



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

OSSIDAZIONE LIPIDICA: EFFETTI DEL
PLASMA FREDDO SU FILETTI DI *SARDINA*
PILCHARDUS

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
ANDREA CANTARINI

Relatore:
DOTT.SSA ROBERTA FOLIGNI

Correlatore:
DOTT.SSA CINZIA MANNOZZI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

SOMMARIO

Introduzione e Scopo della tesi	3
Capitolo 1: IL PLASMA	4
1.1 Che cos'è il plasma?	4
1.2 Plasma termico e non termico	4
Capitolo 2: Generatori di plasma non termico	6
2.1 Scarica corona	6
2.2 Scarica a barriera dielettrica (DBD)	7
2.3 Scarica a radiofrequenza	7
Capitolo 3: EFFETTI DEL PLASMA SU MICRORGANISMI E COMPONENTI ALIMENTARI	9
3.1 Effetti del NTP sui microrganismi	9
3.2 Effetti del NTP su enzimi	10
3.3 Effetti del NTP sull'amido	11
3.4 Effetti di NTP sui lipidi	12
CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI	14
4.1 Materia prima	14
4.2 Trattamento con plasma freddo	16
4.3 Estrazione della fase grassa	17
4.4 Preparazione delle vials per analisi componente volatile	17
4.5 Descrizioni analisi gascromatografica	18
CAPITOLO 5: RISULTATI E DISCUSSIONE	20
5.1: ossidazione lipidica e prodotti dell'ossidazione	20
Conclusioni	25
Bibliografia	26

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

La tecnologia del plasma si basa su un semplice principio fisico: somministrando energia lo stato di aggregazione della materia cambia, cioè da solido passa a liquido o da liquido a gas. Se si somministra energia a un gas, esso diventa ionizzato e si trasforma quindi in plasma.

Il trattamento al plasma trova impiego in molti settori industriali come: industria tessile, industria elettronica, automobilistica ed energie alternative.

Si può distinguere il plasma termico, ampiamente industrializzato, dal plasma freddo, invece utilizzato in passato per la sterilizzazione di materiali sensibili al calore e ora esteso alle industrie alimentari.

Il plasma freddo è una tecnologia emergente ed è superiore alle tecnologie termiche, in quanto alcune componenti dei prodotti alimentari possono essere danneggiati dalle alte temperature impiegate nei processi di pastorizzazione e sterilizzazione, quindi questa tecnologia fornisce una sicurezza microbiologica soddisfacente senza l'utilizzo delle alte temperature.

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 poiché 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 quello di valutare l'entità del grado di ossidazione lipidica, attraverso la valutazione qualitativa e quantitativa di composti volatili target, in filetti di *Sardina pilchardus* trattati con acqua attivata al plasma (PAW).

CAPITOLO 1

IL PLASMA

1.1 Che cos'è il plasma?

Il plasma è un gas più o meno ionizzato, ovvero un gas in cui, una frazione di elettroni è stata strappata dai rispettivi atomi. È chiamato quarto stato della materia e costituisce più del 99% dell'universo. È costituito da elettroni liberi e ioni positivi, presenti in egual numero e quindi, la sua carica totale è nulla; inoltre possedendo cariche libere è elettricamente conduttivo.

Il plasma ha un comportamento differente dai gas ordinari perché, mentre i moti delle particelle dei gas ordinari sono dovuti a forze a corto raggio, i moti del plasma sono invece dovuti a forze elettromagnetiche a lungo raggio prodotte da campi elettrici e magnetici.

1.2 Plasma termico e non termico

Possiamo distinguere due tipologie principali di plasma: i plasmi ad alta temperatura o di fusione e quelli a bassa temperatura o scariche di gas.

Il plasma ad alta temperatura implica che gli elettroni, gli ioni e le specie neutre siano in uno stato di equilibrio termico.

Il plasma a bassa temperatura può essere suddiviso a sua volta in plasma termico, chiamato anche plasma di quasi-equilibrio (LTE), e plasma non termico (NTP), chiamato anche plasma di non equilibrio (NLTE) o plasmi freddi (Nehra et al., 2008).

Un plasma termico viene generato quando un gas viene portato a temperature molto elevate (20000 K) per far sì che avvenga la sua ionizzazione. In questo caso tutte le specie chimiche, gli elettroni e gli ioni sono in equilibrio termodinamico (Harry 2010).

NTP, invece, può essere generato applicando energia elettrica a gas come ossigeno, azoto, elio, idrogeno e aria atmosferica o a combinazioni di gas (Harry 2010; Mir et al., 2016) che si trovano a pressioni basse o atmosferiche. In particolare l'NTP, generato a pressione atmosferica, presenta diversi vantaggi per l'industria alimentare, come l'inattivazione di vari microrganismi patogeni e alterativi, il miglioramento della conservabilità dell'alimento e il miglioramento delle proprietà reologiche di alcuni costituenti alimentari, e non richiede condizioni di processo estreme (Misra et al., 2011).

Il campo elettrico, applicato al gas, causa la formazione di diverse specie reattive, che vengono generate durante la collisione di elettroni, particelle di gas e atomi.

Queste specie reattive al plasma (RS) sono: specie reattive di azoto (RNS), particelle cariche, elettroni, fotoni UV/VUV e specie reattive di ossigeno (ROS), come anione superossido,

ossigeno singoletto, radicale idrossile (Surowsky et al., 2014; Liao et al., 2017b, Scholtz et al., 2015).

Le collisioni che si vengono a formare, con l'applicazione del campo elettrico al gas, possono essere di due tipi:

- Collisioni elastiche, che portano al trasferimento e alla redistribuzione di una frazione dell'energia cinetica ad altre particelle. In queste collisioni l'energia viene immagazzinata negli elettroni liberi e la loro temperatura (T_e) si mantiene molto più alta rispetto alla temperatura degli ioni neutri (T_n), che rimangono quasi a temperatura ambiente, e alla temperatura del gas di processo T_g ; consentendo quindi al NTP di mantenere temperature basse (Surowsky et. al., 2014; Scholtz et al., 2015, Liao et. al., 2017b; Harry 2010, Niemira 2012).
- Collisioni anelastiche, che fanno sì che avvengano le reazioni plasmatiche, come eccitazione e ionizzazione (Surowsky et al., 2014).

CAPITOLO 2

GENERATORI DI PLASMA NON TERMICI

Tra i più importanti generatori di NTP abbiamo: la scarica corona (CD), la scarica a barriera dielettrica (DBD), la scarica a radiofrequenza (RF), tra cui il getto di plasma a pressione atmosferica (APPJ).

2.1 SCARICA CORONA

Il dispositivo è alimentato da corrente continua pulsata ed è formato da un filo catodico e un anodo (fig.1). Il plasma prende il nome di “Corona” perché crea una corona luminosa attorno al filo.

Quando al filo viene applicata un’alta tensione negativa la scarica corona è negativa, quindi nel filo gli ioni positivi vengono accelerati e dal filo stesso fuoriescono elettroni secondari, che a sua volta vengono accelerati nel plasma. Si viene quindi a formare un fronte mobile di elettroni ad alta energia, seguiti da una coda di elettroni a bassa energia, che prende il nome di streamer. (Bogaerts et al., 2002).

Si formano collisioni anelastiche tra gli elettroni ad alta energia e le particelle pesanti che portano alla formazione di specie reattive.

La corona può essere anche positiva, in questo caso il filo polarizzato positivo funge da anodo.

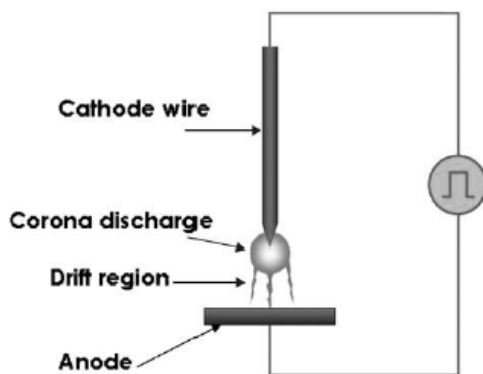


Fig. 1. Principio della scarica della corona (Tendero et al., 2006)

2.2 SCARICA BARRIERA DIELETTRICA (DBD)

Il dispositivo DBD (fig.2) è formato da due elettrodi metallici, dove almeno uno di essi è ricoperto da uno strato dielettrico. Gli elettrodi sono distanziati a pochi millimetri di larghezza. Il gas plasma scorre nel vuoto. La scarica viene accesa da una fonte di alimentazione pulsata o sinusoidale.

La scarica può essere incandescente o filamentosa a seconda di diversi parametri che sono: la composizione del gas di lavoro, la tensione e la frequenza (Massines et al., 1998, Yokoyama et al., 1990).

Sulla superficie dello strato dielettrico si forma una scarica filamentosa formata da micro-scariche o streamer.

Lo strato dielettrico svolge diversi ruoli come:

- Distribuire lo streamer in modo casuale sulla superficie dell'elettrodo e garantire un trattamento omogeneo.
- Evitare la transizione dell'arco in modo da lavorare in modalità continua o pulsata.

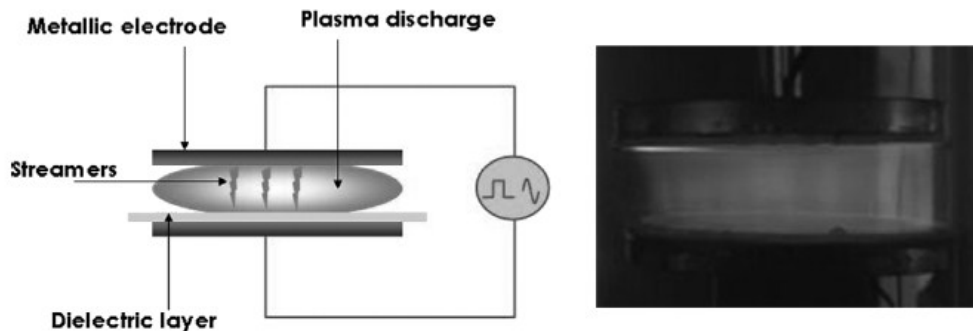


Fig. 2. Principio della scarica DBD (Tendero et al., 2006)

2.3 SCARICA A RADIOFREQUENZA (RF)

L'apparecchiatura è costituita da un generatore RF, un sistema di alimentazione del gas e un ugello in ceramica con un elettrodo di tensione RF. La generazione di scarica di plasma avviene sulla punta dell'elettrodo e si estende verso l'esterno fino al bersaglio, con l'ausilio del gas che scorre. L'intensità dei pennacchi di plasma dipende dalla potenza applicata e dalla portata del gas (Hertwing et al., 2015).

GETTO DI PLASMA A PRESSIONE ATMOSFERICA (APPJ)

L'APPJ (fig. 3) è costituito da due elettrodi concentrici attraverso i quali scorre il gas di lavoro. L'elettrodo interno è accoppiato a 13,56MHz di potenza a radiofrequenza (RF) ed ha una tensione compresa tra 100 e 250 V e l'elettrodo esterno è collegato a terra. Applicando

potenza RF si ha l'accensione della scarica e viene applicata sul gas che scorre tra l'elettrodo centrale e quello a terra producendo così un flusso di effluente ad alta velocità di specie chimiche reattive. Gli elettrodi centrali accelerano gli elettroni liberi, che a sua volta producono molecole allo stato eccitato, atomi e radicali liberi attraverso le collisioni anelastiche con il gas di alimentazione. Ioni ed elettroni vengono persi una volta che il gas esce dal volume di scarica ma l'effluente a flusso rapido contiene ancora specie e radicali neutri.

Le principali caratteristiche operative di questo sistema sono:

- Produzione di un prodotto stabile, omogeneo e uniforme;
- Opera a radiofrequenza (RF);
- Opera senza copertura dielettrica sull'elettrodo;
- La temperatura della scarica è fino a 50°C, permettendo il trattamento di superfici delicate senza danni.

(Nehra et al. 2008)

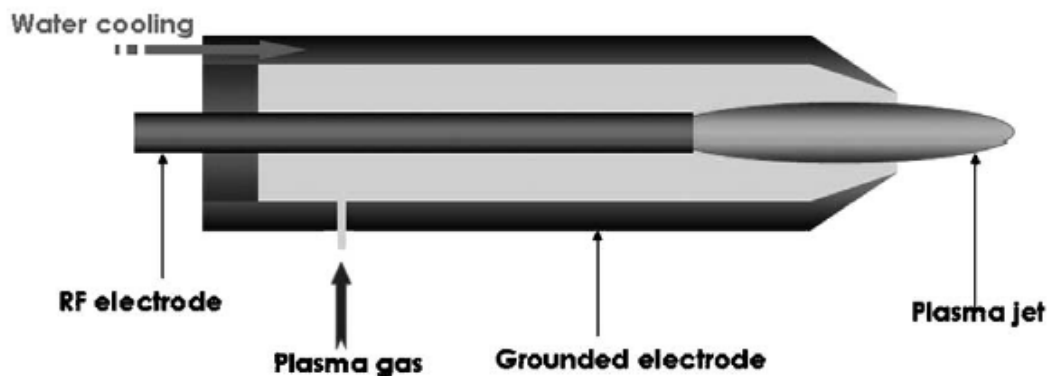


Fig. 3. Schema del getto di plasma a pressione atmosferica (Tendero et al., 2006)

CAPITOLO 3

EFFETTI DEL PLASMA SU MICRORGANISMI E COMPONENTI I ALIMENTARI

3.1 Effetti del NTP sui microrganismi

Il trattamento al plasma può inattivare un'ampia gamma di microrganismi tra cui spore e virus. La potenziale applicazione del plasma, nell'inattivazione, si basa sul fatto che le specie reattive del plasma danneggiano il DNA. I ROS sono radicali idrossilici, perossido di idrogeno e anione superossido e si formano direttamente in prossimità del DNA all'interno del nucleo cellulare. L'applicazione del plasma determina la formazione di malondialdeide (MDA) nelle cellule microbiche danneggiando così le cellule stesse (Dobrynin et al., 2009). Le specie reattive interagiscono soprattutto con l'acqua formando radicali OH che possono reagire con sostanze organiche portando alla distruzione delle molecole del DNA e delle membrane cellulari (Dobrynin et al., 2009).

I ROS, come i radicali ossigeno, possono produrre effetti profondi sulle cellule, reagendo con varie macromolecole.

L'ossigeno atomico è più reattivo rispetto a quello molecolare ed ha la capacità di degradare lipidi, proteine e DNA delle cellule microbiche. In quanto più reattivo il doppio strato lipidico della cellula microbica è più suscettibile ad esso rispetto a quello molecolare.

Il plasma freddo, può essere impiegato quindi, con successo, per aumentare la durata di conservazione di vari prodotti freschi agendo sulla distruzione microbica. Un'indagine di Misra et al. nel 2014 hanno dimostrato che nelle fragole trattate con plasma freddo è avvenuta una diminuzione rilevante della conta mesofila totale, di lieviti e di muffe (Thirumdas et al., 2014).

Guro et al. nel 2012 hanno osservato una riduzione del 54% di *E. coli* sul latte crudo trattato con plasma freddo dopo un trattamento di 3min (Gurol et al., 2012).

Fernandez et al. nel 2012 hanno riferito che con il trattamento al plasma per 15 minuti riduzioni logaritmiche di 2,72, 1,76 e 0,94 di *S. typhimurium* rispettivamente su lattuga, fragole e patate.

Inoltre è stato dimostrato che l'efficacia del plasma freddo su un particolare microrganismo dipende dalla superficie trattata. Infatti, la distruzione della *Listeria monocytogenes* era elevata nel formaggio affettato rispetto al prosciutto affettato. Si riporta una riduzione di 8 log dopo l'esposizione a 150W per 120 sec nel formaggio affettato, mentre nel prosciutto si ha una riduzione della crescita microbica che va da 0,25 a 1,73 ufc/g. (Thirumdas et al., 2014).

Infine Surowsky et al. nel 2014 hanno osservato che trattando con plasma per 480 secondi, usando argon e 0,1% di ossigeno, il succo di mela si ha una riduzione di 5 cicli logaritmici dei carichi di *Citrobacter freundii* (Surowski et al., 2014).

3.2 Effetti del NTP su enzimi

Il plasma è efficace sugli enzimi oltre che sui microrganismi (Dobrynin et al., 2009).

Gli enzimi endogeni, come la polifenolossidasi e la perossidasi, hanno la capacità di ossidare i fenoli a scapito dell'H₂O₂, causando imbrunimento enzimatico. Gli enzimi possono essere inattivati dall'ossigeno atomico e da radicali liberi tramite reazioni di ossidazione.

Dobrynin et al. nel 2009 hanno osservato che nel trattamento con plasma freddo della guava, l'attività della polifenolossidasi nella polpa e nel frutto intero, è stata ridotta, rispettivamente del 70% e del 10% in 300 secondi a 2 kv. Dobrynin et al. nel 2009 hanno riferito inoltre che il plasma è in grado di modificare la struttura 3D delle proteine negli enzimi tripsina, scindendo i legami peptidici. (Thirumdas et al., 2014).

Nell'inattivazione di polifenolossidasi e perossidasi, Surowsky et al. nel 2013 hanno riportato una diminuzione dell'attività e del contenuto di α -elica dopo l'esposizione al plasma.

L'effetto del plasma sull'attività di vari enzimi di interesse alimentare è stato studiato in diverse matrici, soprattutto di origine vegetale, mostrando come l'elevato potere ossidante delle specie reattive del plasma sia in grado di causare alla struttura enzimatica un'irreversibile perdita di funzionalità. Questo effetto ha permesso di aumentare la shelf-life in mele di IV gamma, riducendo il fenomeno di imbrunimento enzimatico.

Tappi et al. nel 2014 hanno trattato mele con plasma DBD a bassa frequenza e hanno notato che l'attività residua di polifenolossidasi è stata ridotta del 42%, con un aumento del trattamento di 30 min. La ridotta attività è stata legata agli effetti chimici dei radicali OH e NO sulle strutture amminoacidiche (Tappi et al., 2014).

Si sostiene inoltre che in alcuni casi l'esposizione al plasma può causare un aumento dell'attività degli enzimi, producendo ad esempio effetti positivi sulla germinazione dei semi (Misra et al., 2016).

L'aumento del tasso di germinazione è dovuto a cambiamenti sulla superficie che causano ablazioni che aumentano la trasmissione di ossigeno e umidità attraverso il rivestimento del seme all'embrione. Dhayal et al. nel 2006 hanno riferito che il plasma freddo è adatto per la modifica superficiale dei semi a causa delle particelle ad alta energia ionica che causano l'incisione del rivestimento dei semi, con aumento del tasso di germinazione dei semi del 50% dopo il trattamento (Thirumdas et al., 2014).

3.3 Effetti del NTP sull'amido

L'amido è un carboidrato e comprende due polisaccaridi, amilosio e amilopectina (Kizil et al., 2002). L'amilosio è una molecola lineare mentre l'amilopectina è un polimero ramificato.

È stato dimostrato che il trattamento NTP causa modifiche agli amidi, che vanno dall'alterazione delle proprietà reologiche, ai cambiamenti nella morfologia superficiale e all'aggiunta di gruppi funzionali.

La maggior parte dell'amido deriva dal mais, dal grano, dalle patate, dalla manioca, dalla banana, dall'amaranto e dal riso (Thirumdas et al., 2017). Questi prodotti subiscono diverse lavorazioni, che comportano cambiamenti ai granuli di amido, come gelatinizzazione e retrogradazione (Patindol et al., 2008).

Questi cambiamenti ostacolano l'applicabilità dei prodotti amidacei nell'industria alimentare. Il trattamento NTP modifica alcune proprietà degli amidi, che vanno dall'alterazione delle proprietà reologiche ai cambiamenti nella morfologia superficiale.

I cambiamenti chimici causati da NTP all'amido sono: depolimerizzazione, aggiunta di nuovi gruppi funzionali, ma soprattutto reticolazione (Bie et al., 2016; Lii et al., 2002a, b, c; Zang et al., 2014).

Zou et al. nello studio del 2004 sulla modificazione dell'amido hanno mostrato che i legami C=O nell'amido plasma-modificato scomparivano, con conseguente perdita di un gruppo OH a causa della reticolazione dell' α -D-glucosio (Zou et al., 2004).

Nel film di amido di mais ad alto contenuto di amilosio, la collisione del RS generato dal plasma causa rugosità superficiale e la superficie del film di amido mostra la comparsa di gruppi O=C-O dopo il trattamento NTP (Pankaj et al., 2015). L'aumento di ozonizzazione ha portato all'aggiunta di gruppi carbonile e carbossilici nell'amido di patate (Castanha et al., 2017).

Questi studi indicano che NTP è in grado di modificare la struttura molecolare degli amidi e i cambiamenti dipendono soprattutto dall'origine botanica, dalla durata del trattamento, dal tipo di plasma e amido.

Per quanto riguarda le proprietà reologiche, l'impatto del trattamento NTP sulla viscosità dei granuli, può verificarsi con la scomparsa della resistenza al taglio dei granuli gonfi e con la depolimerizzazione delle catene di amilosio e amilopectina. In particolare, nell'amido altamente reticolato, si è osservata una maggior riduzione della viscosità (Ai e Jane 2015).

Inoltre Thirumdas et al. nel 2016 hanno osservato una formazione di fessure nei granuli di amido di mais sottoposto a trattamento NTP e hanno sostenuto che ciò potrebbe influenzare la reologia dell'amido, soprattutto durante la cottura (Thirumdas et al., 2016).

Zang et al. nel 2015 hanno riportato una riduzione della viscosità finale dell'amido di patate a causa dei trattamenti con plasma a incandescenza di azoto ed elio a 245V per 30 min. La massima diminuzione della viscosità registrata è del 23% con il plasma di elio per 60 minuti (Zhang et al., 2015).

3.4 Effetti di NTP sui lipidi

I lipidi li troviamo in alimenti di origine animale e vegetale. L'ossidazione dei lipidi, causa un enorme impatto sulle caratteristiche sensoriali degli alimenti, portando anche alla formazione di sapori sgradevoli. Con NTP l'ossidazione lipidica viene avviata dai ROS, come ossigeno atomico e radicali idrossilici (Van Durme et al., 2014).

Nell'ossidazione dei lipidi, attivata dal plasma, le reazioni vengono attivate da ossigeno singoletto, radicali OH (Surowsky et al., 2013) e specie simili al perossido di idrogeno, che provocano la distruzione degli acidi grassi non saturi su parti delle membrane cellulari.

Per studiare in maniera efficace i fenomeni chimici dei lipidi, nei sistemi alimentari reali, dobbiamo mantenere temperature ambientali (Gunstone 2006; Krichene et al., 2010).

L'ossidazione lipidica, in campioni trattati con NTP, può essere calcolata tramite la misurazione di sostanze reattive all'acido-2-tiobarbiturico (TBARS), sottoprodotto dell'ossidazione primaria (Anwar et al., 2007; Bahrami et al., 2016; Capuano et al., 2010).

Si sono osservate riduzioni apprezzabili di *E. coli* nei lombi di maiale trattati con plasma DBD con elio e He + O₂ come gas di processo con un'esposizione di 5 e 10 min. I valori di TBARS dei campioni trattati con He + O₂ erano più alti rispetto ad altri campioni (Kim et al., 2013) e questi aumenti sono stati attribuiti ai radicali liberi.

Anche i campioni di pancetta esposti al plasma di elio/ossigeno hanno mostrato valori più elevati di TBARS dopo 7 giorni di conservazione rispetto ai campioni non trattati (Kim et al., 2011).

Nella carne pronta, come la bresaola, è stato riportato un aumento dell'ossidazione lipidica, collegato alla potenza, al tempo di conservazione e ai trattamenti. L'aumento è stato più significativo ad una temperatura di 5°C (Rod et al., 2012).

Van Durme et al. nel 2014 hanno studiato l'accelerazione dell'ossidazione lipidica utilizzando un getto di plasma RF. Per la misurazione dei composti volatili dopo l'esposizione al plasma i ricercatori hanno utilizzato la gascromatografia-spettrometria di

massa. Dopo il trattamento al plasma dell'olio vegetale si sono formate aldeidi e 2-pentilfurano attraverso l'azione di ossigeno atomico e singoletto (Van Durme et al., 2014).

Yepez et al. nel 2016 hanno sottoposto l'olio di soia al plasma freddo ad alta tensione per 12 ore, utilizzando idrogeno e azoto come gas di processo per produrre olio di soia parzialmente idrogenato e privo di acidi grassi trans. Gli acidi grassi saturi sono aumentati del 12%, mentre quelli monoinsaturi del 4,6%. Invece gli acidi grassi polinsaturi sono diminuiti del 16,2% dopo il trattamento con plasma. L'assenza di acidi grassi trans nel prodotto finale è stata attribuita alle specie di idrogeno atomico che si legano agli acidi grassi insaturi, convertendo i legami C=C in legami singoli (Yepez et al., 2016).

NTP ha dimostrato di essere una tecnologia emergente con un grande potenziale. Oltre ai suoi effetti sull'inattivazione microbica può essere applicato nell'industria alimentare.

CAPITOLO 4 MATERIALI E METODI

4.1 Materia prima

Sono stati utilizzati dei filetti di *Sardina pilchardus* pescati nell'Adriatico eviscerati e decapitati. Successivamente i filetti sono stati tagliati a metà e passati sotto getto d'acqua per 30 secondi per poi essere asciugati e tamponati con carta assorbente.

50 g di campione sono stati trattati per immersione in PAW per 3 tempi di trattamento: 10, 20 e 30 minuti (campioni P10, P20, P30) in rapporto solido liquido 1:3 mantenendoli in agitazione;

Come controllo, i filetti sono stati immersi in acqua distillata (campioni C10, C20, C30).

Ogni campione è stato diviso equamente, inserito in sacchetti e stoccato ad una temperatura di -20°C per la successiva estrazione a freddo del 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).

Elenco dei campioni:

Codice campione	Descrizione
TQ a	Filetti non trattati
TQ b	Filetti non trattati
C10.1	Filetti trattati con acqua distillata
P10.1	Filetti trattati con PAW
C20.1	Filetti trattati con acqua distillata
P20.1	Filetti tratti con PAW
C30.1	Filetti trattati con acqua distillata
P30.1	Filetti trattati con PAW
C10.2	Filetti trattati con acqua distillata
P10.2	Filetti trattati con PAW
C20.2	Filetti trattati con acqua distillata
P20.2	Filetti trattati con PAW
C30.2	Filetti trattati con acqua distillata
P30.2	Filetti trattati con PAW

4.2 TRATTAMENTO CON PLASMA FREDDO

Il plasma freddo può essere utilizzato per generare acqua attivata al plasma, ovvero la PAW.

Essa può essere generata attraverso:

- esposizione diretta con scarica di plasma generata direttamente in acqua;
- metodo indiretto, dove il plasma viene generato nell'aria e i ROS formati vengono trasferiti nell'acqua.

Il trattamento indiretto determina la formazione di vari ROS nell'acqua, principalmente H_2O_2 , specie reattive all'azoto e ioni metallici, che forniscono effetto antimicrobico grazie al calo del pH, 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 (Kulawik et al., 2019).

La PAW è stata ottenuta con una sorgente di tipo "Microsecond pulsed corona", 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 1)

Tabella 1. Caratteristiche della sorgente e della PAW prodotta

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

Come possiamo vedere dalla tabella, 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 DELLA FRAZIONE GRASSA

Per l'estrazione della frazione grassa è stato utilizzato il metodo di estrazione a freddo cloroformio-metanolo applicato a 100 gr di campione

Fig.4 Ultra-turrax

(<https://www.saccosystem.com/home/it/>)



Fig. 5 Rotavapor

(<https://www.fishersci.it/it/it/home.html>)



4.4 Preparazione delle vials per analisi componente volatile

Per la preparazione delle vials sono stati pesati esattamente 0.5 g di grasso per ogni campione (in replica).

Di seguito vengono riportati in tabella i pesi dei vari campioni (Tabella 2).

Tabella 2. Campioni utilizzati con i corrispettivi pesi

CAMPIONE	PESO (g)
TQ a	0,4956
TQ b	0,2658*
C10.1	0,5102
P10.1	0,4802
C20.1	0,5004
P20.1	0,3127*
C30.1	0,2649*
P30.1	0,5003
C10.2	0,5146
P10.2	0,5052
C20.2	0,5119
P20.2	0,5052
C30.2	0,4901
P30.2	0,2734*

*quantità disponibile non suff.

4.5 DESCRIZIONE ANALISI GASCROMATOGRAFICA

I campioni, preparati come precedentemente descritto, sono stati termostatati a 40°C con la contemporanea esposizione della fibra (SPME (divinilbenzene/carbossene/polimetilsilossano, 1cm, 50/30µm) per 40 min.

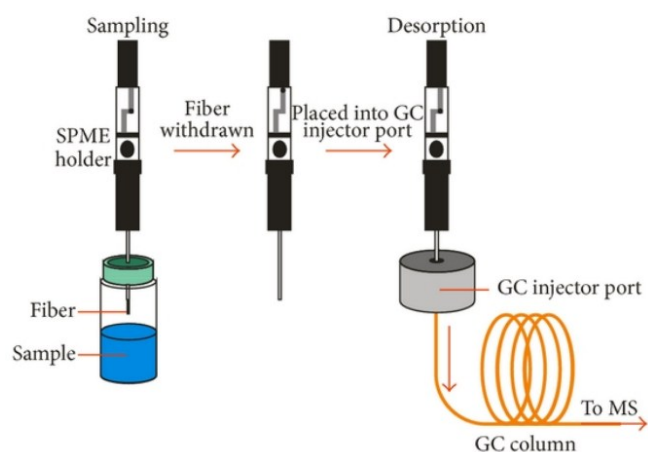
Il desorbimento termico della fibra nell'iniettore del GC-MS è stato effettuato a 220°C per 3 minuti.

Le analisi GC – MS sono state eseguite con un gas Varian 3900 cromatografo accoppiato ad un Saturn 2100T (Varian, Walnut Creek, CA, USA) spettrometro di massa a trappola ionica. La separazione cromatografica è stata eseguita su un TG-5MS colonna capillare (Thermo Scientific, 30 m x 0,25 mm D.I., spessore del film 0,25 µm). In modalità splitless (tempo splitless 0,3 min). (fig.6)

Il programma della temperatura del forno è avviato a 40°C per 5 min, poi portato a 140°C a un incremento di 4°C/min e ha raggiunto 220°C a una velocità di 10°C/min.

I composti volatili sono stati quantificati e identificati con il Variation Software per workstation. L'identificazione è stata confermata con l'indice di ritenzione cromatografica e il NIST library mass spectra (Versione:2.0;2002) of pure standard substances.

Fig. 6 Schema di analisi con micro-estrazione in fase solida-gas cromatografia-spettrometria di massa (SPME-GC-MS). (<https://www.researchgate.net/>)



CAPITOLO 5

RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Ossidazione lipidica e prodotti dell'ossidazione

Per ossidazione lipidica si intende una reazione a più steps che porta al deterioramento dell'aroma, del gusto, dell'aspetto, nonché del decadimento di qualità e sicurezza nutrizionale della matrice alimentare.

I fattori che favoriscono l'ossidazione lipidica sono: ossigeno, calore, luce, metalli, alcune modifiche da parte dei microrganismi e alcune azioni enzimatiche.

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 e innesca un'ossidazione a catena dei restanti AG ancora non ossidati (è una reazione auto catalitica).

Si possono distinguere 3 fasi nel meccanismo di ossidazione lipidica:

- 1) Inizio: prevede la formazione di radicali liberi da AG insaturi.
- 2) Propagazione: i radicali liberi che si sono formati sono molto reattivi e tendono a strappare elettroni ad altri AG che si trovano vicino ai radicali stessi, creando a sua volta altri radicali liberi che si comporteranno allo stesso modo. Per questo possiamo dire che questa reazione è auto catalitica.
- 3) Terminazione: la reazione termina quando due radicali danno origine a prodotti non radicalici.

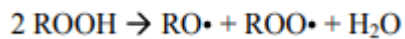
I principali prodotti dell'ossidazione lipidica sono gli idroperossidi lipidici ROOH, mentre tra i prodotti secondari vi sono numerose aldeidi, chetoni, alcoli, esteri, acidi, epossidi, idrocarburi e furani. La maggior parte dei prodotti secondari dell'ossidazione lipidica sono composti volatili.

Durante l'autossidazione si può verificare la decomposizione degli idroperossidi a radicali, a causa delle elevate temperature. Il principale meccanismo di decomposizione degli idroperossidi comporta la scissione del doppio legame adiacente il gruppo idroperossido, portando alla formazione di idrocarburi, aldeidi, alcoli e chetoni volatili. Questa decomposizione può portare alla formazione di due differenti radicali:

- i radicali perossilici (ROO•), in questo caso la decomposizione è reversibile e la formazione di questi radicali è un processo unimolecolare

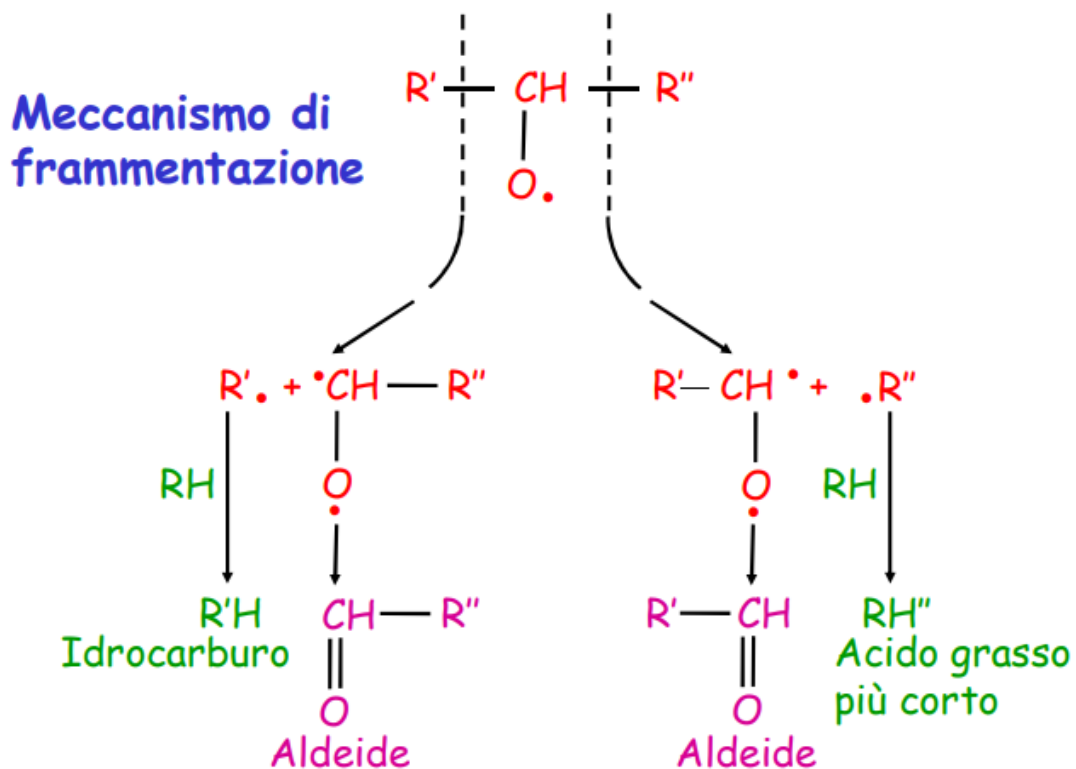


- i radicali alcossilici: in questo caso la decomposizione è irreversibile e la formazione di questi radicali è un processo bimolecolare



La formazione dei composti volatili deriva proprio dalla β -scissione dei radicali alcossilici (fig. 7).

Fig. 7 Meccanismo di decomposizione dei perossidi a prodotti secondari (<https://www.unipi.it>)



Tra i prodotti di decomposizione in primo luogo abbiamo le aldeidi e gli idrocarburi.

Nella tabella 3 possiamo osservare i diversi composti volatili che sono derivati dall'ossidazione lipidica dell'olio estratto da filetti di *Sardina pilchardus* trattati con la PAW.

Tabella 3. Composti volatili derivati dall'ossidazione lipidica dell'olio estratto dalle sardine trattate con PAW, con la corrispettiva classe di appartenenza del composto volatile e il suo tempo di ritenzione (RT).

RT (min)	Nome	Classe di appartenenza
2,975	furan, 2-ethyl-	Oxygenated heterocycles
3,073	unidentified	
3,324	unidentified	
3,331	unidentified	
3,445	3-penten-2-one, (E)-	Ketones
3,509	pentenal isomer	Aldehydes
3,655	2-pentenal, (E)-	Aldehydes
3,896	2-penten-1-ol, (Z)-	Alcohols
4,201	octadiene isomer	Aliphatic hydrocarbons
4,329	hexanal	Aldehydes
4,572	octadiene isomer	Aliphatic hydrocarbons
4,702	octadiene isomer	Aliphatic hydrocarbons
5,328	2-hexenal, (E)-	Aldehydes
5,523	ethylbenzene	Aromatic hydrocarbons
5,685	m/p-xylene	Aromatic hydrocarbons
6,201	o-xylene	Aromatic hydrocarbons
6,283	4-heptenal, (Z)-	Aldehydes
6,588	cyclohexene, 1-methoxy	Ethers
8,392	FIBRE BLEED (tetraethyl silicate)	
8,457	1-decene	Aliphatic hydrocarbons
8,603	2,4-heptadienal, (E,Z)-	Aldehydes
8,667	n-decane	Aliphatic hydrocarbons
8,716	n-octanal	Aldehydes
8,798	unidentified	
8,96	2,4-heptadienal, (E,E)-	Aldehydes
10,093	decane, x-methyl	Aliphatic hydrocarbons
10,158	decane, x-methyl	Aliphatic hydrocarbons
10,239	decane, x-methyl	Aliphatic hydrocarbons
10,415	3,5-octadien-2-one, (E,E)-	Ketones
10,804	unidentified	
11,012	unidentified	

11,126	n-undecane	Aliphatic hydrocarbons
11,239	n-nonanal	Aldehydes
11,336	unidentified	
11,529	unidentified	
13,205	dodecene isomer	Aliphatic hydrocarbons
13,384	1-dodecene	Aliphatic hydrocarbons
13,559	n-dodecane	Aliphatic hydrocarbons
13,674	dodecene isomer	Aliphatic hydrocarbons
13,899	dodecene isomer	Aliphatic hydrocarbons
15,433	tridecane isomer	Aliphatic hydrocarbons
15,691	1-tridecene	Aliphatic hydrocarbons
15,886	n-tridecane	Aliphatic hydrocarbons
17,914	1-tetradecene	Aliphatic hydrocarbons
18,076	n-tetradecane	Aliphatic hydrocarbons
20,174	n-pentadecane	Aliphatic hydrocarbons
22,024	1-hexadecene	Aliphatic hydrocarbons
22,153	n-hexadecane	Aliphatic hydrocarbons
23,644	heptadecene isomer	Aliphatic hydrocarbons
23,726	heptadecene isomer	Aliphatic hydrocarbons
23,916	1-heptadecene	Aliphatic hydrocarbons
24,046	n-heptadecane	Aliphatic hydrocarbons
24,16	hexadecane, 4-methyl	Aliphatic hydrocarbons

Di seguito possiamo osservare la formazione dei composti volatili derivati dall'ossidazione lipidica nei vari campioni oggetto di studio (Fig.4).

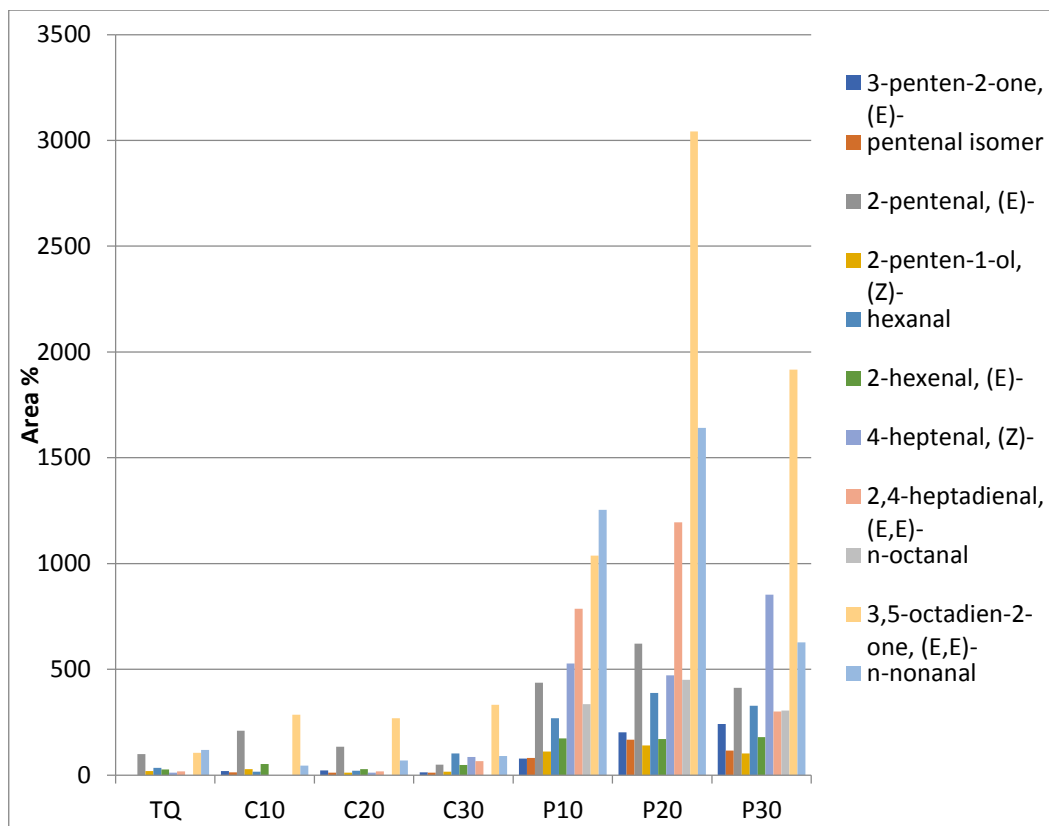


Fig. 4 Composti volatili ossidati (chetoni, aldeidi ed alcoli) presenti nei diversi campioni di filetti di sardine.

Dal grafico è possibile notare l'andamento dei composti volatili ossidati (chetoni, aldeidi ed alcoli) nei campioni trattati con PAW, rispetto ai controlli ed al campione tal quale (TQ) .

Il 3-penten-2-one e l'isomero pentenal, già presenti in piccole quantità nei campioni non trattati con la PAW, ma assenti nel campione TQ, presentano un leggero incremento nel campione immerso per 10 minuti, mentre per i campioni a 20 e 30 minuti il loro incremento risulta maggiore.

Mentre il 2-pentenal risulta essere presente sia nei campioni controllo che nel TQ per poi aumentare in modo significativo nei campioni trattati con la PAW, in particolare nei filetti trattati con acqua "attiva" per 20 min. Allo stesso modo anche per il 2-penten-1-ol e l'hexanal è possibile osservare un comportamento simile, con la differenza che la quantità di questi composti nei campioni controllo è molto inferiore rispetto al 2-pentenal e che l'incremento dell'alcol 2-penten-1-ol e dell'aldeide hexanal nei campioni trattati con PAW invece è leggermente inferiore rispetto al precedente.

Inoltre è possibile notare come l'aldeide 2-hexenal, presente in modeste quantità nei campioni controllo e nel TQ, risulta aumentata nei campioni trattati con la PAW indipendentemente dal tempo di immersione utilizzato; mentre per il 4-heptenal è stato osservato in generale, un aumento per i campioni sottoposti al trattamento PAW, in particolare per i filetti immersi per 30 minuti, rispetto ai controlli trattati con sola acqua ed il campione TQ.

Al contrario il 2,4-heptadienal risulta presente in minor quantità nelle sarde trattate per 30 min, mentre aumenta nel campione trattato per 10 min e ancor di più in quello immerso per 20 min.

Il n-octanal, inizialmente assente nei campioni controllo, presenta un buon incremento nei campioni trattati, soprattutto nel campione immerso per 20 min.

Invece il 3,5-octadien-2-one, già presente in quantità significative nei campioni non trattati, subisce un incremento nelle sardine dopo 20 min in immersione, ma anche i campioni a 10 e 30 min mostrano valori elevati.

Infine il n-nonanal, presente in quantità modeste nei campioni non trattati, ha un incremento significativo nelle sarde sottoposte al trattamento PAW, in particolare nei 20 min di immersione del campione (1642%), mentre risulta essere meno presente rispettivamente a 10 e 30 min (1254 e 627 %).

Conclusioni

I dati raccolti suggeriscono che i campioni di sarde sottoposte al trattamento PAW presentano sia qualitativamente che quantitativamente composti lipidici ossidati, fornendo in questo modo il livello di ossidazione lipidica dei diversi campioni.

I campioni immersi per 30 min dopo l'applicazione del PAW mostrano una quantità inferiore di composti ossidati rispetto ai campioni trattati per un tempo minore (10 e 20 min), ad eccezione del 4-heptanal e del 3-penten-2-one che invece sono presenti in maggior quantità nei filetti di sardine immerse per 30 min.

Inoltre è necessario evidenziare che il n-octanal (aldeide da acidi grassi saturi) non è stato rilevato nei campioni controllo, mentre è stato riscontrato nei campioni trattati.

L'aldeide hexanal ed il chetone 3,5-octadien-2-one, che sono responsabile dell'odore pungente nel prodotto finito, sono risultati maggiormente presente nei prodotti sottoposti al trattamento plasma indipendentemente dal tempo di sosta utilizzato nella fase di immersione con acqua "attiva".

Si può quindi affermare 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 20 min, provocando una conseguente diminuzione della qualità complessiva e quindi della *shelf-life* del prodotto finale.

BIBLIOGRAFIA

- Ai, Y., & Jane, J. (2015). Gelatinization and rheological properties of starch. *Starch/Stärke*, 67(3-4), 213–224. <https://doi.org/10.1002/star.201400201>.
- Anwar, F., Chatha, S. A. S., & Hussain, A. I. (2007). Assessment of oxidative deterioration of soybean oil at ambient and sunlight storage. *Grasas y Aceites*, 58(4), 390–395. <https://doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i4.451>
- Aziz M.F.A., Mahmoudb E.A., Elaragi G.M., J. *Stored Prod. Res.* (2014). Cold Plasma: una nuova tecnologia non termica per la lavorazione degli alimenti. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2014.03.002>
- Bahrami, N., Bayliss, D., Chope, G., Penson, S., Perhinec, T., & Fisk, I. D. (2016). Cold plasma: a new technology to modify wheat flour functionality. *Food Chemistry*, 202, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.113>.
- Bie, P., Pu, H., Zhang, B., Su, J., Chen, L., & Li, X. (2016). Structural characteristics and rheological properties of plasma-treated starch. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.11.019>.
- Bogaerts, E. Neyts, R. Gijbels, J. van der Mullen, *Gaz discharge plasmas and their applications*, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 609– 658. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(01\)00406-2](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(01)00406-2)
- Capuano, E., Oliviero, T., Açar, Ö. Ç., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2010). Lipid oxidation promotes acrylamide formation in fat-rich model systems. *Food Research International*, 43(4), 1021–1026. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.013>.
- Castanha, N., Divino, M., Esteves, P., & Augusto, D. (2017). Potato starch modification using the ozone technology. *Food Hydrocolloids*, 66, 343–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.001>.
- Dobrynin, G. Fridman, G. Friedman, A. Fridman (2009). Meccanismi fisici e biologici dell'interazione diretta del plasma con i tessuti viventi. *New journal of physics*. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115020>
- Gunstone, F. D. (2006). *Modifying lipids for use in food (first)*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533 / 9781845691684>

- Gurol C., Ekinci F.Y., Aslan N., Korachi M., *Int. J. Food Microbiol.* 15, 157 (2012). Plasma a bassa temperatura per la decontaminazione di E. coli nel latte. DOI:[10.1016 / j.ijfoodmicro.2012.02.016](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.016)
- Harry, J. (2010). *Introduction to plasma technology: Science, engineering and applications*. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag & Co. KGaA. DOI: 10.1002 / 9783527632169
- Hertwig, C., Reineke, K., Ehlbeck, J., Knorr, D., & 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>.
- Kim, B., Yun, H., Jung, S., Jung, Y., Jung, H., Choe, W., & 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>.
- Kim, H., Yong, H. I., Park, S., Choe, W., & Jo, C. (2013). Effects of dielectric barrier discharge plasma on pathogen inactivation and the physicochemical and sensory characteristics of pork loin. *Current Applied Physics*, 13(7), 1420–1425. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2013.04.021>.
- Kizil, R., Irudayaraj, J., & 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>.
- Krichene, D., Allalout, A., Mancebo-Campos, V., Salvador, M. D., Zarrouk, M., & Fregapane, G. (2010). Stability of virgin olive oil and behaviour of its natural antioxidants under medium temperature accelerated storage conditions. *Food Chemistry*, 121(1), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.026>.
- 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>
- Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X., & Ding, T. (2017b). 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>.
- Lii, C., Liao, C., Stobinski, L., & Tomasik, P. (2002a). Effects of hydrogen, oxygen, and ammonia low-pressure glow plasma on granular starches. *Carbohydrate Polymers*, 49(4), 449–456. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00351-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00351-4).

- Lii, C., Liao, C., Stobinski, L., & Tomasik, P. (2002b). Exposure of granular starches to low-pressure glow ethylene plasma. *European Polymer Journal*, 38(8), 1601–1606.
[https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(02\)00022-8](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(02)00022-8).
- Lii, C., yi Liao, C., Stobinski, L., & Tomasik, P. (2002c). Behaviour of granular starches in low-pressure glow plasma. *European Polymer Journal*, 49(8), 499–507.
[https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(02\)00022-8](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(02)00022-8).
- Massines F., Gouda G., A comparison of polypropylene-surface treatment by filamentary, homogeneous and glow discharges in helium at atmospheric pressure, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 31 (1998) 3411 – 3420. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/31/24/003>
- Mir, S. A., Shah, M. A., & Mir, M. M. (2016). Understanding the role of plasma technology in food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 9(5), 1–17.
<https://doi.org/10.1007/s11947-016-1699-9>
- Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S. M. S., & Cullen, P. J. (2011). Non thermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Engineering Reviews*, 3(3-4), 159–170.
<https://doi.org/10.1007/s12393-011-9041-9>
- Misra, N. N., Pankaj, S. K., Segat, A., & Ishikawa, K. (2016). Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems. *Trends in Food Science & Technology*, 55, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.001>
- Nehra V., Kumar A. and Dwivedi H. W. (2008). Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources. *International Journal of Engineering*.
<https://www.csejournals.org/manuscript/Journals/IJE/Volume2/Issue1/IJE-12.pdf>
- Niemira, B. A. (2012). Cold plasma decontamination of foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 125–142. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101132>.
- Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., O’Neill, L., Tiwari, B. K., Bourke, P., & 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>.
- Patindol, J., Newton, J., & 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>.
- Rød, S. K., Hansen, F., Leipold, F., & Knöchel, S. (2012). Cold atmospheric pressure plasma treatment of ready-to-eat meat: inactivation of *Listeria innocua* and changes in product quality. *Food Microbiology*, 30(1), 233–238.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.018>.

- Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J., & 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>.

- Surowsky, B., Fischer, A., Schlueter, O., & Knorr, D. (2013). Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.002>.

- Surowsky, B., Schlüter, O., & 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>.

- Tappi, S., Berardinelli, A., Ragni, L., Dalla Rosa, M., Guarnieri, A., Rocculi, P. (2014). Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 21, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.09.012>

- Tendero C., Tixier C., Tristant P., Desmason J., Leprince P. (2006). Atmospheric pressure plasmas: A review. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2005.10.003>

- Thirumdas, R., Trimukhe, A., Deshmukh, R. R., & Annapure, U. S. (2016). Functional and rheological properties of cold plasma treated rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1723–1731. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.050>.

- Thirumdas, R., Kadam, D., & 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>

-Van Durme, J., Nikiforov, A., Vandamme, J., Leys, C., & De Winne, A. (2014). Accelerated lipid oxidation using non-thermal plasma technology: evaluation of volatile compounds. *Food Research International*, 62, 868–876.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.043>.

- Yopez, X. V., & 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>.

- Yokoyama, M. Kogoma, T. Moriwaki, S. Okazaki, The mechanism of the stabilisation of glow plasma at atmospheric pressure, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 23 (1990) 1125–1128.

<https://doi.org/10.1088/0022-3727/23/8/021>

- Zhang, B., Xiong, S., Li, X., Li, L., Xie, F., & 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>.
- Zhang, B., Chen, L., Li, X., Li, L., & Zhang, H. (2015). Understanding the multi-scale structure and functional properties of starch modulated by glow-plasma: a structure-functionality relationship. *Food Hydrocolloids*, 50, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.05.002>
- Zou, J. J., Liu, C. J., & 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>.