008). Functional properties as affected by laboratory-scale parboiling of rough rice and brown rice. *Journal of Food Science*, 73(8), E370–E377. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00926.x>.

- [21] Zou, J. J., Liu, C. J. and Eliasson, B. (2004). Modification of starch by glow discharge plasma. *Carbohydrate Polymers*, 55(1), 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.06.001>.
- [22] Zhang, B., Xiong, S., Li, X., Li, L., Xie, F. and Chen, L. (2014). Effect of oxygen glow plasma on supramolecular and molecular structures of starch and related mechanism. *Food Hydrocolloids*, 37, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.034>.
- [23] Kim, H. J., Yong, H. I., Park, S., Kim, K., Choe, W. and Jo, C. (2015). Microbial safety and quality attributes of milk following treatment with atmospheric pressure encapsulated dielectric barrier discharge plasma. *Food Control*, 47, 451–456. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.053>
- [24] Kim, B., Yun, H., Jung, S., Jung, Y., Jung, H., Choe, W. and Jo, C. (2011). Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. *Food Microbiology*, 28(1), 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.022>.
- [25] Yopez, X. V., and Keener, K. M. (2016). High-voltage atmospheric cold plasma (HVACP) hydrogenation of soybean oil without trans-fatty acids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 38, 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.001>.
- [26] Kulawik P., Tiwari B. K. (2019). Recent advancements in the application of non-thermal plasma technology for the seafood industry. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1510827>.
- [27] Fishwick, M. J. and Swoboda, P. A. T. (1977). Measurement of oxidation of polyunsaturated fatty acids by spectrophotometric assay of conjugated derivatives. *Journal of Science Food and Agriculture* 28 (4): 387– 391.