



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E  
AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**PLASMA FREDDO:**  
principali effetti su differenti matrici alimentari  
**COLD PLASMA:**  
main effects on different food matrices

TIPO TESI: compilativa

Studente:

NAUSICAA PASQUALINI

Relatore:

DOTT.SSA ROBERTA FOLIGNI

Correlatore:

DOTT.SSA CINZIA MANNOZZI

PROF. MASSIMO MOZZON

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

# SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE	4
ELENCO DELLE FIGURE	5
INTRODUZIONE	7
CAPITOLO 1: DANNI DEI TRATTAMENTI TERMICI	9
1.1-I trattamenti termici più usati nell'industria alimentare	9
1.2-I danni provocati dai trattamenti termici	11
CAPITOLO 2: IL PLASMA	14
2.1- Metodi di produzione	14
2.2- Classificazione	16
2.2.1- Densità elettronica	16
2.2.2- Temperatura	16
2.2.3- Pressione atmosferica	18
2.3- Generatori di plasma atmosferico	19
2.3.1- La scarica a corona	20
2.3.2- Scarica della barriera dielettrica	21
2.3.3- Scariche a microonde	23
2.2.4- Getto di plasma a pressione atmosferica	24
2.4- Ruolo svolto dai parametri di processo	26

CAPITOLO 3: EFFETTI STERILIZZANTI	28
3.1- Inattivazione microbica	28
3.1.1- Azione sulle spore	30
3.2- Inattivazione enzimatica	33
3.3- Inattivazione micotossine	35
3.3.1- Meccanismo di degradazione micotossine	38
CAPITOLO 4: EFFETTI SULLA QUALITA'	40
4.1- Effetti chimici	40
4.1.1- Amidi	40
4.1.2- Componenti bioattivi	41
4.1.3- Proteine	44
4.1.4- Lipidi	47
4.1.5- Vitamine	50
4.1.6- pH e acidità	51
4.2- Effetti fisici	52
4.2.1- Colore	52
4.2.2- Struttura	53
CAPITOLO 5: APPLICAZIONI SUI PRODOTTI ALIMENTARI	54
5.1- Acqua	54
5.2- Prodotti ittici	56
5.3- Prodotti carnei	58
5.4- Ortofrutta	60
5.5- Packaging	62
CONCLUSIONE	65
BIBLIOGRAFIA	67

SITOGRAFIA 73

RINGRAZIAMENTI 74

## ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1-Criteri di classificazione per la pastorizzazione.	10
Tabella 2- Modalità di sterilizzazione degli alimenti.	11
Tabella 3- Caratteristiche delle sorgenti di plasma atmosferico.	25
Tabella 4- Fattori che influenzano l'inattivazione enzimatica.	34
Tabella 5-Riepilogo degli studi di ricerca che dimostrano la degradazione della micotossina utilizzando plasma freddo.	36
Tabella 6- Influenza dei trattamenti al plasma sui composti fenolici di alimenti integri, tagliati e trasformati.	42
Tabella 7- Studi sugli effetti del trattamento al plasma sulle proteine.	45
Tabella 8-Riepilogo dell'ossidazione lipidica indotta dal plasma freddo in diverse matrici alimentari.	48
Tabella 9- Diversa efficacia del trattamento al plasma a seconda dei fattori determinanti.	59
Tabella 10- Risultati riassuntivi dell'inattivazione microbica sulla superficie delle fragole.	62

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-Passaggi di stato della materia.	7
Figura 2-Principi di generazione del plasma.	14
Figura 3-Classificazione del plasma in funzione alla temperatura.	18
Figura 4-Transizione da plasma non-LTE a plasma LTE.	19
Figura 5- Scarica a corona.	21
Figura 6- Dielectric Barrier Discharge (DBD).	21
Figura 7-Disposizione degli elettrodi nelle diverse configurazioni DBD.	22
Figura 8-Microwave Induced Plasma-MIP.	24
Figura 9- Torcia APPJ.	25
Figura 10- Effetti del plasma sulle cellule microbiche.	29
Figura 11-Curve di sopravvivenza delle spore di <i>B. subtilis</i> esposte a un flusso residuo di bagliore. Con aggiunta di <b>O<sub>2</sub></b> all'argon.	31
Figura12- Curva di sopravvivenza trifasica della sterilizzazione al plasma.	32
Figura 13- Vie di degradazione dell'aflatossina (AFB1) in seguito all'esposizione a plasma freddo atmosferico ad alta tensione.	39
Figura 14.1- Addizione dipolare.	47
Figura 14.2- Disintegrazione di ozonide.	48
Figura 15- Contenuto di vitamina C nelle fette di carota, cetriolo e pera.	51

Figura 16- Conteggi di batteri mesofili aerobi, batteri psicrotrofi, LAB e *Pseudomonas* (log CFU g<sup>-1</sup> campioni) in sgombri sottoposti a diversi trattamenti DBD. 57

Figura 17-Schema dell'assetto sperimentale impiegato per il trattamento delle fragole confezionate. 61

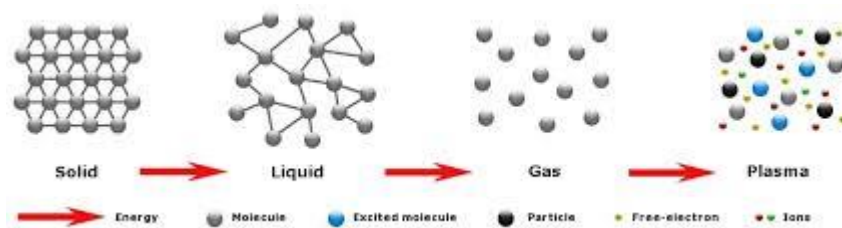
Figura 18- Inattivazione delle spore di *A. niger* in funzione del tempo di trattamento e umidità relativa. Si può osservare che la mortalità aumenta con l'aumentare dell'umidità del gas. Questo effetto diventa più accentuato a tempi di trattamento prolungati.

Umidità: ● 0%; ▽ 70%; ◆ 80%. 64

Figura 19-Mortalità delle spore di *Bacillus subtilis* in funzione del tempo di trattamento e dell'umidità relativa. L'inattivazione tende a diminuire con l'aumentare dell'umidità relativa (UR). UR ▽ 0%; ● 80%. 64

## INTRODUZIONE

Normalmente la materia, sulla Terra, si può trovare nei tre ben conosciuti e distinti stati fisici; ovvero solido, liquido e gassoso. Se consideriamo il Sistema Universo, invece, dobbiamo includere anche un quarto stato che viene rappresentato da gas parzialmente o completamente ionizzato: il plasma. (Fig.1). Grazie all'esperimento dello scienziato e politico statunitense Benjamin Franklin, si palesò la natura elettrica dei fulmini e si fecero le prime scoperte sulle proprietà delle scariche elettriche nei confronti dei gas. Fin dall'alba dei tempi l'uomo è rimasto sempre affascinato e al contempo scioccato da questi spettacolari fenomeni naturali, associandoli a qualche misterioso potere divino. Franklin invece ipotizzò una teoria secondo la quale questi, non erano altro che fenomeni di natura puramente elettrica paragonabili alle scintille.



*Figura 1-Passaggi di stato della materia*

*(<http://docplayer.com.br/50259294-Usinagem-2-aula-4-corte-por-plasma.html>)*

Così il 15 giugno 1752, approfittò di un improvviso temporale a Philadelphia, per far volare nel cielo un aquilone di seta dotato di punta metallica e attaccato a un filo di canapa, alla cui estremità appese una chiave di ferro (come rivelatore d'elettricità statica) collegata a una bottiglia di Leida, ovvero il primo condensatore elettrico della storia. Quando portò l'aquilone vicino alle nuvole, osservò un leggero movimento della chiave, dovuto all'accumulo di cariche elettriche, che gli permise di caricare il condensatore. Con questo esperimento si diede indirettamente il via a studi e ricerche sul plasma, anche se lo scopo iniziale riguardava i fulmini e la loro natura elettrica. Negli anni successivi al 1870 questi verranno eseguiti in maniera più precisa, prima ad opera del



chimico e fisico britannico Sir William Crookes che contribuì alla nascita dei primi tubi da vuoto, detti tubi di Crookes appunto e successivamente, da Irving Langmuir. Quest'ultimo è un chimico e fisico statunitense, che, nel 1928, oltre a dare per primo una definizione del concetto di plasma, descrivendolo come un gas ionizzato contenente elettroni liberi e ioni positivi in egual numero, in modo che la carica spaziale risultante alla fine sia nulla, vinse nel 1932 il premio Nobel grazie ai suoi esperimenti riguardanti l'interazione dei plasmi con le pareti dei contenitori nei quali gli stessi venivano generati. Il fatto che il plasma sia un gas ionizzato, implica la presenza di almeno un elettrone spaiato da un atomo o una molecola, contenente varie specie atomiche quali possono essere elettroni liberi e ioni positivi ma anche ioni negativi, molecole neutre e radicali. Pur essendo poco rappresentato spontaneamente sulla Terra, è stato stimato costituire oltre il 99,9% di tutta la materia osservabile nell'universo. Nel complesso il plasma risulta elettricamente neutro ma contenendo al suo interno delle cariche libere, è fortemente sensibile ai campi elettromagnetici ed è elettroconduttivo. In base al movimento delle sue particelle interne, può infatti dar vita ad un campo elettrico; prodotto grazie alla formazione di concentrazioni locali di carica che possono essere sia positive che negative. In questo lavoro di tesi vedremo come è possibile ricreare il plasma artificialmente e in condizioni d'ambiente terrestre, così da poterlo sfruttare per le sue proprietà sterilizzanti, in particolar modo nei confronti dei prodotti alimentari. Ciò garantisce la sicurezza d'uso, il prolungamento della shelf-life dei prodotti e secondariamente, anche il mantenimento delle caratteristiche organolettiche e fisiche che ricoprono un aspetto importante per i consumatori. Lo scopo è quello di generare specie eccitate e ioni, applicando una qualunque forma di energia che sia essa elettrica, termica, irradiazioni etc. La capacità di ionizzare una miscela di gas risulta fondamentale per poterne sfruttare il suo potenziale; infatti si possono generare plasmi con proprietà e temperature diverse in base al modo in cui vengono attivati e alla potenza di lavoro ottenuta. L'ampio range di temperature, entro cui è capace di operare, ne permette numerose applicazioni tecnologiche, sia in ambito industriale che in ambito alimentare. La tesi si focalizza sullo studio di questa tecnologia innovativa per la sterilizzazione degli alimenti, in particolare dell'utilizzo del plasma freddo a pressione atmosferica, cioè l'unico considerato idoneo per i prodotti alimentari. Il plasma freddo vanta benefici dal punto di vista della sicurezza d'uso e del miglioramento della conservabilità perché riesce a bloccare la crescita microbica e inattivare gli enzimi. Vengono inoltre mantenute le caratteristiche organolettiche e qualitative dei prodotti, grazie allo sfruttamento di basse temperature. (Pria 2006/2007).

# CAPITOLO 1

## I DANNI DEI TRATTAMENTI TERMICI

### 1.1- I trattamenti termici più utilizzati nell'industria alimentare

Da più di due secoli i trattamenti termici sono alla base dei processi tecnologici industriali, atti a garantire la salubrità e la salvaguardia delle qualità degli alimenti durante tutta la shelf-life. Garantiscono al consumatore un prodotto sicuro e di qualità con il conseguente mantenimento delle caratteristiche organolettiche e l'allungamento del periodo di conservazione. In funzione dei requisiti di conservabilità che si intendono raggiungere e delle caratteristiche dei singoli prodotti trattati, è possibile modificare la combinazione tempo/temperatura, ossia le variabili alla base di questo processo. Nei processi di trattamento termico, è possibile applicare diverse combinazioni di tempo / temperatura in funzione delle proprietà del prodotto e dei requisiti di conservabilità che si desidera ottenere. Trattandosi di trattamenti convenzionali definiti termici è intuibile che per ottenere il risultato auspicato si utilizzi il calore che potrà essere somministrato in modo diretto o indiretto, più o meno severo a seconda della tipologia di prodotto. Tenzialmente si sfruttano le alte temperature, per tempi precedentemente stabiliti in base al risultato auspicato e alla tipologia di prodotto trattato. Tra questi i più conosciuti e usati sono la pastorizzazione e la sterilizzazione. Il termine *pastorizzazione* deriva dal nome dello scienziato francese Louis Pasteur (1822-1895), che per primo sperimentò il processo su vino e birra nel 1862. È un trattamento termico blando effettuato a temperature che non superano mai i 100°C e che mirano ad allungare la shelf-life degli alimenti. Non ha alcun effetto sulle spore ma risulta essere efficiente nei confronti delle cellule vegetative in particolar modo se associato ad altre misure quali: un packaging adeguato, un'acidificazione del substrato, una refrigerazione o l'aggiunta di sale o zucchero. Possiamo distinguere diverse tipologie di pastorizzazione (*Tab.1*) in funzione delle diverse combinazioni tempo-temperatura, le quali vengono stabilite in base a:

- la composizione chimica dell'alimento;
- il grado di contaminazione iniziale;

- il pH.

Quest'ultimo fattore, va anche a determinare l'obiettivo finale del trattamento stesso e la sua influenza sulla conservazione. Alimenti considerati acidi, quindi con un pH inferiore a 4,5, avranno una shelf-life tendenzialmente più lunga e a temperatura ambiente. Si tratta quindi di prodotti come i succhi di frutta o le conserve di pomodoro. Al contrario, gli alimenti poco acidi come il latte, avranno un periodo di conservazione molto più breve (pochi giorni) e devono trovarsi necessariamente a temperature di frigoconservazione.

*Tabella 1-Criteri di classificazione per la pastorizzazione.*

<b>Criteri</b>	<b>Bassa</b>	<b>Alta</b>	<b>HTST</b>
<i>Combinazione tempo/temperatura</i>	65°C per 30 minuti	75-85°C per 2-3 minuti	75-85°C per 15-20s
<i>Aumento della shelf-life</i>	Diversi giorni in frigorifero	Diversi giorni in frigorifero	2-3 settimane in frigorifero
<i>Alimenti conservati</i>	Vino, birra, latte	Alimenti liquidi	Alimenti liquidi poco viscosi

La pastorizzazione definita “bassa”, sfrutta temperature minori rispetto alle altre due topologie ma è chiaro che, data la durata del tempo impiegato per il raggiungimento degli obiettivi, non sia conveniente all'industrie. La più usata che ha preso il posto della pastorizzazione “alta”, ormai in disuso, è la HTST ovvero High Temperature Short Time. L'uso minimo di calore, minimizza anche qualsiasi cambiamento di qualità riscontrabile negli alimenti stessi. *La sterilizzazione* è invece un processo termico in cui si raggiungono temperature superiori ai 100°C per un periodo sufficientemente lungo da poter garantire un prodotto sicuro e stabile durante tutta la shelf-life ma tale da non comprometterne eccessivamente le caratteristiche organolettiche e nutrizionali. È un trattamento volto a distruggere oltre alle cellule vegetative, anche le spore e gli enzimi, ottenendo così degli alimenti che si conservano a lungo, fino a 6 mesi, a temperatura ambiente.

Le condizioni di processo, tempo e temperatura, variano a seconda di più parametri:

- dalla resistenza termica degli enzimi o dei microrganismi presenti e presi come “target” (tempo di riduzione decimale D, curva di morte termica, valore di Z);
- dal pH; infatti l'acidità (pH<4,5) propria di prodotti come salamoie, aceto o succhi di frutta rappresenta già di per sé un ostacolo alla crescita microbica, per cui sarà sufficiente una pastorizzazione, a temperature d'ebollizione (100°C) per garantire la sterilità. Mentre

per alimenti poco acidi ( $pH > 4,5$ ) risulta necessario l'uso di temperature superiori, fino a  $140^{\circ}C$  per un'efficiente inattivazione dei microrganismi;

- dai fattori che determinano la penetrazione del calore; tra questi troviamo lo stato fisico del prodotto, dato che è chiaro che negli alimenti liquidi il calore si propaga più velocemente rispetto a quelli solidi; la temperatura del mezzo riscaldante che può essere vapore saturo o una miscela d'acqua e vapore. In questo caso la penetrazione del calore sarà più rapida quanto maggiore sarà la differenza tra l'alimento ed il mezzo di riscaldamento. Infine se la sterilizzazione viene effettuata in contenitore risultano importanti le sue dimensioni e il tipo, ovvero il materiale con cui è composto.

Le modalità di sterilizzazione disponibili alle industrie alimentari sono riassunte nella *Tabella 2*.

*Tabella2- Modalità di sterilizzazione degli alimenti*

IN CONTENITORE (sistema tradizionale)	Apparecchi discontinui	Autoclavi
		Tunnel
		Sterilmatic
	Apparecchi continui	Hydrolock
		Sterilizzatore idrostatico verticale
TRATTAMENTO DIRETTAMENTE SUL PRODOTTO	Contatto diretto	Iniettori (iniezione diretta di vapore nell'alimento)
		Infusori (aspersione del prodotto nel vapore)
	Contatto indiretto	Scambiatori (tubi concentrici, a fascio tubiero, a superficie raschiante, a piastre)

### **1.2- I danni provocati dai trattamenti termici**

Lo scopo principale dei trattamenti termici effettuati in ambito alimentare è quello di distruggere i microrganismi ed inattivare gli enzimi che possono in qualche modo alterare il prodotto e ridurne la conservabilità, evitando al contempo di comprometterne le peculiari caratteristiche sensoriali e nutrizionali. L'industria conserviera alimentare cerca di creare il compromesso migliore che permetta di tutelare gli effetti positivi del calore limitandone il più possibile quelli distruttivi nei

confronti dei prodotti trattati. L'ambizione è quella di garantire la sicurezza d'uso dell'alimento, quindi il raggiungimento della sterilità commerciale, e di ridurre contemporaneamente al minimo le perdite di qualità. La somministrazione di temperature elevate sicuramente riesce ad evitare problemi di natura biologica che insorgerebbero in caso di piena attività microbica ed enzimatica, a carico delle biomolecole naturalmente presenti nei prodotti alimentari, ovvero di zuccheri, lipidi e proteine. Gli effetti più comuni riscontrati nei confronti dei sopracitati composti "target," vengono rapidamente riassunti di seguito. Procedendo per ordine, gli zuccheri, conosciuti anche come carboidrati semplici, subiscono dei processi fermentativi da parte dei microrganismi con la produzione finale di diversi prodotti secondari. Non sempre sono considerati processi indesiderati, basti pensare che nell'industria enologica, viene appositamente sfruttata la fermentazione alcolica. Oltre alle trasformazioni subite dal metabolismo microbico, gli zuccheri sottoposti, in presenza di un liquido, a temperature elevate e prolungate, come possono essere quelle di sterilizzazione, tendono a caramellizzare ovvero a formare degli sciroppi di colore scuro, causando un imbrunimento e un cambiamento della consistenza di partenza. I lipidi invece vanno incontro a una scissione, operata da batteri dotati di enzimi lipolitici, con la liberazione di acidi grassi a catena corta come acido propionico o acido butirrico, responsabili di odori e sapori sgradevoli. Questa componente può anche essere precursore di sostanze tossiche come l'acroleina, prodotta quando viene raggiunto il punto di fumo. Questo è specifico per ogni tipologia di grasso e corrisponde alla temperatura, più o meno elevata, in cui si ha la liberazione di sostanze volatili indesiderate che oltre ad essere pericolose, modificano anche il colore del prodotto. Infine le proteine, sostanzialmente polimeri di amminoacidi, sono molto suscettibili alle alte temperature. Reagendo con uno zucchero riducente portano alla reazione di Maillard che oltre a conferire un odore e un sapore di "tostato" all'alimento, non sempre gradito, causa imbrunimento e genera composti tossici o cancerogeni per l'uomo, come l'acrilammide. In più le proteine possono subire, da parte di enzimi proteolitici, una demolizione che dà origine ad amminoacidi liberi i quali poi, tramite decarbossilazione o deaminazione, vengono ulteriormente scissi, portando alla formazione di ammoniaca, chetoacidi, idrossiacidi e ammine. Tra queste si possono citare la cadaverina, la putrescina e l'indolo che derivano rispettivamente dalla degradazione degli amminoacidi lisina, arginina e triptofano. Tale fenomeno prende il nome di proteolisi e come per gli altri composti può risultare gradita, se controllata, per prodotti in fase di maturazione (formaggi stagionati) ma mai per prodotti di origine animale. A questa materia prima, notoriamente ricca di proteine, conferisce un sapore e un aroma molto sgradevoli, caratteristiche associate alla putrefazione. I trattamenti termici da un lato riescono a controllare gli aspetti biologici finora trattati, garantendo la sicurezza d'uso ma dall'altro possono portare

cambiamenti spesso indesiderati delle caratteristiche organolettiche e di conservazione degli alimenti stessi. Questo ha motivato i ricercatori a studiare un'alternativa non termica che potesse risultare meno "dannosa" per la materia prima ma comunque affidabile. Lo scopo è quello di garantire l'immissione sul mercato di un alimento commercialmente salubre che rispetti gli standard imposti e che allo stesso tempo sia esteticamente accattivante così da renderlo il più competitivo possibile sull'ormai vasto mercato a disposizione. Una di queste opzioni non convenzionali, è il plasma freddo, che oltre a non sfruttare il calore risulta anche essere ecologico, economico e molto versatile tanto da ricoprire un ampio range d'utilizzo che spazia dal campo medico a quello dei materiali, fino ad arrivare all'elettronica e agli alimenti appunto. L'utilizzo nel settore alimentare di questa tecnologia è molto recente; tantoché dal punto di vista legislativo, gli alimenti sottoposti a tale trattamento rientrano nella categoria dei 'novel foods' e devono pertanto ricevere l'autorizzazione da parte dell'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare), che ne certifichi la sicurezza d'uso. La sua efficacia sterilizzante è stata ampiamente dimostrata e sperimentata specialmente nei confronti dei microrganismi patogeni potenzialmente presenti nei prodotti alimentari come *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Inoltre, grazie all'utilizzo di temperature non troppo elevate, riesce secondariamente a mantenere intatte alcune importanti caratteristiche che vanno a implementarne l'interesse del consumatore e il conseguente valore commerciale. (Pankaj et al.,2018).

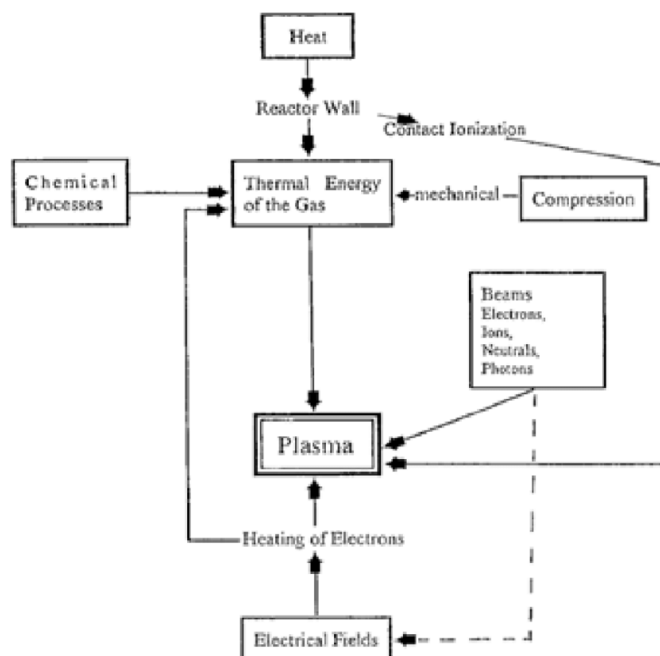
## CAPITOLO 2

### IL PLASMA

Il plasma si ottiene fornendo energia di varia natura ad una miscela di gas, è conosciuto come il quarto stato della materia e difficilmente si ritrova in condizioni d'ambiente terrestre. L'energia fornita eccita in modo particolare gli elettroni, che a loro volta la trasmettono alle specie più pesanti tramite delle collisioni. In relazione alle condizioni utilizzate per la ionizzazione (energia applicata e trasferita al plasma), il plasma può essere caratterizzato da bassi (plasma freddo) o alti (plasma caldo) livelli di temperatura.

#### 2.1 -Metodi di produzione

Il plasma è riproducibile artificialmente in ambiente terrestre in più modi (*Fig.2*):



*Figura 2-Principi di generazione del plasma*

*(Conrads et al., 2000)*

- Fornendo energia termica.  
Ciò può avvenire in maniera diretta, utilizzando fonti di calore che entrano a stretto contatto con il gas; ad esempio delle fiamme che andranno a innescare una serie di reazioni esotermiche, utilizzate come fonte di energia primaria per eccitare gli elettroni. Oppure può verificarsi attraverso un brusco surriscaldamento del gas, innescato da una semplice compressione meccanica adiabatica, fino al punto di formazione del plasma, con conseguente aumento di pressione.
- Applicando una corrente elettrica attraverso dei gas neutri, che provocano la dissociazione delle molecole gassose.  
Quando il potenziale elettrico fornito arriva a superare la tensione di breakdown, che definisce il valore di tensione da oltrepassare in modo da portare il gas allo stato di plasma, si forma una nuvola di particelle formata da elettroni, con massa trascurabile, ioni e specie pesanti. A questo punto il sistema tende a termalizzarsi in quanto gli elettroni, accelerati dal campo elettrico e particolarmente reattivi, collidono con le molecole e gli atomi circostanti cedendogli la propria energia e promuovendo altri processi di ionizzazione che mirano in ogni caso, al raggiungimento della temperatura elettronica assestandosi in uno stato di equilibrio termico.
- Tramite fasci energetici che moderano il volume di un gas.  
Sono composti da elettroni, ioni, fotoni, protoni oppure da particelle neutre. In quest'ultimo caso il plasma che viene generato ha come ulteriore vantaggio quello di risultare imperturbabili dai campi elettrici e magnetici.

Il metodo più comunemente usato per generare e sostenere un plasma a bassa temperatura, consiste nell'applicazione di un campo elettrico a un gas neutro. Il campo elettrico, entrando in collisione con atomi e molecole già presenti all'interno del gas o con le superfici degli elettrodi, genera innumerevoli particelle cariche che alla fine vengono bilanciate da delle perdite in modo che si sviluppi un plasma con una temperatura stazionaria (Conrads et al., 2000).



## **2.2- Parametri di classificazione del plasma**

### *2.2.1- Densità elettronica*

I parametri che contribuiscono alla classificazione del plasma sono molteplici. Innanzitutto, sappiamo che il plasma viene definito come “gas parzialmente o totalmente ionizzato”, questa distinzione dipende sostanzialmente dalla densità elettronica delle specie che lo compongono. In particolar modo è determinata dal rapporto tra la densità delle specie cariche, ovvero elettroni e ioni, e quelle neutre. Se questo, risulta essere pari a 1, si può parlare di plasma totalmente ionizzato, dominato da collisioni tra ioni ed elettroni. Questa tipologia è generalmente più frequente per via delle forze elettrostatiche che la governano (forza di Coulomb). Altrimenti, se le specie neutre sono maggiormente presenti nel gas a discapito degli ioni, il plasma sarà solo parzialmente ionizzato. In esso saranno coinvolti principalmente processi collisionali tra elettroni e molecole neutre.

### *2.2.2 -Temperatura*

Il valore di questo parametro, fondamentale e fortemente caratterizzante, è determinato dall'energia media delle diverse specie presenti all'interno dello stesso plasma che essendo un sistema multicomponenti, presenterà al suo interno temperature multiple. Tra le specie troviamo gli elettroni che rappresentano la parte dimensionalmente più piccola e di conseguenza anche la più mobile; e le specie neutre che, insieme agli ioni, vanno a costituire la parte più pesante e statica, ovvero quella che determinerà la temperatura complessiva

Di facile intuizione a questo punto, risulta essere la dipendenza elettronica, in quanto rappresenta la frazione più reattiva e dinamica dei fenomeni collisionali. Tra le collisioni che avvengono all'interno del plasma e che sono indispensabili per eccitare le particelle pesanti, distinguiamo:

- Collisioni elastiche; quando non contribuiscono alla variazione dello stato delle specie neutre ma ne innalzano leggermente l'energia cinetica;
- Collisioni anelastiche; quando l'energia degli elettroni è sufficiente per modificare lo stato elettronico delle specie neutre determinando così la generazione di specie eccitate, o di ioni.

Seguendo questo concetto è stato possibile fare una classificazione che suddivide i plasmi in due diverse tipologie, plasmi definiti LTE (- Local thermodynamic equilibrium-) e plasmi non-LTE (- Non-local thermodynamic equilibrium-). Questa distinzione è basata sul raggiungimento o meno dell'equilibrio termodinamico tra le specie pesanti (ioni e neutri) e gli elettroni. Per equilibrio termodinamico, in questo campo, si intende l'acquisizione dell'equilibrio termico tra tutte le particelle che lo costituiscono. La *Figura 3* entra più nel dettaglio, riportando un'ulteriore distinzione in plasmi ad alta temperatura (High temperature plasma) anche definiti "plasmi caldi" da quelli a bassa temperatura (Low temperature plasma). Nel primo caso la temperatura degli elettroni è inizialmente molto più alta rispetto quella delle particelle pesanti ma successivamente, attraverso varie collisioni, si raggiunge uno stato di equilibrio termico nell'intervallo di temperature che va da  $10^6$  a  $10^8$  K. A ragione di queste condizioni la temperatura delle particelle più pesanti risulta essere sostanzialmente identica alla temperatura degli elettroni, garantendo che vi sia una singola temperatura in ogni punto dello spazio. I plasmi a bassa temperatura invece sono caratterizzati da una temperatura elettronica significativamente elevata, circa 11605 K ( $T_e$ ), così da permettere l'attivazione di fenomeni ionizzanti, rispetto invece a quella delle particelle pesanti, circa 300 K ( $T_i$ ), quindi praticamente prossime alla temperatura ambiente. Data la differenza di massa tra gli elettroni e le altre particelle, la temperatura finale dei plasmi è complessivamente determinata dalle specie neutre, ecco spiegato il motivo per cui sono conosciuti con la nomea di plasmi 'freddi' ( $T_e \gg T_i$ ). Questi in particolare (*Fig. 3*), possono subire un'ulteriore caratterizzazione in "Thermal plasma" e "Non-thermal plasma" ovvero sia rispettivamente in plasmi LTE e non-LTE. L'ottenimento di un plasma termico (Thermal plasma) implica il rispetto di condizioni particolarmente restrittive. Deve infatti essere governato esclusivamente da collisioni micro-reversibili; ciò sta a significare che ogni tipo di collisione deve essere bilanciata dal suo inverso (ad esempio ionizzazione e ricombinazione/ eccitazione e rilassamento). Inoltre, per poter permettere il raggiungimento del quasi-equilibrio, la temperatura, la densità e la conduttività termica del plasma stesso, devono essere sufficientemente deboli. Per queste ragioni, risulta lecito aspettarsi che la maggior parte dei plasmi esistano in situazioni diverse e lontane da queste condizioni impostate. Parliamo quindi dei plasmi non termici (Non-thermal plasma), in cui le particelle pesanti non riescono a raggiungere un equilibrio termodinamico stabile con gli elettroni. Possono essere generati sia sottopressione che a pressione atmosferica. Quest'ultimi verranno successivamente approfonditi perché altamente interessanti nelle applicazioni delle industrie alimentari. (Nehra et al.,2008; Tendero et al.,2006).

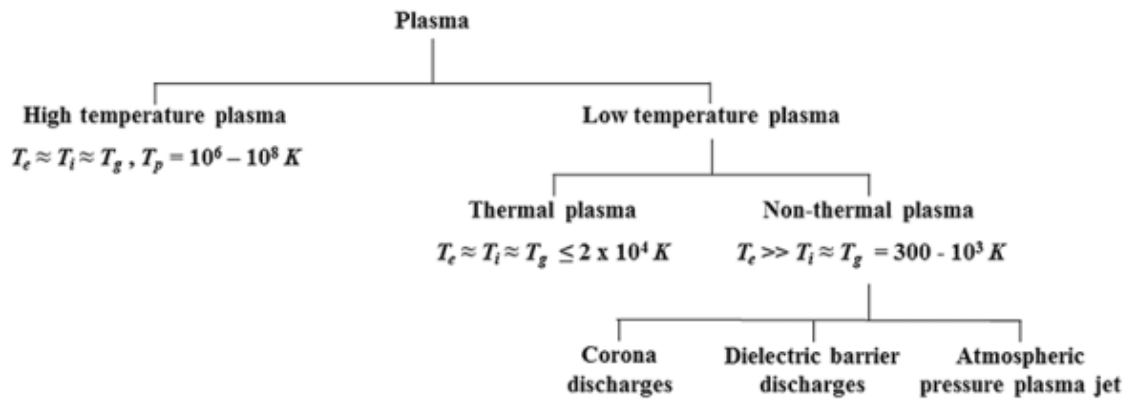


Figura 3-Classificazione del plasma in funzione della temperatura (Lee et al., 2017)

$T_e$ =temperatura elettronica

$T_i$ =temperatura ioni

$T_g$ =temperatura particelle pesanti (ioni e neutroni)

$T_p$ =temperatura plasma

### 2.2.3 -Pressione atmosferica

Altro elemento caratterizzante è la pressione dell'atmosfera entro cui il plasma viene generato. Questo parametro risulta di fondamentale importanza volendo poi usufruire del plasma per applicazioni a livello industriale. Infatti lavorare con plasma, prodotto a bassa pressione (da 10 a 10 kPa), oltre a risultare difficoltoso, è anche economicamente molto dispendioso. Ciò dipende dal fatto che il sottovuoto va mantenuto utilizzando dei costosi reattori a vuoto. Questa tipologia di plasmi è sempre non-LTE, dal momento in cui la temperatura elettronica non risulta mai essere superiore a quella delle particelle pesanti. La *Figura 4* mostra come la transizione da plasma non-LTE al plasma LTE sia strettamente dipendente all'aumento di pressione. Si riduce significativamente l'energia acquisita negli urti tra le particelle ma allo stesso tempo aumenta, la frequenza delle collisioni, inducendo anche quelle elastiche. Ciò fa sì che la temperatura degli elettroni ( $T_e$ ) e delle particelle pesanti ( $T_g$ ) inizialmente molto diversa, diminuisca avvicinando il plasma ad uno stato LTE, senza tuttavia raggiungerlo realmente. (Tendero et al.,2006).

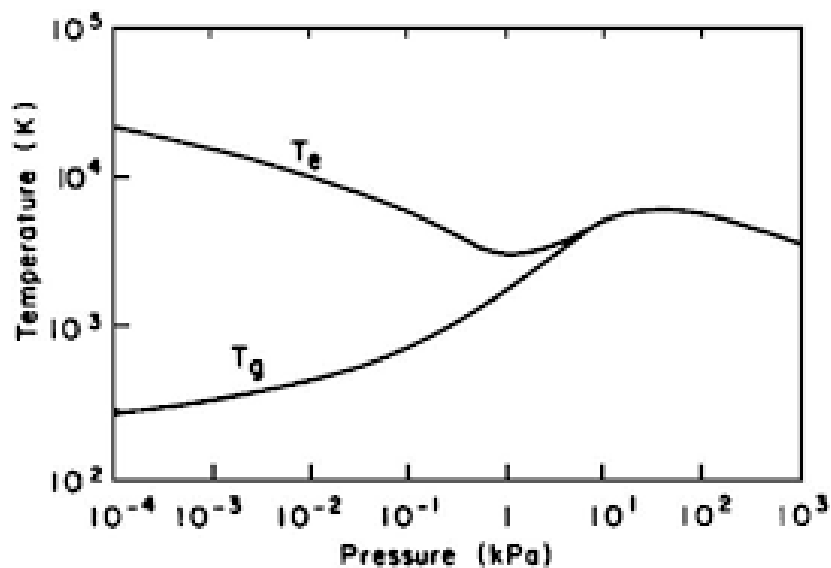


Figura 4- Transizione da plasma non-LTE a plasma LTE (Tendero et al.,2006)

*Te=temperature elettroni*

*Tg=temperatura particelle pesanti (ioni e neutroni)*

### 2.3-Generatori di plasma atmosferico

I plasmi ad alta temperatura non sono adatti per il trattamento degli alimenti perché il trasferimento di calore, dal plasma all'alimento, provocherebbe un deterioramento della qualità dello stesso, soprattutto delle componenti termosensibili. Inoltre i plasmi generati sottopressione devono essere contenuti in costosi involucri ermetici (enormi reattori a vuoto) che li rendono poco convenienti. Pertanto, per la sterilizzazione dei prodotti alimentari e il mantenimento delle loro componenti, è possibile sfruttare esclusivamente i plasmi non-LTE, ottenuti a pressione atmosferica (APP=Atmospheric pressure plasma). I loro vantaggi economici e operativi hanno portato allo sviluppo di una numerosa varietà di sorgenti di plasma atmosferico adatte alle più disparate applicazioni scientifiche e industriali.

Questa tipologia di plasma chiamato "plasma freddo" può essere classificato sia in funzione alla frequenza utilizzata per eccitare gli elettroni: quindi in DC (corrente diretta) a bassa frequenza, in radio frequenza (RF) e in microonde; sia in base alle scariche elettriche, diversamente prodotte in base alla struttura dell'apparecchiatura: distinguiamo la scarica a corona, scarica a barriera dielettrica, scariche a microonde e in getto di plasma a pressione atmosferica.

### 2.3.1- La scarica a Corona

La scarica a Corona è stato il primo schema utilizzato per generare una scarica non-LTE.

Esiste in diverse forme, variabili a seconda della polarità del campo elettrico e della configurazione geometrica dell'elettrodo. Questo tipo di apparecchiatura è caratterizzata da una coppia di elettrodi asimmetrici tra i quali si genera un campo elettrico che li alimenta con una tensione di corrente che può essere sia continua che pulsata.

La scarica Corona non è mai uniforme perché solo in prossimità di uno dei due elettrodi si genera il campo elettrico, la ionizzazione e la luminosità. Ad esempio, se all'elettrodo appuntito o a filo viene applicata una tensione negativa (*Fig.5*), gli ioni positivi vengono accelerati attraverso il filo stesso in cui vengono emessi gli elettroni secondari poi accelerati all'interno del plasma (scarica corona negativa). Questi entreranno in collisione con le particelle pesanti inducendo la formazione di specie reattive.

Risulta sufficiente modificare la polarità dell'elettrodo collegato all'alimentatore per ottenere una scarica a corona positiva. (Pria 2006/2007; Tendero et al.,2006).

Lo sviluppo di una scarica a corona procede sequenzialmente attraverso le seguenti fasi:

1. realizzazione della configurazione asimmetrica degli elettrodi;
2. applicazione di un'alta tensione;
3. formazione di ioni positivi;
4. creazione da parte dei fotoni degli elettroni secondari con energia elevata;
5. sviluppo, più vicino al catodo, di una nuova nube elettronica con energia minore.

L'applicazione della scarica a corona, più conosciuta e di nostro interesse, è quella riguardante la purificazione delle acque. (Nehra et al., 2008).

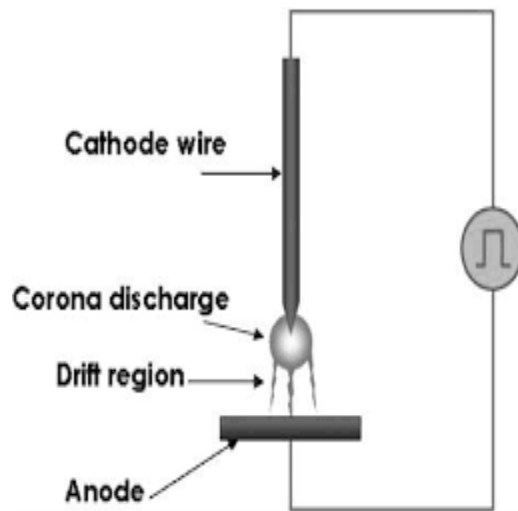


Figura 5- Scarica a corona (Tendero et al.,2006)

### 2.3.2- Dielectric Barrier Discharge

Il Dielectric Barrier Discharge (DBD) (Fig.6) è composto da due elettrodi metallici di cui almeno uno ricoperto da uno strato dielettrico di ceramica, quarzo, polimero o vetro. La presenza di uno o più strati isolanti su o tra i due elettrodi alimentati da una corrente alternata, è uno dei modi più semplici per formare una scarica anche detta scarica silenziosa, in grado di produrre plasma a pressione atmosferica.

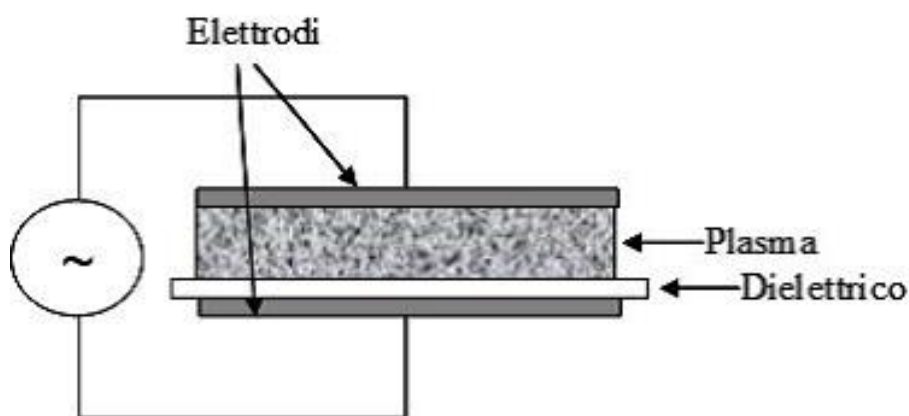
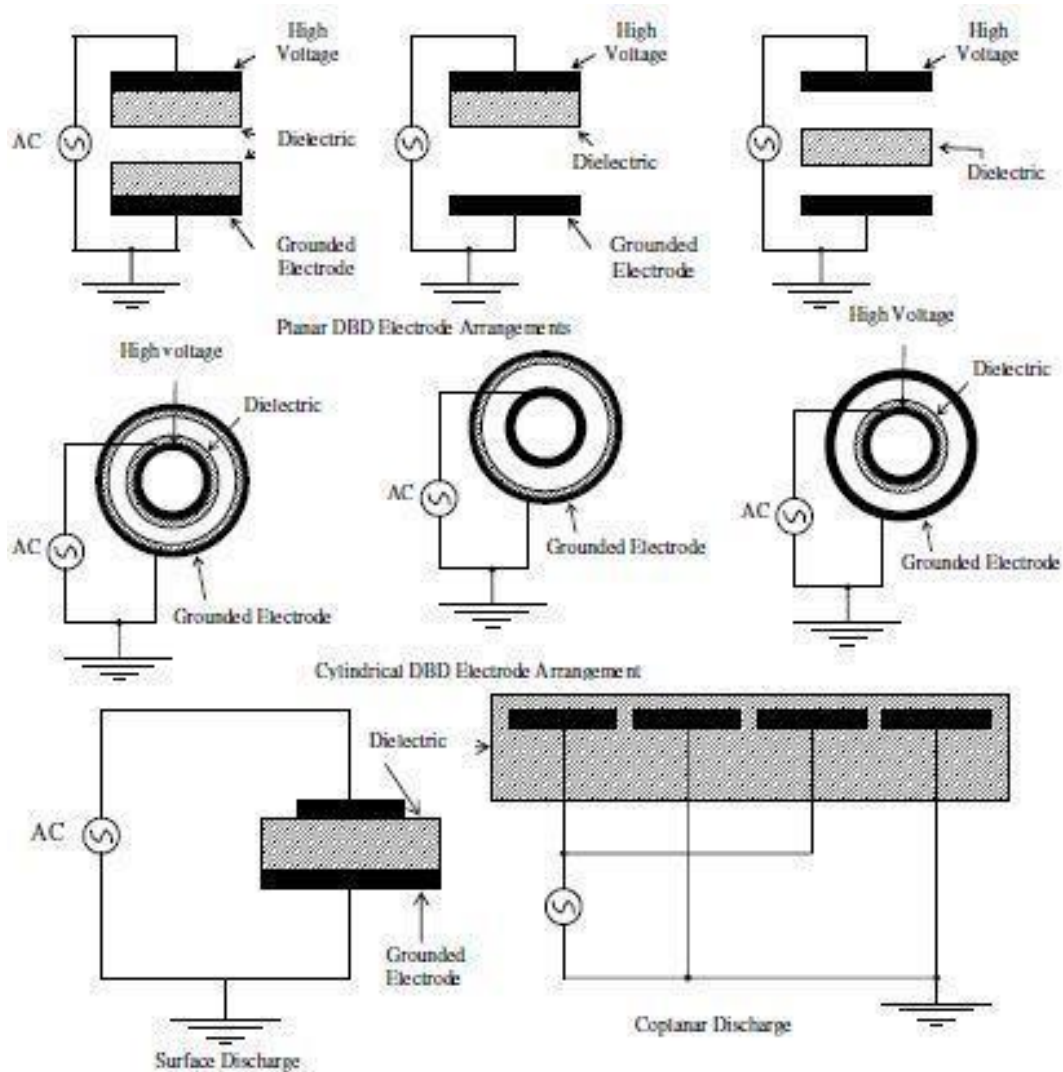


Figura 6- Dielectric Barrier Discharge (DBD) (Tendero et al.,2006)

A differenza della scarica a corona, il DBD è in grado di operare entro un range più ampio di pressioni del gas che va da  $10^4$  a  $10^6$  Pa. Inoltre, grazie alla sua configurazione, può essere

applicato direttamente sull'alimento oppure ai materiali d'imballaggio. (Muhammad et al.,2018). I due elettrodi possono assumere molteplici configurazioni geometriche, riportate in *Figura 7*, ognuna delle quali avrà una tipologia di macchinario specifico con generazione di scariche elettriche differenti. Abbiamo dispositivi classici definiti volumetrici, dispositivi superficiali e infine complanari:



*Figura 7- Disposizione degli elettrodi nelle diverse configurazioni DBD (Nehra et al.,2008)*

- I dispositivi classici possono avere disposizioni planari o coassiali a seconda della posizione degli elettrodi.

Per quanto riguarda quelli planari, i due elettrodi sono paralleli tra loro e sempre interposti da uno strato dielettrico, su uno o su entrambi. In figura sono riportate tutte le possibili configurazioni: rispettivamente si vede che il dielettrico si trova su entrambi gli elettrodi, solo sull'elettrodo alimentato e infine solamente frapposto tra i due senza alcun legame. La disposizione coassiale invece consente di avere un elettrodo dentro l'altro con almeno una o due barriere dielettriche posizionate, come per i precedenti, in vario modo: sul lato esterno dell'elettrodo interno, sul lato interno dell'elettrodo esterno o su entrambi gli elettrodi cilindrici.

- Il dispositivo superficiale è composto da un elettrodo sottile e allungato, posto su una superficie dielettrica e un contro elettrodo esteso invece sul lato opposto del dielettrico. In questa configurazione, lo spazio di scarica non è chiaramente definito e quindi questa tende a propagarsi lungo tutta la superficie dielettrica.
- Esistono anche dispositivi complanari che sono frutto della combinazione delle configurazioni precedentemente elencate. Questi in certi casi, servono per migliorare l'efficienza del trattamento. Questo è caratterizzato da coppie di lunghi elettrodi paralleli con polarità opposta, che sono incorporati all'interno di una massa dielettrica vicino a una superficie. (Nehra et al., 2008).

### *2.3.3-Scariche a microonde*

I vari sistemi a microonde (Microwave Induced Plasma-MIP) si basano sulla loro intrinseca capacità di trasmettere energia agli elettroni contenuti nel plasma. A differenza degli altri apparecchi, finora trattati, la loro struttura non comprende la presenza di elettrodi (*Fig.8*) perché il funzionamento si basa sull'utilizzo di onde elettromagnetiche e non più sulla produzione di campi elettrici.



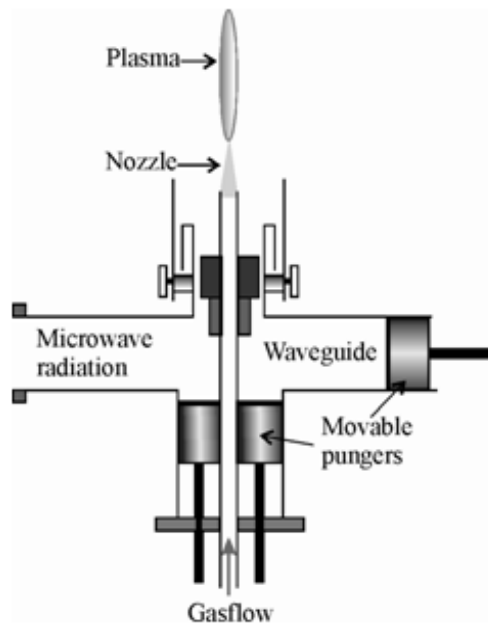


Figura 8-Microwave Induced Plasma-MIP (Tendero C. et al.,2006)

L'intensità e la densità delle microonde generate, utilizzando livello di potenza compreso tra 50 e 1000 W, sono rispettivamente  $0,25 \text{ W m}^{-2}$  e 2,45 GHz. Queste vengono assorbite dal gas di processo promuovendo conseguenti collisioni anelastiche e reazioni di ionizzazione che permettono la generazione del plasma. (Muhammad et al.,2008).

#### 2.3.4- Plasma Jet a pressione atmosferica

Il dispositivo (Fig. 9), conosciuto come Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) è costituito da due elettrodi attraverso cui scorre una miscela di gas. A questi viene applicata radiofrequenza (RF) con una certa potenza che produce un flusso effluente ad alta velocità di specie chimiche altamente reattive. Una volta che il gas esce dall'ugello, gli ioni e gli elettroni vengono rapidamente persi per ricombinazione, ma vengono conservate le specie metastabili neutre e i radicali.

Le caratteristiche operative di APPJ sono le seguenti:

1. produce un plasma a pressione atmosferica stabile, omogeneo e uniforme;
2. funziona a potenze di radiofrequenza (RF) di 250 W;

3. il gas ionizzato dal getto di plasma esce attraverso l'ugello dove è con precisione diretto sul substrato;
4. funziona senza una copertura dielettrica sull'elettrodo;
5. la temperatura del gas di scarico è di soli 50 ° C, consentendo di trattare anche superfici delicate senza causare danni. (Nehra et al., 2008).

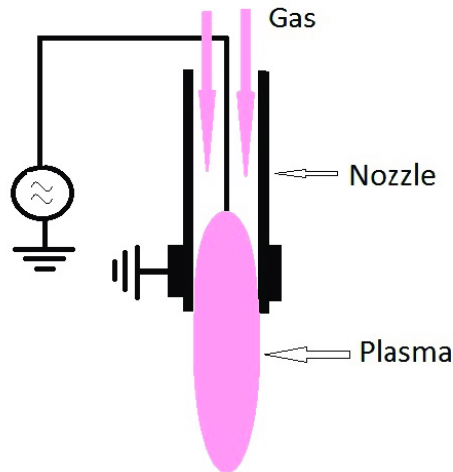


Figura 9-Torcia APPJ (Tendero C. et al.,2006)

La seguente tabella (Tab.3) riassume le caratteristiche delle sorgenti di plasma atmosferico, classificandole in base al gas di processo maggiormente utilizzato, alle proprietà del plasma (temperatura e densità degli elettroni, temperatura del gas) e infine al metodo di eccitazione sfruttato. (Tendero, et al.,2006; Nehra et al., 2008).

Tabella 3- caratteristiche delle sorgenti di plasma atmosferico (Tendero. et al.,2006; Nehra et al.,2008) ( $T_e$ =temperatura elettronica;  $T_g$ =temperatura particelle pesanti;  $n_e$ =densità elettronica)

Sorgente	Gas di lavoro	Proprietà del plasma	Eccitazione
<b>Scarica a corona</b>	Aria	$T_e = 40000-60000$ K $T_g < 400$ K $n_e = 10^{15}-10^{19} \text{ m}^{-3}$	Corrente Diretta (DC) o diretta pulsata
<b>DBD</b>	$N_2 ; O_2 ; NO$ Gas rari	$T_e = 10000-100000$ K $T_g < 700$ K $n_e = 10^{18}-10^{21} \text{ m}^{-3}$	Corrente Alternata (AC)

	Alogenuri		
<b>MIP</b>	Elio Argon	Te = 13000-14000 K Tg = 2400-2900 K ne $\approx 10^{21} \text{m}^{-3}$	Microonde
<b>APPJ</b>	Ossigeno Elio Argon	Te = 10000-20000 K Tg < 600 K ne = $10^{17}-10^{18} \text{m}^{-3}$	Radio Frequenza (RF)

Tra tutte queste sorgenti di plasma, il DBD e il PlasmaJet sono le configurazioni più ampiamente esplorate nella ricerca alimentare, poiché questi sono semplici, facili da utilizzare e alcune tipologie sono anche disponibili commercialmente. (Misra et al., 2016).

## 2.4 -Ruolo svolto dai parametri di processo

La potenzialità di questa tecnologia innovativa, è inevitabilmente dipendente oltre che dalla durata di esposizione al trattamento stesso, direttamente proporzionale alla sua efficacia; anche da altri importanti parametri di processo:

- il tipo di gas utilizzato; in base alla composizione chimica e alla quantità di gas di processo utilizzato infatti è possibile prevedere le future specie reattive che si generano, a seguito dell'eccitamento, e il loro impatto sul prodotto. Questa informazione preventiva non va trascurata; basti pensare che per l'inattivazione enzimatica, spiegata successivamente in dettaglio, i ROS e i RON hanno ruoli diversi. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) agiscono infatti sugli amminoacidi liberi della catena peptidica mentre le specie reattive dell'azoto (RNS) su quelli aromatici. (Misra et al.,2016).  
Solitamente risulta più conveniente ed economico lo sfruttamento dell'aria atmosferica come gas di processo perché i gas nobili sono molto costosi e difficili da reperire, tuttavia per ottenere specie neutre è indispensabile l'utilizzo di argon puro o miscele che lo comprendano.
- la distanza tra la sorgente di plasma e il campione da trattare, si ricollega al parametro precedente perché svolge un ruolo fondamentale per la concentrazione delle specie reattive. Si dà il caso, infatti che la concentrazione dei ROS aumenta con l'allontanamento tra la sorgente di scarica e la superficie bersaglio perché ha più possibilità di entrare in

contatto e miscelarsi con l'aria. Tuttavia, al contempo è chiaro che le specie neutre come la concentrazione del gas di processo diminuiscono.

- la modalità di esposizione; si basa sul contatto diretto del plasma con il prodotto da trattare o meno, ciò influisce sulla quantità di calore trasmessa. Generalmente è preferibile un'esposizione diretta rispetto a quella indiretta in quanto quest'ultima riduce l'importo del calore trasmesso e la potenza al minimo, in quanto le particelle cariche tendono a ricombinarsi prima di raggiungere il campione e allo stesso modo, le specie reattive neutre di breve durata, potrebbero addirittura non raggiungerlo. (Muhammad et al., 2018).

## CAPITOLO 3

### EFFETTI STERILIZZANTI

L'uso del plasma come metodo di sterilizzazione, efficace nella distruzione dei microrganismi e l'inattivazione enzimatica, è stato brevettato nel 1968 ed applicato per la prima volta nel 1989, dopo la conduzione d'importanti ricerche sui suoi meccanismi. Il trattamento a pressione atmosferica può inattivare efficacemente una vasta gamma di microrganismi tra cui anche spore e virus. Il suo effetto può essere completamente selettivo, il che significa che può danneggiare i patogeni non compromettendo l'integrità dell'ospite. I vantaggi di questa tecnologia nel campo batteriologico sono dovuti al fatto che agisce in maniera molto rapida ed efficace. Nonostante le modalità effettive di sterilizzazione e disinfezione non siano ancora pienamente comprese, secondo le conoscenze attuali si pensa che alla base ci siano meccanismi fisici dovuti alla produzione di specie reattive, radicali liberi e radiazioni ultraviolette, ma anche meccanismi biologici che comprendono processi cellulari come rottura della membrana plasmatica e danni. Infatti le macromolecole cellulari da un lato vengono danneggiate, in base alla loro capacità di penetrazione, dall'energia delle radiazioni UV; dall'altro le specie reattive potrebbero provocare stress ossidativo causando danni irreversibili in particolar modo alle proteine che costituiscono il DNA e ai lipidi.

#### **3.1-Inattivazione microbica**

La sterilizzazione è un processo termico volto a distruggere le cellule vegetative e le spore. Tecniche convenzionali, come quelle che utilizzano autoclavi o forni, si basano sull'inattivazione metabolica irreversibile, ossia sulla degradazione di elementi vitali o importanti componenti strutturali del microrganismo stesso, per mezzo delle alte temperature. La sterilizzazione tramite il plasma funziona invece in maniera differente, si avvale infatti della sua capacità ossidativa nei confronti delle macromolecole cellulari, grazie alla sua capacità di generare una serie di specie attive. Tra queste vi sono i radicali liberi e i prodotti chimici; ad esempio, ossigeno atomico (O), ozono (O<sub>3</sub>), idrossile (OH), specie ossidative (ROS) e specie nitrossidative (RNS), ma anche radiazione UV ad alta energia, radiazione nello spettro visibile,

particelle cariche, campi elettrici alternati; nel complesso, svolgono un ruolo chiave nel processo di inattivazione microbica. (Moisan et al.,2002).

L'inattivazione delle cellule microbiche può seguire tre meccanismi (Fig.10):

1. permeabilizzazione diretta della membrana cellulare o della parete, con la conseguente perossidazione lipidica e dei polisaccaridi. Si ha quindi la perdita di componenti cellulari importanti, incluso potassio, acido nucleico e proteine;
2. modificazione chimica che vede l'accumulo di malondialdeide (MDA), il prodotto ultimo di tutti i processi ossidativi a carico degli acidi grassi polinsaturi. Questo, partecipa alla mutazione del DNA, danneggiando gravemente le cellule;
3. danno critico delle proteine intracellulari ad opera delle specie ossidative (ROS) o nitrosative (RNS);

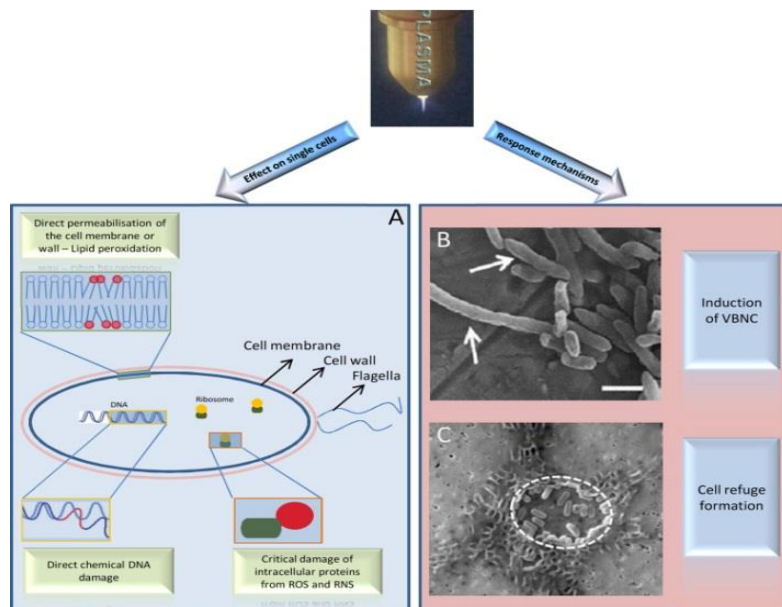


Figura 10- Effetti del plasma sulle cellule microbiche (Prochnowa et al., 2014)

L'APP (Atmospheric Pressure Plasma) produce una risposta batterica diversa a seconda dalla tipologia di microrganismi su cui viene applicata. I batteri i Gram-negativi generalmente risultano essere molto più vulnerabili al trattamento rispetto ai Gram positivi. Quest'ultimi hanno la parete esterna formata per il 90% di uno spesso strato protettivo, il peptidoglicano, mentre nei Gram-negativi questo occupa solo il 10% del rivestimento esterno che è costituito essenzialmente dalla membrana esterna. Ciò mette in evidenza l'azione diretta del plasma sul rivestimento protettivo

esterno dei microbi (membrana e parete cellulare). Nel complesso però, tutte le cellule sono in grado di elaborare una serie di meccanismi di risposta (*Fig.10*) prima di essere definitivamente inattivate che comportano dei cambiamenti fisiologici e morfologici importanti. Oppure l'ingresso in uno stato VBNC, "Viable But Not Culturable" caratterizzato da microrganismi che continuano ad avere una membrana intatta, un'attività respiratoria normale, la trascrizione genica e la sintesi proteica, ma non formano colonie. L'effetto del trattamento al plasma sulle cellule microbiche dipende inoltre dalla quantità d'acqua libera presente nel substrato. Risulta infatti meno efficace nei prodotti disidratati, piuttosto che negli alimenti con un elevato contenuto in acqua, dato che le specie reattive interagiscono con l'acqua, portando alla formazione di ioni OH\* molto reattivi e dannosi. (Dobrynin et al., 2009; Prochnowa et al., 2014).

### *3.1.1- Azione sulle spore*

Studi interessanti portati avanti da Moisan nel 2002, si focalizzano prettamente sui meccanismi d'inattivazione delle spore di *B. subtilis* da parte di  $N_2 / O_2$ . È stato dimostrato che i processi fisico-chimici attivati durante il trattamento al plasma potrebbero essere spiegati analizzando le curve di sopravvivenza. In genere i sistemi di sterilizzazione convenzionali producono curve di sopravvivenza rappresentate da un'unica linea retta, perché la morte microbica risulta essere direttamente proporzionale all'esposizione al calore. Al contrario, l'esposizione al plasma, che sia essa diretta o indiretta, fornisce grafici di sopravvivenza con tre fasi di inattivazione ben distinte (*Fig.11*). Ciò implica che, come in precedenza, il numero di microrganismi sopravvissuti diminuisce in funzione della durata del trattamento ma, in questo caso, con costanti di tempo differenti, cioè con meccanismi cinetici differenti.

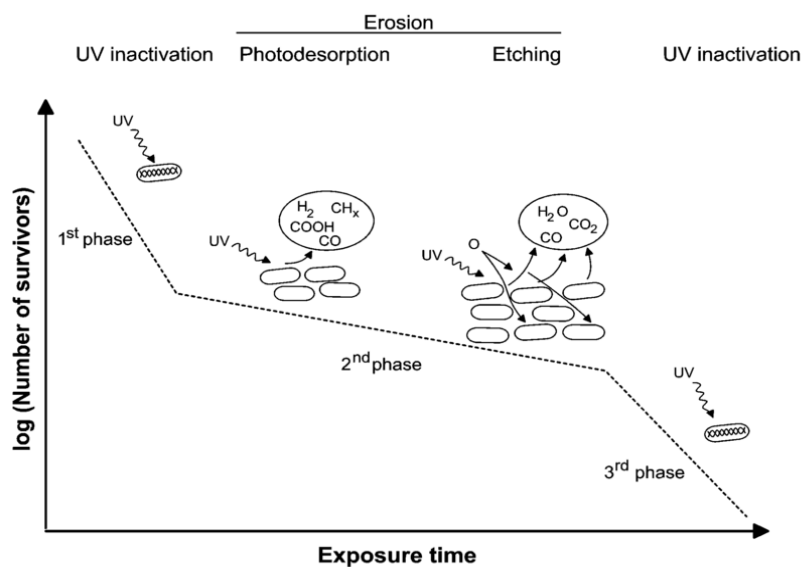


Figura 11-Curva di sopravvivenza trifasica della sterilizzazione al plasma (Moisan et al.,2002)

- Nella prima fase, l'inattivazione delle spore è garantita dai fotoni UV che riescono a passare attraverso gli strati di protezione che rivestono le spore stesse, intaccandone il DNA. Tuttavia, a causa della profondità di penetrazione media dei fotoni UV nella materia, ci sono casi in cui non riescono a raggiungere il materiale genetico per indurre la morte delle spore entro tempi ragionevoli. Questa limitazione dipende ovviamente dal numero, dallo spessore e dalla composizione chimica dei loro strati protettivi, dalla posizione del DNA rispetto alla superficie esposta alle radiazioni UV e inoltre dalla presenza di eventuali materiali organici che le ricoprono e proteggono (ad esempio, detriti cellulari) o dall'aggregazione di più spore tra loro.
- La fase 2 è in parte dipendente dal tasso di erosione dei vari materiali che ricoprono le spore ancora vive. È più lenta, perché dura almeno 3 volte più a lungo della fase 1 ma il livello di erosione raggiunto durante questa fase è più importante. Questa termina quando le spore inattivate e i detriti di ogni tipo che rivestono le spore viventi sono stati sufficientemente erosi in modo tale da consentire un accesso più facilitato ai fotoni UV che consentono di accelerare nuovamente la cinetica di distruzione caratterizzante la terza ed ultima fase.



- Il terzo ed ultimo tratto di curva risulta essere più breve in presenza di specie reattive come gli atomi di ossigeno o quando è stata massimizzata l'intensità d'emissione dei fotoni UV. (Scholtz et al 2015; Moisan et al.,2002).

La Figura 12 mostra l'inattivazione delle spore di *Bacillus subtilis* trattate con plasma ottenuto da differenti tipologie di gas: argon puro e una miscela composta al 5% da  $O_2$  e il restante 95% da argon (Ar). (Moisan et al., 2002). La scarica di argon puro produce, entro un ciclo di 40 minuti, un grafico a 2 segmenti con un numero residuo di spore, mentre l'aggiunta di  $O_2$  porta, nello stesso intervallo di tempo, a 3 segmenti lineari e alla sterilizzazione completa. Questo perché l'argon puro è in grado di sfruttare solo le radiazioni UV non essendoci radicali liberi disponibili nella fase gassosa. Ciò è possibile, attraverso la distruzione del microrganismo, provocata dai protoni, che vanno a rompere i legami chimici tra le componenti vitali, e contemporaneamente, dai fotoni UV che portano alla formazione di composti volatili (ad esempio, CO). Al contrario, quando si aggiunge  $O_2$ , anche in percentuale minima, dissociandosi (anche solo parzialmente), genera le specie reattive, come possono essere radicali atomici e molecolari, ad esempio O e  $O_3$ . In questo caso si ha infatti una spontanea formazione di composti volatili, i quali pur non dipendendo direttamente da protoni e fotoni UV, riescono a lavorare sinergicamente aumentando l'efficienza di trattamento (Moisan et al.,2002).

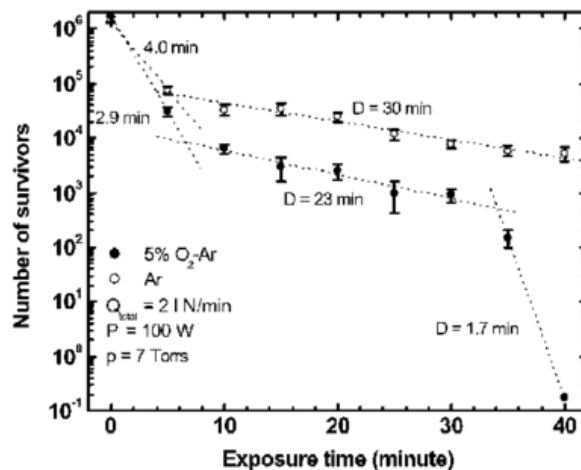


Figura 12-Curve di sopravvivenza delle spore di *B. subtilis* esposte a un flusso residuo di bagliore. Con aggiunta di  $O_2$  all'argon. (Moisan et al.,2002)

### 3.2-Inattivazione enzimatica

Negli alimenti sono naturalmente presenti diversi enzimi (polifenolossidasi, perossidasi, pectinesterasi, lipasi, amilasi ecc.) la cui attività può causare effetti negativi sulla qualità dei prodotti (come un imbrunimento superficiale o la perdita irreversibile di vitamine) e portare, così, ad una riduzione della loro shelf-life. Per questo motivo, la loro effettiva inattivazione risulta fondamentale. Negli alimenti si trovano degli enzimi cosiddetti endogeni, ovvero propri della materia prima che sono onnipresenti in frutta e verdura come la perossidasi (POD) e la polifenolossidasi (PPO). Tappi et al. (2014) hanno condotto degli studi su mele Pink Lady di IV gamma utilizzando il plasma ad aria DBD generato a 15 kV per tempi di trattamento diversi (10,20 e 30 minuti). Hanno scoperto che l'attività residua di PPO nelle fette di mela veniva ridotta del 42% dopo 30 minuti di trattamento. L'imbrunimento nei campioni trattati rimaneva inalterato mentre nei campioni non trattati aumentava del 62%. Bußler et al. (2015) hanno utilizzato un MIP a torcia (potenza assorbita ~ 1,2 kW, portata del gas 20 L /minuto) per disattivare lo stesso enzima in mele e patate appena tagliate. Hanno osservato che l'attività di PPO, dopo 10 minuti di trattamento, si riduce di circa il 62% nel tessuto di mele e il 77% in quello di patate appena tagliate. Le perossidasi (POD) sono spesso associate alle ossidazioni lipidiche e fenoliche con conseguente deterioramento del sapore e del colore dell'alimento. Una serie di esperimenti sulla sua inattivazione nell'estratto di pomodoro è stato condotto da Pankaj et al. (2013), utilizzando lo stesso apparato al plasma DBD ma fruttando tre diverse tensioni (30, 40, 50 kV). Gli autori hanno dedotto che a tensioni più elevate, il calo dell'attività enzimatica è più drastico rispetto a tensioni inferiori in cui si manifesta in maniera più graduale. In ogni caso dopo 5 minuti, è stato osservato un valore d'inattivazione enzimatica prossimo allo zero. In un altro studio condotto da Tappi et al. (2016), DBD ad alta tensione, (15 kV) è stato applicato su fette di melone di IV gamma. Dopo 10 minuti di trattamento è stata osservata una diminuzione dell'attività residua di POD del 17%. Esistono poi altre tipologie di enzimi che si trovano in altre materie prime, diverse da frutta e verdura. Tra queste vi è la farina in cui l'enzima lipasi causa l'irrancidimento delle cariossidi. Questo è in grado di idrolizzare i legami esteri presenti nei trigliceridi, trasformandoli in acidi grassi e glicerolo (fenomeno chiamato lipolisi). L'effetto del plasma a radiofrequenza (13,56 MHz) ha dimostrato un leggero calo dell'attività dell'enzima il primo giorno post-trattamento, circa l'8,7%. Poi al 90esimo giorno di conservazione, l'attività è risultata ridotta del 35% nei campioni trattati rispetto alla farina di grano non trattata. Un altro enzima di fondamentale importanza è la fosfatasi alcalina (ALP). Questo viene usato come indicatore del trattamento termico nel latte; in quanto avendo una resistenza termica leggermente superiore a quelle dei patogeni più resistenti presenti nella matrice, ci consente di valutare l'efficienza del processo. In

una recente indagine, Segat et al. (2016) hanno impiegato plasma DBD (a 40, 50 e 60 kV per 15–300 secondi) per l'inattivazione della fosfatasi alcalina. Dopo 2 minuti dal trattamento è stata osservata un'improvvisa riduzione del 40-50% della sua attività a tutte le tensioni applicate, fino a raggiungere il minimo solo allungando i tempi di trattamento. In ogni caso per tutti i trattamenti eseguiti, alla fine dei 300 secondi l'attività residua rilevata risultava inferiore al 10%.

Tabella 4- Fattori che influenzano l'inattivazione enzimatica (Misra et al.,2016)

ENZIMI	SUBSTRATO	FONTE DI PLASMA	GAS	VOLTAGGIO/TEMPO	INATTIVAZIONE (%)	RIFERIMENTI
<b>PPO</b>	fette di mela	DBD	aria	15 kV, 30 min	42	Tappi et al. (2014)
	fette di mela e patate	MIP	aria	1.2 kW, 10 min	62-77	Bußler et al. (2016)
<b>POD</b>	estratto di pomodoro	DBD	aria	50kV, 5 min	100	Pankaj et al. (2013)
	fette di melone	DBD	aria	15kV, 10 min	83	Tappi et al. (2016)
<b>ALP</b>	Latte	DBD	aria	60 kV, 300 s	90	Segat et al. (2016)

Si può notare che tutti gli studi riportati in precedenza e riassunti nella *Tabella 4*, sono accomunati dalla dipendenza dalla matrice alimentare, dalla fonte del plasma, dal gas di processo usato e dalla combinazione tempo/potenza applicata nel trattamento. Fattori che vanno a condizionare l'efficienza nei confronti dell'inattivazione enzimatica. Mentre tali studi rivelano risultati molto positivi e promettenti, l'uso pratico del plasma freddo per l'inattivazione enzimatica nei sistemi alimentari risulta ancora difficile. Ciò è soprattutto attribuibile alla natura chimica complessa che caratterizza la maggior parte dei prodotti. Per fare un esempio, quasi tutti gli alimenti sono tendenzialmente ricchi di ioni e la loro presenza funge da protezione contro l'azione del plasma rendendolo meno efficiente del previsto. C'è poi da considerare che le interazioni chimiche tra le specie reattive durante il trattamento al plasma porta a un consistente abbassamento del pH, attribuibile alla loro interazione con l'umidità presente nei prodotti alimentari. Nel cibo solido infatti, le specie del plasma reagiscono solo con l'acqua superficiale, formando composti acidi in loco mentre, nei prodotti liquidi, gli effetti saranno più pronunciati. (Misra et al.,2016; Pankaj et al., 2018; Thirumdas et al., 2014).

### 3.3-Inattivazione delle micotossine

Esistono alcune specie di funghi, definiti tossigeni, quali *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicilium* che sono in grado di produrre micotossine. Queste non sono altro che metaboliti secondari con elevata stabilità chimica, i quali vengono prodotti quando le condizioni ambientali (soprattutto riferite a temperatura e umidità) sono sfavorevoli per la proliferazione. La durata di conservazione e la qualità dei cibi può essere influenzata negativamente dalla presenza dei funghi e delle loro eventuali micotossine, alcune delle quali risultano essere cancerogene o mutagene per l'uomo, come le aflatossine, lo zearalenone, il deossinivalenolo (DON) e le fumonisine. La loro crescita nelle matrici alimentari trasformate è facilmente impedita grazie all'utilizzo di conservanti. Tuttavia insorge l'esigenza di avere una "clear label"; ossia un'etichetta breve, con ingredienti naturali, chiari e comprensibili, andando a rimuovere o comunque a ridurre l'uso di alcuni ingredienti dalla lista; come gli additivi, i conservanti, i coloranti o gli aromi artificiali. Questa esigenza va di pari passo con la crescente attenzione da parte dei consumatori all'etichetta dei prodotti acquistati e agli ingredienti che lo compongono. L'industria alimentare, per queste ragioni, ha preso in considerazione l'uso di diverse tecnologie non termiche. Il trattamento al plasma a pressione atmosferica è una di queste in quanto la sua efficienza sterilizzante è dovuta alla presenza delle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, salvaguardando la materia prima che verrebbe alterata dal calore. In particolare ci riferiamo all'ossigeno atomico (O) e all'azoto (N), all'idrossido (OH), al superossido ( $O_2^-$ ), idroperossido ( $HO_2$ ), l'ozono ( $O_3$ ), il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ), i vari ossidi di azoto (NOx) e il perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Tra le più famigerate micotossine prodotte dai funghi troviamo le aflatossine, metaboliti delle specie *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Suscettibili alla loro produzione, risultano essere prodotti agricoli come mais, arachidi e semi di cotone soprattutto se in condizioni di alta temperatura (da 25 a 32 ° C) e umidità elevata (> 85%). Le vomitossine o deossinivalenolo (DON), potenziale pericolo per la salute dell'uomo, sono prodotte da *Fusarium* soprattutto in cereali come grano, mais e sorgo. Molte delle operazioni post-raccolta dei cereali possono andare a ridurre significativamente la quantità di micotossine presenti; tuttavia, la rimozione completa è pressoché impossibile. Quindi per un consumo sicuro potrebbero essere necessarie ulteriori trattamenti e i più comuni includono metodi fisici o l'uso di sostanze chimiche. Come operazioni fisiche si prevede l'utilizzo della setacciatura o del lavaggio, le quali vanno direttamente a separare i cereali infetti attraverso un'identificazione visiva che li differenzia a seconda del colore e della densità, della forma e delle dimensioni. Sfortunatamente però, è evidente che tali metodi possono essere imprecisi e poco affidabili. I raggi gamma svolgono un promettente intervento contro le micotossine e vengono usati dall'industria alimentare soprattutto per il trattamento dei cibi

secchi. Si sfrutta la produzione di fotoni ad alta energia, che interagiscono con le cellule e ne inducono la rottura del DNA. Tra i trattamenti chimici troviamo l'utilizzo di acido acetico, acido citrico, acido lattico e basi come l'ammoniaca ( $NH_3$ ), l'idrossido di calcio ( $Ca(OH)_2$ ), il sodio cloroplatinato ( $Na_2$ ), l'acido carbonato ( $CO_3$ ). Vengono usati agenti ossidanti (ad esempio ozono), ma anche agenti riducenti (ad esempio bisolfito di sodio) tutti efficienti per la rimozione delle micotossine. Non mancano inoltre trattamenti alternativi che includono l'uso del plasma freddo, che segue un meccanismo d'azione per il quale le micotossine vengono completamente scomposte. Questa è un'operazione che dipende da vari aspetti come il tipo di micotossina bersaglio, il substrato, la sorgente di plasma e i parametri di processo. Un riassunto dei rapporti inerenti alla degradazione delle micotossine provocata dal plasma freddo in varie matrici è fornito da studi riportati nella seguente *Tabella 5*.

*Tabella 5- Riepilogo degli studi di ricerca che dimostrano la degradazione della micotossina utilizzando plasma freddo (Mistra et al., 2019)*

<b>PRODOTTO</b>	<b>TOSSINA</b>	<b>FONTE DI PLASMA</b>	<b>PARAMETRI DI PROCESSO</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>RIFERIMENTO</b>
/	Aflatossina B1 deossinivalenolo e nivalenolo	MIP ad Argon	Gas: argon Portata gas: 100 L / min; Tempo di trattamento: 1–10 s	Le micotossine erano completamente degradate in 5 secondi di trattamento	Park et al. (2007)
Nocciole, arachidi e pistacchi	Aflatossine (B1, B2, G1 e G2)	Plasma freddo a bassa pressione	Gas: aria Potenza: 300 W. Voltaggio: 20 kV Pressione: 100 mTorr e pressione di esercizio di 500 mTorr Tempo di trattamento: 5-20min	20 min di trattamento con plasma ad aria ha ridotto del 50% le aflatossine totali; Plasma SF ridotto 20% delle aflatossine totali dopo 20 min di trattamento	Basaran et al. (2008)
Foglie di palma da dattero	Fumonissina B2 e ocratossina A	Plasma freddo a pressione atmosferica a	Gas: argon Portata del gas: 1.5–4.5 L / min Tempo di trattamento: 0,5–9min;	Fumonissina B2 e ocratossina A completamente degradati rispettivamente dopo 6 e 7,5 min di trattamento	Ouf et al. (2015)

		doppio getto di Argon	Ugello a getto di campione distanza: 12 mm		
/	Aflatossina B1	RF	Gas: ossigeno Potenza: 300W Tempo di trattamento: 10 min	Degradazione del 88% del AF B1 dopo 10 min; Riduzione della tossicità dei prodotti derivati	Wang et al. (2015)
Nocciole	Aflatossine (B1, B2, G1, G2)	DBD	Gas: puro N <sub>2</sub> e tre miscele di N <sub>2</sub> / O <sub>2</sub> (21%, 1% e 0,1%O <sub>2</sub> ); Frequenza: 100-150 kHz; Potenza: 0,4 e 2 kW; Distanza dal campione: 50mm; Tempo di trattamento: 1, 2, 4,12 min	Il massimo potere disintossicante (70%) delle aflatossine fu ottenuto utilizzando N <sub>2</sub> o una miscela di N <sub>2</sub> + 0,1%O <sub>2</sub> ; Maggiore efficacia contro AF B 1, AF G 1 nei confronti di B 2 e G 2	Siciliano et al. (2016)
Chicchi di mais	Aflatossine	DBD	Gas: aria, miscela (65% O <sub>2</sub> /30% CO <sub>2</sub> /5% N <sub>2</sub> ); Potenza: 200 W. Frequenza: 50 HZ Voltaggio: 90 kV Tempo di trattamento: 1–30min	62 e 82% in diminuzione aflatossina nel mais con rispettivamente 1 e 10 al 40% di umidità; L'aumento d'umidità (40, 80% RH) Ha portato a una maggiore riduzione rispetto all'aria secca (5% UR)	Shi et al. (2017)

In un primo studio, Park et al. (2007) hanno impiegato un trattamento al plasma freddo con argon a pressione atmosferica con l'intento di valutarne gli effetti sulle micotossine. Hanno scoperto che alcune tra queste come l'aftossina B1, il deossivalenolo (DON, vomitossina) e il nivalenolo

(NIV), quest'ultimi appartenenti al gruppo dei tricoteceni, ovvero micotossine sesquiterpeniche, venivano degradati completamente entro soli 5 secondi dall'inizio del trattamento.

Basaran et al. (2008) hanno invece studiato la possibilità di dissipare la micotossina dalle superfici utilizzando un sorgente di plasma a bassa pressione. L'esposizione per 20 minuti al plasma ad aria aveva permesso di diminuire la concentrazione di una miscela di tossine (B1, B2, G1 e G2) fino al 50%.

Alcuni anni dopo, Ouf et al. (2015) hanno riportato un completo degrado di fumonisina B2 e ocratossina A, prodotte da *Aspergillus niger* intenzionalmente inoculato su foglie di palma da dattero, mediante trattamento con plasma a doppio getto di argon. Questo trattamento è anche riuscito ad eliminare le spore dello stesso *A. Niger*.

Recentemente è stato dimostrato che l'aflatossina B1 si degrada fino all'88% a seguito di un trattamento per 10 minuti con plasma RF a 300 W e i prodotti derivati dalla degradazione risultano essere meno tossici del normale (Wang et al., 2012).

Il trattamento di nocciole alle quali sono state volontariamente inoculate le aflatossine, ha provocato dopo 12 minuti una riduzione di più del 70% della loro concentrazione (Siciliano et al., 2016). Inoltre si notò che, per ragioni ancora sconosciute, le aflatossine B1 e G1 erano più sensibili a questo tipo di trattamento rispetto alle aflatossine B2 e G2.

Infine in uno studio recente, Shi et al. (2017) hanno confrontato la degradazione dell'aflatossina nei chicchi di mais utilizzando un plasma DBD ad alta tensione operante sia in aria che in atmosfera modificata. Si è osservata una più rapida degradazione delle tossine in un'atmosfera ricca di ossigeno e con livelli d'umidità elevati. Questa può essere attribuita alla maggiore produzione di radicali da parte del plasma in presenza di un maggior grado d'umidità.

### *3.3.1 -Meccanismo di degradazione delle micotossine*

Essendo una tecnologia nuova, i prodotti della degradazione delle micotossine durante il trattamento con il plasma freddo sono ancora poco studiati. Le vie di degradazione sono inevitabilmente correlate alla loro struttura molecolare che è poi quella che va a interagire con le specie chimiche reattive proprie del plasma. Traendo un'analogia dagli studi fatti sui polimeri, sottoposti allo stesso trattamento, sarebbe lecito affermare che la presenza di strutture aromatiche spesso tenda a rallentare l'intero processo di degradazione. Tuttavia, i percorsi di ionizzazione che degradano le micotossine durante il trattamento al plasma freddo, risultano essere notevolmente diversi dai precedenti, soprattutto date le ridotte dimensioni delle molecole stesse. Ad esempio, trattando le aflatossine B1 (AFB1) con questa nuova tecnologia si scopri,

grazie ad un'accurata analisi spettrofotometrica, la formazione di un intermedio  $C_{17}H_{15}O_7$ , che tra l'altro è anche un importante prodotto di degradazione della stessa micotossina dopo un trattamento UV.

Vengono proposti più percorsi che presumibilmente l'intermedio segue (Fig.13), dove nella maggior parte dei casi si hanno reazioni dovute alla sua ozonizzazione, con il successivo coinvolgimento anche di reazioni sequenziali quali addizione e scissione. L'ozono come l'idrossile e l'aldeide radicale, per lo più generate dalla ionizzazione dell'ossigeno, da parte di molecole d'acqua o di precursori dell'anidride carbonica; sono incluse tra le specie reattive, prodotte dal plasma, identificate come agenti causali della degradazione delle aflatossine.

Le vie di degradazione poi implicano l'aggiunta di una molecola d'acqua, di un atomo di idrogeno o di un gruppo aldeidico in AFB1.

Oppure delle reazioni di epossidazione, ovvero una reazione che avviene tra un perossiacido e un alchene, con la rottura del legame  $\pi$  di quest'ultimo e la formazione di un eterociclico a tre atomi, e un'ossidazione tramite l'azione del radicale idroperossilico ( $HO_2 \bullet$ ).

Inoltre la presunzione, prima solo accennata, della riduzione della tossicità dei prodotti derivanti dalla degradazione di AFB1 viene accreditata dal fatto che l'intensità della luce ultravioletta emessa durante il trattamento al plasma freddo risulta essere di gran lunga inferiore rispetto all'intensità UV che sarebbe in realtà necessaria per l'efficace degradazione dell'aflatossina. Questo probabilmente a causa della perdita, durante il trattamento, del doppio legame nell'anello furanico che risulta essere la parte responsabile della sua tossicità e cancerogenicità. (Misra et al.,2019).

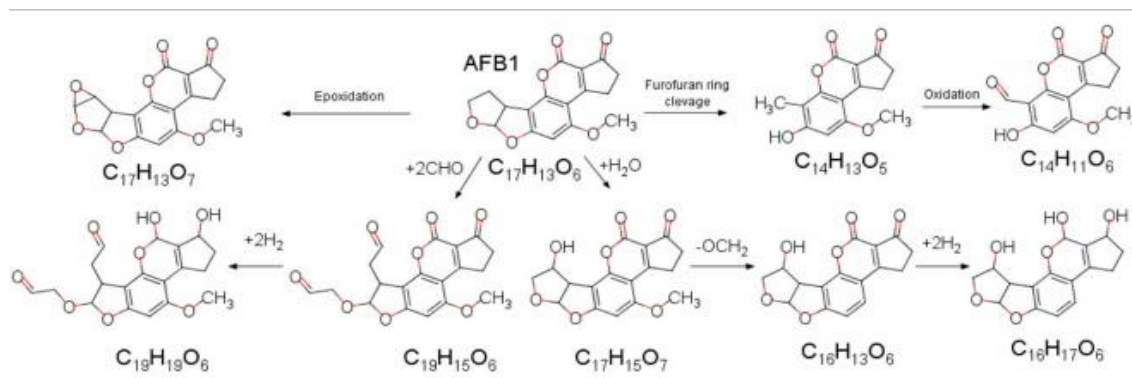


Figura 13-Vie di degradazione dell'aflatossina (AFB1) in seguito all'esposizione a plasma freddo atmosferico ad alta tensione (Misra et al.,2019)



## CAPITOLO 4

### EFFETTI SULLA QUALITA'

Grazie alla loro natura non termica, i trattamenti con il plasma freddo hanno mostrato impatti nulli o minimi sugli aspetti chimici fisici, nutrizionali e sensoriali dei prodotti. Inoltre la sua versatilità economica ed ecologica offre vantaggi unici rispetto alle tecnologie di lavorazione tradizionali. (Pankaj et al.,2018).

#### **4.1-Effetti chimici**

##### *4.1.1-Amidi*

L'alterazione delle sue proprietà è principalmente dovuta alla depolimerizzazione e alla reticolazione delle catene laterali dell'amilosio e dell'amilopectina. Per superare tali problemi derivanti dalle proprietà dell'amido nativo, questo viene sottoposto a modifiche fisiche, enzimatiche o chimiche. Il plasma non termico è considerato un metodo fisico innovativo per aumentare la stabilità dell'amido. Questa tecnologia non termica utilizza specie ionizzate reattive che vanno ad agire sulla configurazione delle molecole di amido migliorandone le proprietà funzionali e anche le proprietà strutturali e termiche. L'effetto sugli amidi poi dipenderà dal tipo di gas di alimentazione utilizzato, dalla tensione applicata e dal tempo di trattamento. Sono stati osservati dopo il trattamento al plasma, una diminuzione significativa del peso molecolare, della viscosità e delle temperature di gelatinizzazione ma anche un miglioramento dell'idrofilia dei suoi granuli. Infine la polimerizzazione / reticolazione indotta dal plasma, rende le molecole di amido generalmente più ramificate e collegate in modo tale da formare una rete che ne riduce l'elasticità durante il rigonfiamento dei granuli. (Pankaj et al.,2018).

#### 4.1.2-Componenti bioattivi

Comprendere l'impatto della tecnologia del plasma non termico sui componenti nutrizionali e funzionali chiave degli alimenti risulta essere di fondamentale importanza per il successo del trattamento adottato dall'industria. Sulle superfici dei composti bioattivi l'influenza del plasma dipende sia dalle sue proprietà che dalla matrice alimentare esposta. I cambiamenti indotti sono principalmente associati alla degradazione ossidativa e alla scissione dei doppi legami nei composti organici. Gli alimenti sono miscele di nutrienti, formati quindi da tanti componenti diversi e come tali vengono definiti "matrici complesse". Esistono infatti sia componenti principali, spesso rappresentativi di un dato alimento, che quelli minoritari i quali contribuiscono ad aumentare la complessità generale delle matrici alimentari. Basti pensare ad esempio agli oli, che solitamente si pensano costituiti solo da grassi, ovvero la loro componente quantitativamente più rappresentata ma che in realtà contengono altri nutrienti importanti seppur in quantità minori, tra cui la vitamina E. Tra gli elementi minoritari rientrano anche i cosiddetti "componenti bioattivi" che, dato il ruolo incerto che svolgono nell'organismo umano, non vengono considerati nemmeno come veri e propri nutrienti. Ciò è giustificato dal fatto che non esiste un loro reale fabbisogno, infatti la loro mancata assunzione non determina segni di carenza o malnutrizione, come avviene invece per i "veri" nutrienti, tuttavia sembra possano rappresentare una strategia alternativa per mantenere un corretto stato di salute.

La classe più numerosa è data dai fitochimici, molecole d'origine vegetale, tra cui rientrano i polifenoli. Sono sostanze antiossidanti che lavorando in sinergia con fibre, minerali e vitamine sono in grado di contrastare lo stress ossidativo migliorando nel complesso la salute umana. I polifenoli più conosciuti sono le antocianine dei frutti a bacca, l'esperidina delle arance, il licopene del pomodoro, le catechine del tè e il resveratrolo del vino rosso. (Muhammad et al., 2018). La seguente *Tabella 6* riporta alcuni studi principalmente focalizzati sui composti fenolici presenti negli alimenti. Questa componente risulta essere quella meno soggetta all'influenza del trattamento al plasma.

Tabella 6- Influenza dei trattamenti al plasma sui composti fenolici di alimenti integri, tagliati e trasformati. (Munekata et al., 2020)

<b>PRODOTTO</b>	<b>FONTE DI PLASMA</b>	<b>PARAMETRI DI PROCESSO</b>	<b>MOMENTO DI CONTROLLO</b>	<b>RISULTATI OTTENUTI SUI COMPOSTI FENOLICI</b>	<b>RIFERIMENTO</b>
Fragole (tagliate)	DBD (aria)	Tensione: 45 kV Tempo:1 min	Dopo 7 giorni a 4 °C	Aumenta il contenuto di composti fenolici e il contenuto di antociani	Li et al., (2019)
Mandarino (non tagliato)	MIP	Potenza:900 W Frequenza: 2,45 GHz Tempo:10 min	Dopo 7giorni a 25 °C e dopo 28 giorni a 4 °C	Nessun effetto sui composti fenolici del frutto in sé; leggero aumento degli stessi sulla buccia	Won et al., (2017)
Mirtilli (non tagliati)	Tubo capillare (aria)	Potenza :549 W Frequenza:47 kHz Tempo:15–120 s	Dopo il trattamento	Riduzione del contenuto di antocianina Aumentando il tempo di trattamento	Lacombe et al-. (2015)
Mirtilli (non tagliati)	DBD (aria)	Tensione:36 V Tempo: fino a 10 minuti	Dopo 20 giorni a 25 °C	Livelli massimi di antocianine sono stati ottenuti utilizzando un trattamento di 6 e 8min; l'effetto è durato per 20 giorni	Dong et al., (2019)
Mela	DBD	Potenza: 150 W Frequenza:12,7 kHz Tempo:120 min	Dopo il trattamento	Composti fenolici ridotti;	Ramazzina et al., (2015)

Farina di riso basmati	RF (aria)	Potenza RF :30 e 40 W Frequenza: 13,56 MHz Tempo: 5 e 10 min	Dopo il trattamento	Aumentare il contenuto composti fenolici riducendo tempo e potenza di trattamento	Thirumdas et al., (2014)
------------------------	-----------	--	---------------------	---	--------------------------

Li et al. (2019) ha portato avanti uno studio sulle fragole trattate con plasma generato da una dielectric barrier discharge (DBD). I risultati ottenuti hanno mostrato un effetto praticamente nullo del trattamento, sia nei confronti dei composti fenolici che delle antocianine.

Un risultato interessante riguardante sempre il contenuto fenolico è stato ottenuto da Won et al. (2017) in cui è dimostrato che il contenuto fenolico nel mandarino non ha subito nessun cambiamento dopo il trattamento con il plasma; tuttavia è stato segnalato un lieve aumento a livello della buccia dello stesso frutto. Ciò è probabilmente associato a una risposta fisiologica che viene attivata per aumentare la protezione nei confronti dei radicali prodotti dal plasma.

Nello studio riportato da Lacombe et al., (2015) è stata invece analizzata l'influenza del tempo di trattamento (15-120s) sul contenuto polifenolico, riferendosi in particolar modo, al contenuto di antocianine nei mirtilli non tagliati. Gli autori hanno osservato che si otteneva una riduzione del contenuto di antociani, principale sostanza del sottogruppo flavonoide dei polifenoli, che passava da 31 a 20 misurati in mg/L di equivalenti di cianidina-3-glucoside nei campioni trattati per periodi più lunghi. Questo effetto però s'ipotizza essere associato ad un aumento di temperatura, indirettamente causato dal plasma, nei mirtilli (oltre i 45 ° C).

Infine si discosta dagli studi appena analizzati l'esperimento condotto da Thirumdas et al. (2014) i quali hanno dimostrato che il trattamento al plasma sulla farina di riso basmati è riuscito ad aumentare il contenuto di composti fenolici già presenti. La concentrazione massima di fenoli è stata ottenuta riducendo la potenza da 40 a 30 Watt e il tempo di trattamento da 10 a 5 minuti.

Nel complesso, il tipo di apparecchiatura e alcune variabili di lavorazione meritano attenzione quando si eseguono trattamenti al plasma al fine di massimizzare la ritenzione di polifenoli in frutta e verdura. Per quanto riguarda il tipo di sorgente utilizzata nella generazione del plasma, è possibile notare che il trattamento DBD ha mostrato effetti positivi o neutri nei confronti dei composti fenolici rispetto invece a quelli negativi che sono stati ottenuti utilizzando tubi capillari. È sufficiente mettere a confronto tra gli studi riportati in *Tabella 5*, quelli di Dong et al. (2019) e

di Lacombe et al., 2015; entrambi hanno applicato il plasma ai mirtilli utilizzando lo stesso gas di processo, cioè l'aria e l'unica cosa che li differenzia è la tipologia d'apparecchiatura. La durata del processo è peculiare per ogni campione ed è influenzata dalle caratteristiche dell'alimento. Dato che sia trattamenti molto brevi come per i mirtilli esposti per 120 secondi (Lacombe et al., 2015) che quelli più duraturi, mele esposte al plasma per 120 minuti (Ramazzina et al., 2015); possono ridurre il contenuto di polifenoli. (Munekata et al., 2020).

#### 4.1.3-Proteine

Le proteine, svolgono un ruolo notevole nelle caratteristiche tecnico-funzionali degli alimenti trasformati e anche nelle proprietà fisico-chimiche dei biofilm a base proteica. Allo stesso tempo però, alcune sono responsabili della riduzione della qualità e della shelf-life dei prodotti.

Il contenuto dei vari costituenti alimentari, proteine comprese, possono essere volontariamente modulati durante la lavorazione, in modo da migliorarne la durata di conservazione, le proprietà organolettiche e la loro funzionalità; diversificando e stabilendo un valore commerciale degli alimenti proteici nell'industria alimentare. Il livello e il tipo di variazioni nelle proprietà funzionali, sono influenzate da una serie di fattori di controllo, quali la potenza del trattamento, il tempo e il tipo di gas, nonché la natura della sostanza e l'ambiente in cui viene effettuato tale trattamento. È stato riscontrato, utilizzando il dicroismo circolare (CD) e la spettroscopia a fluorescenza, che l'effetto del plasma freddo sulle proteine e sugli enzimi, si basa essenzialmente sulla denaturazione della struttura proteica secondaria indotta dall'interazione con le specie reattive del plasma che causano la perdita delle  $\alpha$ -eliche e dei foglietti- $\beta$  con conseguente perdita anche della funzionalità originaria. In modo particolare, un ruolo fondamentale nella degradazione proteica durante il trattamento è svolto dalla sinergia tra l'ossigeno atomico e l'ossido di nitruro. Le interazioni plasma-proteine sono molteplici e ad oggi sono state condotte poche ricerche su questo aspetto, parte delle quali sono riportate nella *Tabella 7*. Le proprietà dell'impasto e della qualità di cottura del grano è principalmente influenzata dalla struttura e dalla quantità delle proteine del glutine (gliadina e glutenina). Bahrami et al. (2016) suggeriscono che il trattamento al plasma genera reazioni ossidative che portano a cambiamenti nei pesi molecolari e nella solubilità di queste proteine, con conseguente perdita della loro capacità di legame e di formare la maglia glutinica. Bußler et al. (2015) hanno studiato l'effetto del trattamento sulla funzionalità delle proteine di *Pisum sativum* e hanno osservato che dopo 10 minuti d'esposizione al plasma freddo della farina di piselli, il contenuto d'acqua aumenta del 113% e del 116% invece la sua capacità di trattenere i lipidi. Un altro studio di Segat et al. (2015) ha interessato le proteine del siero del latte (WPI), sottoposte a trattamenti che vanno da 1 a 60 minuti. È stato riscontrato

un piccolo ma significativo aumento dell'indice di idrofobicità superficiale fino a 15 minuti di trattamento, a causa della leggera ossidazione di WPI che va a modificare i residui di amminoacidici della catena laterale. Inoltre, l'ossidazione delle catene laterali degli aminoacidi contenenti zolfo specialmente la cisteina induce la perdita di SH libero. È stato anche evidenziato che dopo 15 minuti d'esposizione migliora la formazione di schiuma che, nonostante sia più stabile, dopo questo periodo di tempo diminuisce in volume. Una possibile causa potrebbe essere l'aggregazione proteica, basata sull'analisi del gruppo SH libero e sui risultati della cromatografia liquida. (Tolouie et al.,2018; Pankaj et al.,2018).

Tabella 7- studi sugli effetti del trattamento al plasma sulle proteine (Tolouie et al.,2018)

<b>TIPOLOGIA DI PLASMA</b>	<b>TIPOLOGIA DI PROTEINA</b>	<b>PARAMETRI DI TRATTAMENTO</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>RIFERIMENTO</b>
Plasma freddo	Proteine della farina di frumento	Aria; 60 e 120 s; 15 e 20 V.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento delle frazioni di peso molecolare</li> <li>- Miglioramento della resistenza dell'impasto</li> <li>- Nessun cambiamento significativo nelle proteine totali</li> </ul>	Bahrami et al. (2016)
DBD	Proteine di piselli isolate dalla farina di piselli	Aria ambiente; 10 minuti di esposizione; 8,8 kV; 3,0 kHz; Distanza plasma 12 mm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento della capacità di legare l'acqua e il grasso</li> <li>- Aumento della solubilità</li> <li>- Ossidazione del triptofano e successivi cambiamenti nella struttura delle proteine</li> <li>- Nessun cambiamento di colore nell'isolato proteico</li> </ul>	Buβler et al. (2015)

Plasma freddo a pressione atmosferica	Proteine del siero di latte isolate (WPI)	Aria atmosferica come gas; 1, 5, 10, 15, 30 e 60 minuti; Distanza elettrodi 44 mm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento del colore ingiallente in WPI</li> <li>- Minima riduzione del Ph</li> <li>- Aumento della stabilità della schiuma e dell'idrofobicità della superficie</li> <li>- Riduzione dei gruppi di ossidazione delle proteine e tiolo (-SH)</li> <li>- Diminuzione della capacità emulsionante</li> </ul>	Segat et al. (2015)
---------------------------------------	---	---	---	---------------------

Nel tentativo di ridurre l'uso di polimeri sintetici, hanno riscosso molto successo gli imballaggi ecologici e biodegradabili, a base di biopolimeri, tra cui le proteine, molecole complesse composte da 20 monomeri naturali. I film proteici possono andare a migliorare lo stato nutrizionale degli alimenti al loro interno, una pellicola di farina di soia sgrassata (DSM), dopo il trattamento al plasma per 15 minuti a 400, può aumentare l'allungamento dell'effetto barriera nei confronti dell'ossigeno atmosferico. Di conseguenza, limitando la disponibilità di ossigeno all'interno della confezione, si ritarderà l'ossidazione lipidica del prodotto al suo interno durante la conservazione a 4° C. Modificazioni chimiche delle proteine sono anche indotte dal plasma che potrebbe contribuire alla variazione delle caratteristiche fisiche e meccaniche delle proteine alimentari. Ad esempio Pankaj et al. (2014) hanno riportato che la rugosità superficiale e l'idrofilia del film di zeina, una proteina appartenente al gruppo della prolamine, contenuta nei semi dei cereali e in particolare nel mais, aumentano dopo l'esposizione al plasma. L'ossigenazione superficiale post-trattamento, sembra essere associata a un miglioramento dell'idrofilia dei film; l'aumento dei rapporti tra ossigeno e atomi di carbonio porta alla possibile formazione di nuovi gruppi contenenti ossigeno sulla superficie del rivestimento facendolo diventare sempre più idrofilo. Studi precedenti dimostrano che, a seconda della fonte di gas del plasma possono essere

indotti sulla superficie dei polimeri, vari gruppi funzionali come acido carbossilico, legami ammidici e idrossilici, che porterebbero ad un aumento della sua flessibilità. (Tolouie et al.,2018).

#### 4.1.4-Lipidi

I lipidi si trovano negli alimenti sia d'origine animale che vegetale. La loro ossidazione è un fenomeno chimico complesso nonché una delle principali preoccupazioni per le caratteristiche sensoriali degli alimenti; i quali potrebbero riportare cambiamenti indesiderati, come l'alterazione del colore, del gusto e dell'odore ma anche a una significativa riduzione della loro conservabilità. Date queste premesse è doveroso chiedersi come il trattamento al plasma, considerato un processo di ossidazione avanzato, interagisca con i grassi presenti negli alimenti. Tale processo è avviato dall'interazione del substrato con i ROS come ossigeno atomico, idrossile ma soprattutto ozono e segue il meccanismo di Criegee (Fig. 14.1 & 14.2) con la produzione, solo dopo tempi di trattamento prolungati (30minuti) ed in funzione della tensione applicata, di ozonidi, aldeidi e acidi carbossilici. Data la struttura dipolare che caratterizza una molecola ozono ( $O_3$ ), questa può subire un ciclo dipolare con composti saturi (legami doppi o tripli), che conduce alla formazione di un composto detto ozonide (I).

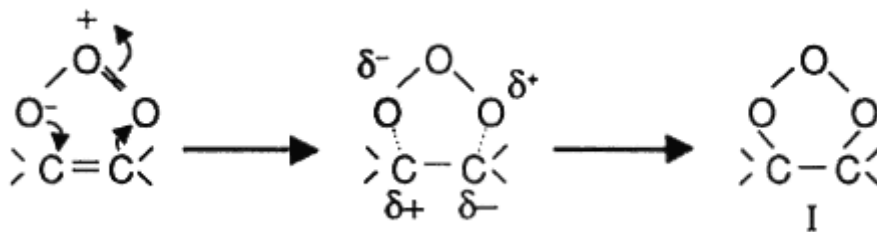


Figura 14.1- Addizione dipolare (<https://www.lenntech.it/biblioteca/ozono/reaazione/ozono-meccanismo-reaazione.htm>)

Successivamente si assiste a una disgregazione dell'ozonide primario in perossido di idrogeno e in residui carbossilici. Tale passaggio è preceduto dalla degenerazione spontanea dello stesso, in uno zwitterone, in un'aldeide oppure in un chetone, determinata dal suo contatto con soluzioni protoniche come può essere ad esempio l'acqua.



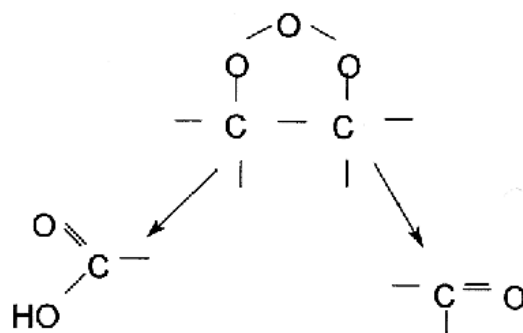


Figura 14.2- Disintegrazione di ozonide

(<https://www.lenntech.it/biblioteca/ozono/reazione/ozono-meccanismo-reazione.htm>)

Per studiare efficacemente i fenomeni chimici dei lipidi nei sistemi alimentari reali, le temperature sperimentali vengono mantenute in condizioni quasi ambientali così da poter prevenire la formazione di composti aromatici derivanti da processi come la reazione di Maillard o la formazione di composti volatili. Questo metodo risulta tuttavia essere molto lento e necessita quindi di catalizzatori chimici che, in combinazione con la luce, riescono ad accelerare il processo ossidativo. Per evitarne l'uso e per superare comunque la natura noiosa del fenomeno, sono stati introdotti metodi innovativi come il plasma freddo.

Tabella 8-Riepilogo dell'ossidazione lipidica indotta dal plasma freddo in diverse matrici alimentari. (Muhammad et al., 2018)

Tipo di plasma	Fonte di lipidi	Parametri di trattamento	Risultati osservati dopo il trattamento	Riferimenti
Plasma DBD	latte	Aria atmosferica; Potenza:250 W; Frequenza:15 kHz; Tempo:5 e 10 min	- Leggero aumento dei TBAR	Kim et al. ( 2015 )
Scarica a corona	Latte crudo	Aria atmosferica; Intensità: 90 mA; Tempo: 3, 6, 9, 12, 15 e 20 minuti; Temperatura:35 ° C	- Leggero aumento della composizione lipidica - Cambiamenti significativi in altri composti organici	Korachi et al. ( 2015 )
Plasma DBD	Lonza di maiale	99,9% He, 0,3% O <sub>2</sub> ; Tensione:3 kV; Frequenza:30 Hz;	- I valori più alti TBARS in campioni trattati con He + O <sub>2</sub> che in campioni trattati solo con O <sub>2</sub>	Kim et al. ( 2013 )

RF	Olio vegetale	O <sub>2</sub> , gas Ar; Potenza RF 13,56 MHz; Potenza 25 W.	- Formazione di aldeidi e 2-pentilfurano come prodotto secondario di ossidazione lipidica	Van Durme et al. (2014)
----	---------------	--	---	-------------------------

L'ossidazione lipidica con plasma freddo, in un numero considerevole di articoli, è calcolata mediante misurazione di sostanze reattive all'acido 2-tiobarbuturico (TBARS), o mediante la misurazione dei valori di perossidi in particolare sulla formazione di perossido di idrogeno. (Tab.8). Tutti questi si formano come sottoprodotti primari dell'ossidazione.

Ad esempio Kim et al. (2015) hanno trattato del latte con plasma DBD sia per 5 che per 10 minuti. Riscontrando che solo nel secondo caso, il TBARS è leggermente aumentato, il che non ha causato un evidente deterioramento, collegato alle specie reattive del plasma quali l'ozono, che può aver accelerato la formazione di perossido durante il processo.

La scarica a corona è stata invece impiegata per trattare il latte crudo a 35 ° C, per un massimo di 20 minuti con alimentazione di corrente di 90 mA. La sua analisi biochimica post-trattamento, portata avanti da Korachi et al. (2015) ha mostrato che il plasma non ha imposto cambiamenti significativi della composizione lipidica. Sono stati tuttavia osservati cambiamenti nel contenuto di altri composti organici e sulla quantità di acido esadecanoico che, dopo 3 minuti d'esposizione, è significativamente diminuita per poi aumentare nuovamente con il prolungamento del trattamento. Queste modifiche sono state attribuite alla deidrogenazione causata dai radicali dell'ossigeno.

La sicurezza della lonza di maiale è stata studiata utilizzando plasma DBD con elio e con la combinazione He + O<sub>2</sub> come gas di processo. Oltre alle apprezzabili riduzioni di *E. coli* ottenute a 5 e 10 minuti di esposizione, si notò che i valori TBARS dei campioni trattati con plasma He + O<sub>2</sub> erano più alti rispetto ad altri campioni, il che è un'indicazione dell'ossidazione dei lipidi (Kim et al., 2013 ). Tali risultati sono stati attribuiti ai radicali liberi, precursori degli idroperossidi lipidici, prodotti come risultato del trattamento al plasma.

Van Durme et al. (2014) ha studiato l'accelerazione dell'ossidazione dei lipidi utilizzando un getto di plasma RF invece di un trattamento termico. I ricercatori hanno utilizzato la gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) per misurare i composti volatili dopo l'esposizione al plasma. Dopo il trattamento dell'olio vegetale, vi è la formazione di aldeidi e 2-pentilfurano rispettivamente mediante l'azione di ossigeno atomico e dell'ossigeno singoletto. (Pankaj et al.,2018; Sarangapani et al.,2017; Muhammad et al., 2018).

#### 4.1.5-Vitamine

Le vitamine sono composti organici, non che nutrienti essenziali per il nostro organismo, molto suscettibili agli effetti del calore.

La conoscenza della loro sensibilità alle diverse tecniche di lavorazione è fondamentale per preservarle il più possibile nei prodotti alimentari.

Alcune di queste, come la riboflavina (B2), la piridossina (B6) e la biotina, sono generalmente più stabili, altre, come la tiamina (B1) e le vitamine A, C ed E, sono relativamente labili.

Normalmente vengono classificate con diversi parametri, il più usato è quello che si riferisce alla loro solubilità (liposolubili e idrosolubili) ma nel nostro caso è doveroso soffermarsi sulla caratterizzazione basata sulla resistenza alle temperature. Troviamo vitamine definite termostabili, meno sensibili ai trattamenti termici e quelle invece termolabili rappresentate essenzialmente dall'acido ascorbico (vitamina C), su cui si sono concentrati la maggior parte degli studi nei confronti del trattamento al plasma.

Da questi studi, appena citati, emerge che complessivamente, non vi è stata alcuna riduzione significativa della concentrazione di acido ascorbico nella frutta e nella verdura come kiwi, germogli di ravanella e lattuga, trattati però interi, interi. Tuttavia, è stata osservata una riduzione fino al 4% del contenuto di vitamina C dopo il trattamento al plasma su frutta e verdura tagliate. (Muhammad et al.,2018; Pankaj et al.,2018).

Un esempio è riportato in *Figura 15*; mostra i risultati di uno studio eseguito da Wang et al. (2012) sulla perdita di acido ascorbico, rilevabile dopo il trattamento al plasma su tre diverse matrici tagliate; cetriolo, carota e pera. Si può notare solamente una leggera riduzione del contenuto di vitamina C, in tutti e tre tipi di fette dopo il trattamento.

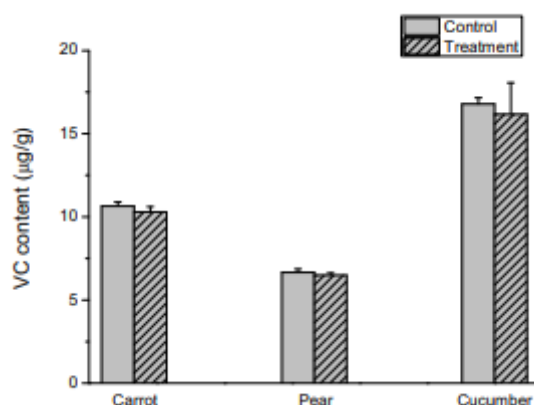


Figura 15- Contenuto di vitamina C nelle fette di carota, cetriolo e pera (Wang et al., 2012)

Le fette di cetriolo sono quelle che mostrano la riduzione maggiore circa del 3,6%, mentre nelle fette di carota e pera rispettivamente del 3,2% e del 2,8%.

La leggera degradazione della vitamina potrebbe essere attribuita alla sua ossidazione causata dal contatto con l'ozono e con le altre specie reattive ma anche dai raggi UV, generati dal plasma, che possono svolgere un ruolo importante nella degradazione data la sua elevata sensibilità alla luce. (Wang et al., 2012).

#### 4.1.6-pH e acidità

Muhammad et al., 2018 hanno riportato diversi studi che dimostrano che il trattamento con plasma freddo modifica il pH del cibo.

Negli amidi da diverse origini botaniche si ha una diminuzione compresa tra 1,4 e 2,8 del pH dopo l'esposizione al plasma. Questa diminuzione era dovuta all'ossidazione da ozono o ossido di azoto, che ha portato alla formazione di acidi carbossilici. Allo stesso modo, nell'estratto proteico di piselli, è stata osservata una marcata diminuzione del pH. Dopo un trattamento di 10 minuti si ha un declino da 8,4 a 7,6 e tale valore si è ulteriormente ridotto a 7,2 dopo la conservazione. L'aumento di l'acidità può essere dovuta al ROS plasmatico, che potrebbe aver causato degradazione degli amminoacidi, con la diffusione dei prodotti di degradazione in soluzione. Un cambiamento drastico di questo parametro potrebbe portare a un impatto indesiderato soprattutto sulla conservazione del prodotto ma anche sul gusto e sulla sua consistenza. (Pankaj et al., 2018).

## 4.2-Effetti fisici

### 4.2.1 -Colore

Il colore dei prodotti alimentari è un attributo che influisce notevolmente sul successo commerciale di qualsiasi prodotto perché ha un effetto diretto e attrattivo sul consumatore. Il colore dei prodotti alimentari è dovuto principalmente alla presenza di pigmenti (naturali o sintetici) e reazioni chimiche (enzimatiche o non enzimatiche).

Qualsiasi cambiamento indesiderato del colore dell'alimento dovuto alle tecniche di lavorazione sfruttate, costituirà un grosso limite per la sua accettabilità e competitività sul mercato.

Sono stati segnalati effetti variabili dei trattamenti al plasma freddo nei confronti del colore di frutta e verdura fresca a seconda delle condizioni di trattamento.

In alcuni casi si nota un'evidente perdita di colore post- trattamento come su fragole, mele, kiwi, pomodorini, lattuga e carote; in altri, invece, come sul mirtillo, si assiste a cambiamenti della colorazione solo a seguito di un prolungamento della durata d'esposizione al trattamento. Allo stesso modo, sono risultati minimi e non percepibili ad occhio nudo, le differenze di colore dopo il trattamento al plasma sui succhi di frutta.

Nel complesso, questi risultati dimostrano che la lavorazione con plasma freddo ha un effetto, anche minimo, sul colore dei prodotti alimentari.

I fattori critici che possono influenzare il colore a seguito del trattamento, e che bisogna quindi tenere in considerazione sono, lo stato del prodotto (intero o tagliato, solido o liquido), i parametri di trattamento (tensione di ingresso, tempo, potenza, gas utilizzato) e le condizioni di conservazione. (Pankaj et al.,2018).

È stato riscontrato che a volte, l'utilizzo del plasma freddo porta ad effetti desiderabili sul colore di alcuni prodotti alimentari. Thirumdas et al., (2014) hanno segnalato infatti un aumento dell'indice di luminosità del riso integrale dopo il trattamento con il plasma. In un altro studio, Yong et al., (2018) ha utilizzato il plasma freddo nella produzione di carne di maiale essiccata senza aggiunta di nitrato di sodio, utilizzando parametri di elaborazione al plasma specifici per ottenere un rossore / colore simile alla carne di maiale essiccata senza utilizzare alcun additivo chimico a base di nitriti. Questi studi ampliano l'attuale area di ricerca per lo sviluppo di nuovi prodotti con tecnologia a plasma freddo, che siano naturali e privi di additivi chimici. (Thirumdas et al.,2014; Yong et al.,2018).

#### 4.2.2-Struttura

Per comprendere l'influenza che ha il trattamento con plasma freddo su questo parametro, riportiamo di seguito alcuni studi che ci mostrano l'evoluzione della consistenza dei prodotti alimentari trattati.

In caso di frutta e verdura fresca, fragola, mela, meloni e pomodorini, non è stata osservata alcuna differenza significativa. È stata esclusivamente riportata una diminuzione della "durezza" dopo lo stesso trattamento nei mirtili. Tale ammorbidimento è stato attribuito a un danno meccanico dato dalle elevate portate del getto di plasma ad aria e al leggero aumento della temperatura durante il trattamento. (Saragapani et al., 2017; Lacombe et al., 2015).

In un altro interessante studio svolto da Misra et al., (2014) sulle fragole confezionate in atmosfera modificata, la ritenzione della compattezza è risultata migliore in un ambiente ad alto contenuto di ossigeno ( $65\% O_2 + 16\% N_2 + 19\% CO_2$ ) rispetto ad un ambiente ricco invece di azoto ( $90\% N_2 + 10\% O_2$ ). Ciò dimostra che il gas di processo scelto è un fattore importante che va a incidere sulla fermezza strutturale dei prodotti trattati.

Nei cereali e nei legumi il trattamento con plasma freddo ha conseguenze sia negative per quanto riguarda l'appetibilità dei prodotti, in quanto ne determina una diminuzione della durezza e della loro masticabilità. Ma anche positive, infatti ha portato ad una diminuzione del tempo di ammollo e di conseguenza di cottura, ritenuti desiderabili per le industrie. (Pankaj et al., 2018).

## CAPITOLO 5

### APPLICAZIONE SUI PRODOTTI ALIMENTARI

#### 5.1- Acqua

Dopo il trattamento dell'acqua pura mediante plasma freddo, è stato osservato da vari autori un fenomeno interessante, chiamato acqua attivata dal plasma (PAW) o acqua dei morti. In breve, consiste nella persistenza dell'effetto microbica del trattamento, nell'acqua dopo una sua lunga esposizione allo stesso. L'azione diretta del plasma si ritiene sia mediata dalle varie particelle reattive che spontaneamente produce; le quali però hanno "vita" generalmente molto breve. Ecco perché devono esistere delle particelle stabili che riescano a far sì che l'effetto microbica persista a lungo, anche nell'acqua. Tra queste, è stata provata la presenza in acqua e in soluzione salina tamponata con fosfato, di ossidi di azoto NO<sub>x</sub> e dei corrispondenti acidi, il perossido di idrogeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e l'ozono O<sub>3</sub>. Oehmigen et al. (2010), hanno studiato a fondo le proprietà dell'acqua esposta a una dielectric barrier discharge (DBD) superficiale nell'aria a 10 kV di potenza e con una frequenza pari a 20 kHz, focalizzandosi in particolar modo sulla sua capacità disinfettante. Gli autori hanno determinato la cinetica della formazione di NO<sub>x</sub>, che causando la successiva formazione di acidi forti quali nitroso HNO<sub>2</sub> e nitrico HNO<sub>3</sub>, è responsabile dell'acidificazione complessiva. In una soluzione fisiologica salina, il pH diminuisce fino a raggiungere dei valori compresi tra 2 e 3 costanti per circa 30 minuti, mentre nella soluzione salina tamponata con fosfato (siglata con PBS), non è stata osservata alcuna acidificazione. Contemporaneamente a quest'effetti, si forma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che aumenta la sua concentrazione iniziale passando da 3 mg/l a 18 mg/l. Sono state incubate le spore di *S. aureus* e *B. atrophaeus* in soluzioni di acido cloridrico e acido nitrico per verificare l'effetto battericida della sola acidità, ma senza alcun risultato dato che non è stata osservata alcun tipo d'inibizione batterica. Solo *E. coli* è inattivato dopo 30-60 minuti di incubazione, in soluzioni concentrate di HCl e HNO<sub>3</sub>, a pH 2. Gli autori hanno concluso quindi che un'ambiente acido, anche dopo l'aggiunta di ioni nitrato, è necessario ma non sufficiente per provocare l'inattivazione di microrganismi. Traylor et al. (2011) ha monitorato l'azione microbica dell'acqua esposta a DBD per diversi giorni. La correlazione tra la concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e la presenza di nitriti con l'inattivazione è stata trovata dopo un'esposizione breve di *E.*

*coli* (15 minuti) alla PAW, ma non per esposizioni più lunghe (3 ore), che hanno tuttavia dato un effetto microbica complessivo più elevato e prolungato e che riesce a persistere per una settimana. L'effetto microbica diminuisce dopo 4 settimane di conservazione, solo quando  $O_3$ , e  $H_2O_2$  sono quasi completamente scomparsi. La miscela di composti reattivi creata artificialmente, per aumentare l'acidità con perossido di idrogeno e ozono, considerati i principali responsabili dell'azione microbica, hanno mostrato un effetto simile ma in qualche modo inferiore rispetto alla PAW. Questo significa che c'è la possibile presenza di altri composti ancora non identificati. Fino ad oggi è stato suggerito come uno dei più possibili agenti ad azione microbica, il perossinitride (ONOO<sup>-</sup>) che permane anche dopo i processi di scarico.

Bisogna poi specificare che i meccanismi di generazione di plasma freddo nell'aria sono leggermente diversi da quelli che avvengono nei liquidi. Infatti l'effetto microbica è moderato, oltre che dalle particelle attive, il campo elettrico e le radiazioni, anche dall'acustica e dalle onde d'urto. Un possibile utilizzo di questo effetto sterilizzante può essere applicato per il ripristino delle acque reflue, dette anche di scarico. Ovvero tutte quelle acque la cui qualità è stata pregiudicata dopo il loro utilizzo in attività domestiche, agricole o industriali, diventando quindi non più idonee a un loro uso diretto in quanto contaminate da diverse tipologie di sostanze organiche e inorganiche. Ci sono due lavori che descrivono le opportunità del trattamento delle acque reflue. Nel primo, Rowan et al. (2007) hanno sviluppato un sistema per la decontaminazione dell'acqua refrigerata impiegata nel lavaggio del pollame, garantita da un'esposizione al plasma. Un trattamento di quest'acqua per solo 30 secondi è riuscito a ridurre le popolazioni di *E. coli*, ma anche di importanti patogeni umani tra questi *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* a livelli tali da non risultare più rilevabili ( $\leq 8$  log UFC / ml). Inoltre ha anche fornito una significativa riduzione ( $\geq 3$  log UFC / ml) delle spore di *Bacillus cereus*. L'altro lavoro di Kim et al. (2003) invece, riflette l'interesse dell'industria alimentare nei confronti dell'ozono, accompagnato dalla sua contemporanea approvazione da parte del governo degli Stati Uniti come agente antimicrobico sicuro sul cibo. In questo modo le aziende devono approvvigionarsi di meno acqua "nuova" per le loro lavorazioni perché l'ozono funge da agente di decontaminazione, permettendo il riutilizzo delle acque reflue in modo da implementare le operazioni ecologiche e rispettose dell'ambiente. (Scholtz et al., 2015).



## 5.2 -Prodotti ittici

Il pesce ha un alto valore nutritivo, in quanto contiene proteine di alta qualità, acidi grassi, tra cui gli omega 3 considerati essenziali ma è anche ottima fonte di minerali e vitamine. A livello globale, il consumo di pesce è cresciuto esponenzialmente negli ultimi decenni e al passo con questo incremento della domanda di consumo, la sicurezza alimentare è diventata fondamentale. La composizione naturale del pesce e le contaminazioni che incontra durante la sua trasformazione sono le principali cause dei cambiamenti di qualità indesiderati in queste materie prime. Agenti patogeni come *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* e *Salmonella spp.* possono facilmente prosperare nel pesce e nei frutti di mare, rischiando di causare gravi malattie di origine alimentare. Tra questi *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* sono i due principali contaminanti dei prodotti ittici. Sebbene il trattamento al plasma freddo va a influenzare la conta microbica finale nel pesce e nei frutti di mare trattati, l'efficacia di questo metodo è ancora in discussione. Bisogna anche sapere che la sua efficienza antibatterica è generalmente inferiore quando il trattamento viene applicato sui prodotti alimentari rispetto alle superfici. Si è infatti osservato che sulle fette di salmone affumicato inoculate con *Photobacterium phosphoreum* e *Lactobacillus sakei*, il trattamento al plasma freddo ha avuto un'efficienza di gran lunga inferiore rispetto a quella ottenuta sulle piastre di agar. Si è poi mostrato totalmente inefficiente contro *L.monocytogenes* sia sul salmone affumicato a freddo sia sulle piastre agarizzate, il che potrebbe limitare, il possibile utilizzo di questo metodo nell'industria ittica; visto e considerato che *L. monocytogenes* è uno dei principali patogeni legati al pesce.(Saklani et al.,2019). Sono stati studiati gli effetti del plasma freddo atmosferico generato da una dielectric barrier discharge (DBD) su dei filetti di sgombro freschi (*Scomber scombrus*), i quali vengono sottoposti a tensioni e tempi di trattamento diversi, rispettivamente 70 kV e 80 kV e 1, 3 e 5 minuti. Entro 24 ore si può osservare che il plasma freddo riduce significativamente i batteri alteranti (aerobi totali, psicrotrofi, batteri lattici (LAB) e *Pseudomonas*) (Fig.16). Tuttavia, in tutti campioni trattati, è stata osservata un'ossidazione lipidica.

Entrambi i fattori di trattamento, voltaggio e tempo, hanno influenzato in modo significativo sia l'efficacia antimicrobica che il fenomeno ossidativo nei confronti dei lipidi. Si sono infatti raggiunte riduzioni di carica microbica di circa  $2 \log_{10}$  UFC/g, accompagnate da un significativo cambiamento della composizione degli acidi grassi, caratterizzato dall'aumento del contenuto di acido oleico e degli acidi eicosapentaenoici, a scapito dell'acido palmitico. Inoltre tale trattamento ha intaccato anche la struttura proteica riducendo la quantità d'acqua immobilizzata al loro interno. Nonostante ciò, non sono state osservate variazioni di pH o di colore.

Questi risultati suggeriscono un possibile futuro impiego della tecnologia plasma freddo generato in DBD, per la lavorazione di prodotti ittici, aumentando la durata della loro qualità durante il periodo di conservazione. (Albertosa et al.,2017).

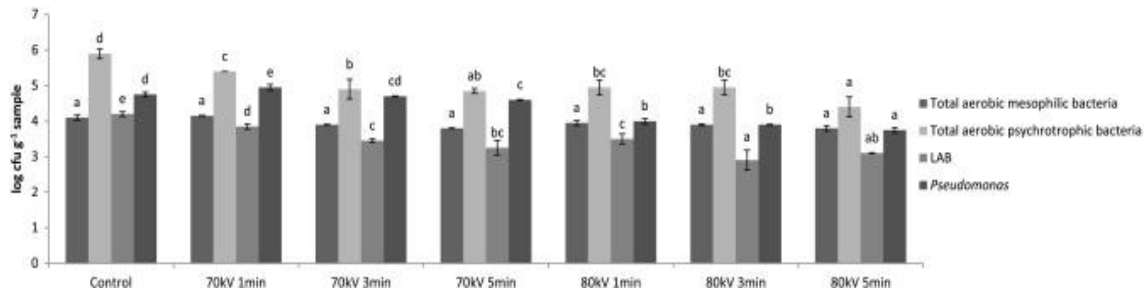


Figura 16- Conteggi di batteri mesofili aerobi, batteri psicrotrofi, LAB e Pseudomonas (log UFC g<sup>-1</sup> campioni) in sgombri sottoposti a diversi trattamenti DBD. (Albertosa et al.,2017)

L'uso di plasma non termico potrebbe inoltre essere un metodo di decontaminazione efficace anche per pesci e frutti di mare essiccati, nei confronti dei quali non solo non riduce ma talvolta addirittura migliora la qualità sensoriale del prodotto finito. È questo il caso del suo utilizzato sulla costardella del Pacifico (*Cololabis seira*), semi essiccata in cui oltre ad una riduzione delle cariche microbiche da 2 a 3 log UFC / g di batteri aerobi, marini e coliformi, ma anche di lieviti, muffe e *Staphylococcus spp.* dopo 10 minuti; il trattamento ha accentuato la luminosità e il rossore del campione che, a sua volta, ha significativamente migliorato l'aspetto complessivo, il colore e l'accettabilità agli occhi del consumatore. D'altra parte Park e Ha (2015) hanno studiato l'effetto del plasma freddo su filetti di pesce balestra (*Monacanthidae*) essiccati e inoculati con *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium citrinum*. Dopo il trattamento osservarono che, sebbene dopo 20 minuti d'esposizione le cariche microbiche si siano ridotte, questo ha anche significativamente aumentato il tasso di ossidazione e ridotto sensibilmente il sapore generale del campione. Il trattamento è più efficace nel migliorare la durata di conservazione di prodotti essiccati e semi-essiccati rispetto al fresco riducendo non solo le cariche microbiche ma anche l'attività dell'acqua libera dei campioni senza influire negativamente sulle proprietà sensoriali del prodotto. Si può notare, il trattamento al plasma può essere utilizzato in molti rami delle industrie ittiche con applicazioni non esclusivamente correlate alla decontaminazione del prodotto. (Kulawik et al., 2018). Recenti e innovativi studi su altri usi del plasma non termico nel pesce e nei frutti di mare, hanno dimostrato che potrebbe essere un possibile metodo per la riduzione della immunoreattività degli 8 diversi allergeni alimentari, tra cui rientrano anche questi i prodotti ittici

responsabili del 90% delle allergie di origine appunto alimentare. Un altro esempio di potenziale utilizzo sempre inerente all'industrie che lavorano i prodotti ittici, è dato dalla capacità del trattamento, di accelerare in maniera rapida e affidabile, l'ossidazione lipidica nell'olio di pesce, parametro analizzato per verificare la stabilità ossidativa degli alimenti. In questo modo si possono ottenere caratteristiche di deterioramento più realistiche rispetto a quelle comunemente ricavate dalle tecniche di accelerazione basate sull'aumento della temperatura (Vandamme et al.,2015) .

### **5.3- Prodotti carnei**

Diversi fattori possono influenzare la qualità della carne durante la sua lavorazione e lo stoccaggio; il controllo di questi fattori risulta essere importante nell'industria alimentare al fine di garantire la salubrità, una qualità ottimale del prodotto e la piena soddisfazione del consumatore. Tra le molte proprietà qualitative associate alla carne, quelle relative alla sicurezza d'uso, in particolare alla contaminazione patogena, sono di massima preoccupazione in virtù del fatto che è un substrato con condizioni di crescita ottimali per i microrganismi. Il plasma freddo, è un metodo relativamente nuovo di decontaminazione non termica in fase di studio per l'uso nell'industria alimentare. Recentemente si è dimostrato che ha il potenziale per essere una fonte di nitriti, composti chimici formati da azoto e ossigeno che prolungano la durata di conservazione oltre ad intensificare e esaltare il colore dei prodotti, in particolar modo dei salumi stagionati, in cui spesso vengono volutamente aggiunti come additivi. Molti studi hanno esaminato l'applicabilità del trattamento a plasma freddo atmosferico come tecnica per la pastorizzazione non termica degli alimenti. Durante questo trattamento vengono prodotti ROS e RNS tramite la dissociazione di molecole gassose durante la generazione del plasma, i quali si diffondono e si dissolvono nei liquidi dopo il trattamento, formando acidi nitrici e nitrosi che reagiscono con le molecole d'acqua, decomponendosi rispettivamente in nitrato e nitrito. Di norma la concentrazione di nitriti nei liquidi trattati con plasma diminuisce all'aumentare del tempo di trattamento. La loro generazione è anche accompagnata dal rilascio di ioni idrogeno che tendono per definizione a far diminuire il pH del liquido, portandolo da 7 a 2, quindi da uno stato di neutralità a uno d'acidità. (Lee et al., 2017).

L'efficacia microbica di tale trattamento, anche in questo caso, è influenzata da più fattori:

- Dal tipo di microrganismo che si vuole inattivare.

Kim et al., (2011) hanno riscontrato una diversa riduzione dei livelli di *L. monocytogenes*, *E.coli*, e *S.typhimurium* nella pancetta.

- La presenza delle specie reattive all'ossigeno (ROS) e all'azoto (RNS).

Il plasma freddo può essere generato da DBD da azoto, ossigeno, elio e argon, nonché dall'aria. Tra i ROS trovati nel plasma, l'ozono è la principale specie microbica. La concentrazione di ozono nella scarica in fase gassosa è correlata alla concentrazione di ossigeno nel gas. L'ozono è la specie dominante prodotta negli scarichi in fase gassosa composti da solo ossigeno, mentre i RNS sono dominanti negli scarichi in fase gassosa composti da aria o azoto. Il trattamento con una miscela di azoto e ossigeno è stato più efficace nel ridurre i livelli di *L. monocytogenes* nel petto di pollo rispetto al solo azoto (Lee et al., 2017).

- La potenza in ingresso influisce sull'efficienza microbica del plasma.

Kim et al. (2011) hanno scoperto che gli effetti microbici del trattamento al plasma aumentavano, nel loro caso in particolare, nei confronti di *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S.typhimurium*, volutamente inoculati nella pancetta di maiale, conseguentemente ad un aumento della potenza in ingresso del gas (da 75 a 125 W). Questo effetto, è legato al fatto che un aumento della potenza in ingresso, aumenta la concentrazione di radicali idrossilici e ozono, principale specie microbica, nel plasma DBD generato dall'aria atmosferica. Ciò fu dimostrato da Laroussi e Leipold (2004) che allo stesso modo lavorarono sulla pancetta di maiale con potenze che variavano da 1,5 a 10 W sulla stessa matrice alimentare considerata in precedenza,

Gli esempi sopra citati sono riportati nella *Tabella 9*, in cui vengono riportati anche tutti gli altri parametri seppur uguali tra loro.

*Tabella 9- Diversa efficacia del trattamento al plasma a seconda dei fattori determinanti (Misra et al., 2019)*

MICROBO	TASSO DI RIDUZIONE (Log CFU/g)/SUBSTRATO	GAS	POTENZA	TEMPO DI ESPOSIZIONE	RIFERIMENTO
<i>L. monocytogenes</i>	2.60/pancetta	Elio/Ossigeno	125W	//	Kim et al. (2011)
<i>E.coli</i>	3.00/pancetta	Elio/Ossigeno	125W	//	Kim et al. (2011)
<i>S.tifimurio</i>	1.7/pancetta	Elio/Ossigeno	125W	//	Kim et al. (2011)

<i>L. monocytogenes</i>	4.73/petto di pollo	Azoto/Ossigeno	2kV	2 minuti	Lee et al., (2017)
<i>L. monocytogenes</i>	2.89/petto di pollo	Azoto	2kV	2minuti	Lee et al., (2017)
<i>E. coli</i>	2,30/pancetta	Elio/Ossigeno	75W	10 minuti	Kim et al. (2011)
<i>E. coli</i>	3,00/pancetta	Elio/Ossigeno	125W	10 minuti	Kim et al. (2011)

Dopo i trattamenti non ci sono evidenti cambiamenti per quanto riguarda le proprietà fisico-chimiche dei prodotti come, ad esempio, la forza di taglio o l'indice di frammentazione miofibrillare. Tuttavia si verificarono modifiche dei parametri sensoriali (odore e sapore sgradevoli, accettabilità complessiva) rilevabili appena dopo 10 minuti d'esposizione al plasma. (Misra et al., 2019). Recentemente è cresciuto l'interesse per l'applicazione del trattamento al plasma anche sui prodotti già confezionati, condotto utilizzando un elettrodo flessibile a strato sottile che viene direttamente posizionato all'interno della confezione sigillata. Questo metodo già di per sé previene una possibile ricontaminazione microbica, perché il cibo decontaminato è trasportato nella confezione che rimane chiusa ermeticamente fino al momento dell'utilizzo. Inoltre, un ulteriore vantaggio è dato dal fatto che le specie reattive a lunga vita, in particolare ozono e perossido di idrogeno, generate nella confezione sigillata, continuano la loro azione battericida anche al termine del trattamento. (Lee et al.,2017).

#### 5.4- Ortofrutta

Frutta e verdura fresca sono componenti indispensabili nella nostra dieta quotidiana. La contaminazione batterica ogni anno rappresenta il 34% di tutti i problemi di sicurezza alimentare globale. I recenti casi di contaminazione da *Escherichia coli* O157: H7 nei cetrioli in Europa e dei meloni contaminati da *Listeria* negli Stati Uniti, date le migliaia di persone infettate e le decine di morti, hanno fatto sì che aumentasse questa consapevolezza. I classici metodi termici di sterilizzazione alimentare, non sono adatti per frutta e verdura, poiché il riscaldamento provoca inevitabili cambiamenti di colore, odore, sapore e una perdita dei valori nutritivi. Per questo molti studi si sono concentrati sulla possibilità di utilizzo di sterilizzazioni alternative, tra le quali l'applicazione della recente tecnologia che sfrutta il plasma freddo a pressione atmosferica, in grado di inattivare in modo efficiente i microorganismi inclusi batteri, spore, funghi e biofilm e di degradare le bio-macromolecole come proteine e saccaridi. È stato stabilito che un ruolo chiave per il raggiungimento di questi obiettivi è giocato dai radicali reattivi e altre specie attive, che non lasceranno tracce di contaminazione residua perché hanno vite molto brevi. La peculiarità di questa tecnica è la potenzialità di svolgere un'azione sinergica di controllo microbico e di

mantenimento degli aspetti organolettici attraverso l'inattivazione degli enzimi che altrimenti causerebbero delle modificazioni cromatiche negative. Verdura e frutta, come lattuga, basilico e pomodori, possono essere portatori di agenti patogeni pericolosi per l'uomo. *E. coli*, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* sono stati efficacemente inattivati dal plasma freddo ad aria su pomodorini e mele senza che questi subissero alcun effetto dannoso. Sulle fragole che hanno una superficie più irregolare, invece, il trattamento al plasma è stato meno efficace, andando comunque a ridurre le concentrazioni batteriche pre-trattamento. Questi risultati suggeriscono che superfici meno regolari, come quella delle fragole appunto, potrebbero contribuire alla sopravvivenza di alcuni ceppi batterici. (Wang et al.,2012). Di fatto i risultati hanno sottolineato che, oltre a decontaminare, il trattamento causa stress fisiologico alla materia prima con conseguente irrobustimento dei tessuti, quindi i prodotti non necessiteranno dell'aggiunta di successivi agenti anti-rammollimento, come i più comunemente usati, sali di calcio.

Una sperimentazione particolarmente interessante è quella effettuata per la decontaminazione di fragole confezionate. In questo studio, le fragole sono state trattate con plasma freddo atmosferico, generato con una dielectric barrier discharge (DBD) pulsata, direttamente all'interno di una confezione sigillata contenente aria (al 42% d'umidità relativa), a 60 kV a 50 Hz, con una distanza tra gli elettrodi di 40 mm. (Fig.17).

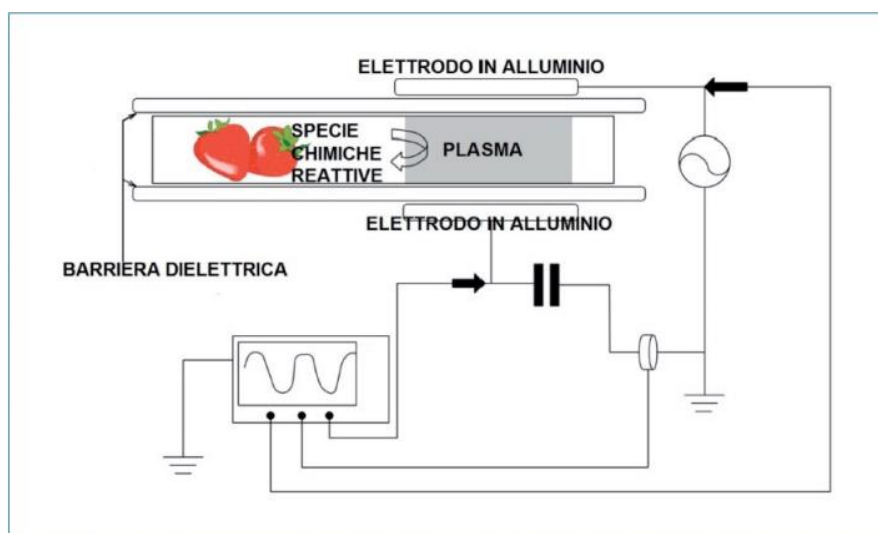


Figura 17-Schema dell'assetto sperimentale impiegato per il trattamento delle fragole confezionate. (<https://agricoltura.regione.emilia-romagna.it/>)

I risultati hanno mostrato che la carica dei mesofili totali e dei lieviti / muffe per i campioni non trattati erano rispettivamente 4,99 e 4,96 log<sub>10</sub> UFC / g. Lo stoccaggio a 10 ° C per 24 ore su campioni di controllo non trattati non ha avuto alcun effetto sulla riduzione della popolazione microbica superficiale delle fragole, dove la conta mesofila totale registrata è stata di 4,92 log<sub>10</sub> UFC / g. Un andamento simile è stato riscontrato anche nel conteggio di lieviti e muffe; 5,06 log<sub>10</sub> UFC / g. L'effetto del trattamento indiretto del plasma, nella confezione di fragole per 5 minuti ha ottenuto invece riduzioni di carica di 2,4 e 3,3 cicli logaritmici rispettivamente per quanto riguarda mesofili totali e lieviti / muffe. (Tab.10). Il fatto che le temperature utili a causare l'inattivazione microbica non sono mai state raggiunte, suggerisce che l'efficienza è esclusivamente dovuta alle specie reattive prodotte dal plasma.

*Tabella 10- Risultati riassuntivi dell'inattivazione microbica sulla superficie delle fragole*

*(Misra et al.,2014)*

<b>MICROORGANISMI</b>	<b>CAMPIONE NON TRATTATO <math>t_0</math> (<math>\log_{10}</math>UFC/g)</b>	<b>CAMPIONE NON TRATTATO <math>t_{24h}</math> (<math>\log_{10}</math>UFC/g)</b>	<b>CAMPIONE TRATTATO (<math>\log_{10}</math>UFC/g)</b>
CBT mesofili	4.99 ± 0.02	4.92 ± 0.14	2.56 ± 1.82
Lieviti/muffe	4.96 ± 0.08	5.06 ± 0.04	1.56 ± 1.29

L'approccio del sistema chiuso, non ha tuttavia mostrato cambiamenti sulle modificazioni del colore perché non induce fenomeni di stress e nemmeno sul tasso di respirazione (Misra et al.,2014). Tuttavia, l'umidità relativa è stata leggermente influenzata nel trattamento con sistemi aperti, con una perdita d'umidità inferiore al 5% dopo 8 minuti; attribuibile al flusso d'aria del dispositivo al plasma (5 litri al minuto) e al leggero aumento della temperatura. Questi due fattori accelereranno l'evaporazione dell'acqua dalla superficie delle fette di frutta e verdura, fenomeno in ogni caso abbastanza comune per questa tipologia di prodotti, soprattutto se tagliata. In generale però una perdita d'umidità così ridotta (<5%) non influenzerà in modo significativo la durezza del tessuto ed è considerata accettabile. (Wang et al.,2012).

## **5.5 -Packaging**

La bassa temperatura mantenuta durante il trattamento al plasma, lo rende il metodo d'elezione per vari prodotti, in particolar modo risulta adatto per quelli più sensibili al calore. Tra questi in biotecnologia, troviamo i fogli plastici, i film o i tessuti in cui il trattamento implica sia la

decontaminazione che la modifica della superficie a contatto col plasma, con conseguente riduzione dell'idrofobicità e l'aumento della bagnabilità del materiale che presumibilmente verrà usato per il confezionamento degli alimenti. La superficie del polietilene a bassa densità (LDPE), un polimero termoplastico ricavato dal petrolio, è stata modificata sia da generatori DBD che dalla scarica in RF con Ar, O<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>. In tutti i casi citati, i campioni hanno mostrato un significativo miglioramento della loro bagnabilità superficiale. Come anche nel caso del trattamento con Plasma Jet in aria e in N<sub>2</sub>, sul polipropilene (PP) un polimero termoplastico semicristallino caratterizzato da un elevato carico di rottura e da una bassa densità. Infine, gli stessi effetti sono stati raggiunti anche in tessuti tessili in poliestere, un polimero derivante dai materiali di scarto e riciclo o dalla fermentazione batterica, nonché una delle fibre sintetiche maggiormente utilizzate nel settore tessile; trattati in DBD all'aria aperta. Tuttavia, si è constatato anche che tale effetto non era permanente, infatti il materiale, invecchiando, ritornava allo stato originale. (Scholtz et al., 2015). Muranyi et al., (2008) hanno verificato l'efficacia inattivante della DBD contro i batteri Gram-positivi come *S. aureus*, i Gram-negativi come *E. coli*, *la Salmonella* e contro le spore di *B. atrophaeus*, *Clostridium botulinum* e il fungo *A. niger* su fogli di polietilene tereftalato (PET). Hanno così osservato una notevole riduzione della carica microbica nei confronti delle cellule vegetative, raggiungendo una diminuzione dopo 1 solo secondo di trattamento di 6,6 log<sub>10</sub>. *A. niger*, che tra le specie testate è quella più resistente, in 5 secondi ha ottenuto un tasso d'inattivazione di circa 5 log<sub>10</sub>. Successivamente, lo stesso autore, ha voluto approfondire il ruolo svolto dall'umidità sull'efficacia del trattamento DBD in aria, contro *A. niger* e le spore di *B. subtilis*, distribuite nuovamente su fogli di PET. Verificò che le spore di *A. niger*, venivano perlopiù inattivate a un'umidità relativa del gas elevata, circa del 80% (circa 2 log<sub>10</sub>) (Fig.18). Al contrario, ad umidità del gas elevate è stata osservata un'inattivazione leggermente più scarsa nei confronti delle spore di *B. subtilis*. (Fig.19).

Questo perché i gas con alte quantità di vapore acqueo, risultano ottimali per l'inattivazione di microrganismi sensibili all'ossidazione come risulta essere *A. niger*, tuttavia su quelli la cui inattivazione si basa sulle radiazioni prodotte dai raggi UV, come *B. subtilis*, il processo sarà ostacolato dall'alto contenuto di vapore acqueo. Questo è giustificato dal fatto che la degradazione dell'acqua, durante il trattamento, porta alla formazione di radicali idrossilici e di altre particelle cariche che vanno a favorire l'ossidazione ma allo stesso tempo la presenza d'acqua, crea una sorta di "film protettivo" intorno alla spora che ostacola la profondità di penetrazione dei raggi UV. (Muranyi et al, 2008).



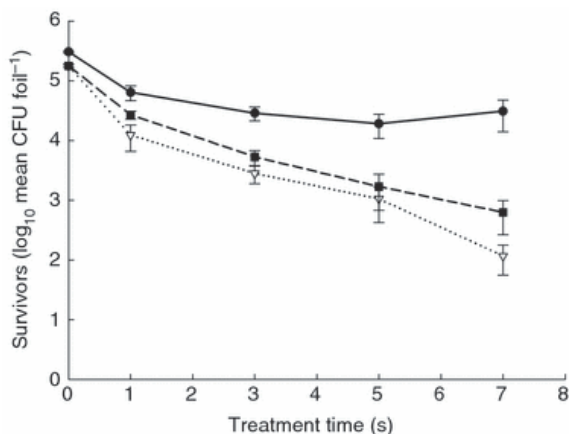


Figura 18- Inattivazione delle spore di *A. niger* in funzione del tempo di trattamento e umidità relativa. Si può osservare che la mortalità aumenta con l'aumentare dell'umidità del gas. Questo effetto diventa più accentuato a tempi di trattamento prolungati. Umidità: ● 0%; ◻ 70%; ◄ 80%. (Muranyi et al.,2008)

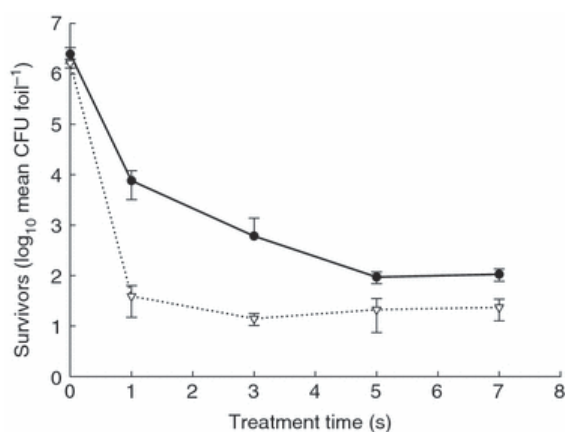


Figura 19-Mortalità delle spore di *Bacillus subtilis* in funzione del tempo di trattamento e dell'umidità relativa. L'inattivazione tende a diminuire con l'aumentare dell'umidità relativa (UR). Umidità: ◻ 0%; ● 80%. (Muranyi et al., 2008)

Un risultato particolare è stato estrapolato da un lavoro che vede l'applicazione delle scariche a corona per la decontaminazione di diverse specie microbiche depositate su un polilattide (PLA), un poliestere termoplastico ottenuto a partire dal mais, che è stato tra le prime bioplastiche ad essere commercializzate, e usato come pellicola da imballaggio. Si riscontrò una riduzione di oltre 2 ordini di grandezza per una nicchia di microrganismi: *S. enteritidis*, *P. aeruginosa* e *Penicillium chrysogenum* ma non fu osservato nessun effetto biocida percettibile nei confronti di *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*. Tra il packaging rientrano anche i contenitori monouso ad esempio la carta stagnola la quale dopo 90 secondi di trattamento al plasma ottiene tre riduzioni decimali delle cellule vitali di *L. monocytogenes*. (Scholtz et al.,2015).

## CONCLUSIONE

Questo lavoro di tesi ha preso in esame l'utilizzo del plasma freddo come metodo di sterilizzazione non convenzionale dei prodotti alimentari. Si tratta di una tecnologia non termica in grado di sfruttare le capacità del plasma, di produrre radiazioni UV e specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS). I trattamenti termici convenzionali si basano sull'inattivazione metabolica irreversibile dei microrganismi, ossia sulla degradazione di elementi vitali o importanti componenti strutturali, per mezzo delle alte temperature mentre il plasma freddo tende a non riscaldare il prodotto ma si avvale della sua capacità ossidativa nei confronti delle macromolecole cellulari per raggiungere la sterilità commerciale. Dato però che la sicurezza d'uso è data per scontata dai consumatori che la ritengono implicita in un prodotto immesso sul mercato, le variabilità di scelta ricadono sull'impatto visivo, quindi sulle condizioni di conservazione e sull'etichetta che dovrebbe contenere meno ingredienti possibili ("clear label"). Sotto questo aspetto le due tecniche hanno molte differenze dovute fondamentalmente dallo sfruttamento o meno del calore, che modifica negativamente le proprietà organolettiche e la qualità dei prodotti stessi. Col supporto di numerosi studi si sono valutati gli effetti del plasma freddo su diverse matrici alimentari che rientrano quotidianamente nella dieta di ciascun individuo. Per i prodotti carnei si è visto che tra le specie reattive prodotte dal plasma si trovano anche i nitriti che, com'è noto, oltre ad aumentarne la durata di conservazione ne esaltano il colore soprattutto se si tratta di salumi. Per raggiungere lo stesso scopo con i trattamenti termici convenzionali, i nitriti dovrebbero essere aggiunti sotto forma di additivi, malvisti dai consumatori. Tra i prodotti in assoluto più suscettibili al calore rientrano la frutta e la verdura. Il processo termico in questo caso provoca un'inevitabile perdita dei valori nutritivi e cambiamenti di colore, odore e sapore dei prodotti; principali fattori di scarto sul mercato, che invece vengono evitate grazie alla contemporanea azione di controllo microbico e di mantenimento degli aspetti organolettici attraverso l'inattivazione degli enzimi che altrimenti causerebbero delle modificazioni cromatiche negative. Nei frutti di mare come la costardella del Pacifico, il trattamento non convenzionale ha avuto effetti molto positivi sul colore e sulla texture, mentre per i prodotti ittici è stata riscontrata un'ossidazione lipidica che tende a modificare la naturale composizione degli acidi grassi. Tuttavia questa capacità del trattamento non è uno svantaggio,

anzi viene ampiamente sfruttata per accelerare in maniera affidabile e controllata, l'ossidazione lipidica dell'olio di pesce, parametro utilizzato per verificare la stabilità ossidativa degli alimenti. In conclusione, tale confronto ha validato l'efficienza di questa tecnologia non termica come un efficiente metodo sterilizzante, perché garantisce la sicurezza d'uso degli alimenti trattati attraverso l'inattivazione dei microrganismi, delle spore e degli enzimi che potrebbero compromettere le qualità organolettiche e la conservabilità dei prodotti. Inoltre, si può riscontrare la sua superiorità riguardo i danni nei confronti delle componenti più sensibili al calore, rispetto ai trattamenti termici convenzionali. Risulta quindi auspicabile un suo futuro impiego per ridurre l'uso di additivi e conservanti (a volte indispensabili se si usano metodi termici), per migliorare la durata della qualità dei prodotti alimentari durante la shelf-life e soprattutto per fugare la convinzione dei consumatori che gli alimenti trattati con tecnologie innovative, in cui sono implicate le radiazioni UV, siano radioattivi e pericolosi.

## BIBLIOGRAFIA

- Albertosa, I., Martín-Diana, A.B., Cullen, P.J., Tiwaric, B.K., Ojhac, S.K., Bourke, P., Álvarez, C., Rico, D., 2017. Effects of dielectric barrier discharge (DBD) generated plasma on microbial reduction and quality parameters of fresh mackerel (*Scomber scombrus*) fillets. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Vol 44, 117-122.
- Bahrami, N., Bayliss, D., Choje, G., Penson, S., Pehinec, T, and Fisk, I.D., 2016. Cold plasma: A new technology to modify wheat flour functionality. *Food chemistry*. Vol 202, 247-53.
- Basaran, P., Basaran-Akgul, N., & Oksuz, L. 2008. Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. *Food Microbiology*. Vol 25, 626–632.
- Bußler, S., Steins, V., Ehlbeck, J., Schlüter, O.K., 2015. Impact of thermal treatment versus cold atmospheric plasma processing on the techno-functional protein properties from *Pisum sativum* ‘Salamanca’. *Journal of Food Engineering*. Vol 167, 166-74.
- Conrads, H., Schmidt, M., 2000. Plasma generation and plasma sources. *Science and Technology*. Vol 9, 441–454.
- Dobrynin, D., Fridman, G., Friedman, G., Fridman, A., 2009. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New Journal of Physics*.
- Dong, X.Y., Yang, Y.L., 2019. A novel approach to enhance blueberry quality during storage using cold plasma at atmospheric air pressure. *Food Bioprocess Technol*. Vol 12, 1409–1421.
- Kim, J.G., Yousef, A.E., Khadre, M.A., 2003. Ozone and its current and future application in the food industry. *Adv Food Nutr Res*. Vol 45, 167-218.
- 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 Microbiol*. Vol 28, 9-13.

- 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*. Vol 13, 1420–1425.
- Kim, H., Yong, H. I., Park, S., Kim, K., Choe, W., Jo, C., 2015. Microbial safety and quality attributes of milk following treatment with atmospheric pressure encapsulated dielectric barrier discharge plasma. *Food Control*. Vol 47, 451–456.
- Korachi, M., Ozen, F., Aslan, N., Vannini, L., Guerzoni, M. E., Gottardi, D., Ekinci, F. Y. 2015. Biochemical changes to milk following treatment by a novel, cold atmospheric plasma system. *International Dairy Journal*. Vol 42, 64–69.
- Kulawik, P., Tiwari, B.K., 2018. Recent advancements in the application of non-thermal plasma technology for the seafood industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol 59, 1-12.
- Lacombe, A., Niemira, B.A., Gurtler, J.B., Fan, X., Sites, J., Boyd, G., Chen, H., 2015. Atmospheric cold plasma inactivation of aerobic microorganisms on blueberries and effects on quality attributes. *Food Microbial*. Vol 46, 479–484.
- Laroussi, M., Leipold, F., 2004. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and uv radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int. J. Mass Spectrom*. Vol 233, 81-86.
- Lee, J., Lee, W.C., Yong, H.I., Lee, H.J., Jo, C., Jung, S., 2017. Use of Atmospheric Pressure Cold Plasma for Meat Industry. *Korean journal for food science of animal resources*. Vol 37, 477-485.
- Li, M., Li, X., Han, C., Ji, N., Jin, P., Zheng, Y., 2019. Physiological and metabolomic analysis of cold plasma treated fresh-cut strawberries. *J. Agric. Food Chem*. Vol 67, 4043–4053.
- Misra, N.N., Moiseev, T., Patil, S., Pankaj, S., Bourke, P., Mosnier, J., Keener, K., Cullen, P., 2014. Cold plasma in modified atmospheres for post-harvest treatment of strawberries. *Food Bioprocess Technol*. Vol 7, 3045–3054.
- Misra, N.N., Patil, S., Moiseev, T., Bourke, P., Mosnier, J.P., Keener, K.M., Cullen, P.J., 2014. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol.18, 106-120.
- 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*. Vol 55, 39-47.

- Misra, N.N., Yadav, B., Roopesh, M.S, JoC.,2019. Cold Plasma for Effective Fungal and Mycotoxin Control in Foods: Mechanisms, Inactivation Effects, and Applications. *Journal of Food Engineering*, Vol 161, 131-138.
- Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.C., Pelletier, J., Philip, N., Saoudi, B., 2002. Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure and Applied Chemistry*. Vol 74, 349–358.
- Muhammad, A.I., Liao, X., Cullen, P.J., Liu, D., Xiang, Q., Wang, J., Chen, S., Ye, X., Ding, T., 2018. Effects of Nonthermal Plasma Technology on Functional Food Components. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol 17, 1379-1394.
- Muhammad, A.I., Xiang, Q., Liao, X., Li, U.D., Ding, T., 2018. Understanding the Impact of Nonthermal Plasma on Food Constituents and Microstructure—A Review. *Food and Bioprocess Technology*. Vol 11, 463–486.
- Munekata, P.E.S., Domínguez, R., Pateiro, M., Lorenzo, J.M., 2020. Influence of Plasma Treatment on the Polyphenols of Food Products—A Review. *Foods*. Vol 9, 929
- Muranyi, P., Wunderlich, J., Heise, M., 2008. Influence of relative gas humidity on the inactivation efficiency of a low temperature gas plasma. *Journal of Applied Microbiology*. Vol 104, 1659–1666.
- Nehra, V., Kumar, A., Dwivedi, H.K., 2008. Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources. *International Journal of Engineering*. Vol 2, 53-68.
- Oehmigen, K., Hähnel, M., Brandenburg, R., Wilke, C., Weltmann, K.D., Von Woedtke, T., 2010. The role of acidification for antimicrobial activity of atmospheric pressure plasma in liquids. *Plasma Processes Polym*. Vol 7, 250–7.
- Ouf, S. A., Basher, A. H., Mohamed, A. A., 2015. Inhibitory effect of double atmospheric pressure argon cold plasma on spores and mycotoxin production of *Aspergillus niger* contaminating date palm fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol 95, 3204–3210.
- Pankaj, S. K., Misra, N. N., Cullen, P. J., 2013. Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Vol 19, 153-157.
- Pankaj, S.K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N.N., Milosavljević, V., O'Donnell, C., Bourke, P., 2014. Applications of cold plasma technology in food packaging. *Trends in Food Science & Technology*. Vol 35, 5-17.
- Pankaj, S.K., Wan, Z., Keene R, K.M., 2018. Effects of Cold Plasma on Food Quality. *Foods*. Vol 7.

- Park, B. J., Takatori, K., Sugita-Konishi, Y., Kim, I.-H., Lee, M.-H., Han, D.-W., Park, J.C. (2007). Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surface and Coatings Technology*. Vol 201, 5733–5737.
- Park, S. Y., Ha, S.D., 2015. Application of cold oxygen plasma for the reduction of *Cladosporium cladosporioides* and *Penicillium citrinum* on the surface of dried filefish (*Stephanolepis cirrhifer*) fillets. *Int. J. Food Sci. Tech*. Vol 50, 966- 973.
- Pria, Cristian, Tesi di master in trattamenti di superficie per l'industria, Università degli Studi di Padova, A.A. 2006/2007;
- Prochnow, A.M., Murphy, A.B., McLean, K.M., Kong, M.G., Ostrikov, K., 2014. Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol 43, 508-517.
- Ramazzina, I., Berardinelli, A., Rizzi, F., Tappi, S., Ragni, L., Sacchetti, G., Rocculi, P., 2015. Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. *PostharvestBiol. Technol*. Vol 107, 55–65.
- Rowan, N., Espie, S., Harrower, J., Anderson, J., Marsili, L., MacGregor, S., 2007. Pulsed-plasmagasdicharge inactivation of microbial pathogens in chilled poultry wash water. *J Food Prot*. Vol 70, 2805–10.
- Saklani, P., Siddhnath, Das S.K., Das, S.K., Ghosh, S.K., Singh, S.M.,2019. Recent Development of Non-Thermal Cold Plasma Technology for Safe and Sustainable Seafood Processing: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. Vol 8, 2459-2476.
- Sarangapani, C., Keogh, D., Dunne, J., Bourke, P., Cullen, P.J., 2017. Characterisation of cold plasma treated beef and dairy lipids using spectroscopic and chromatographic methods. *Food Chemistry*. Vol 235, 324.-333.
- Sarangapani, C., O'Toole, G., Cullen, P., Bourke, P., 2017. Atmospheric cold plasma dissipation efficiency of agrochemicals on blueberries. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. Vol 44, 235–241.
- Scholtz, V., Pazlarová,J., Soušková, H., Khuna, J., Julák, J., 2015. Nonthermal plasma — A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol. Biotechnology Advances*. Vol 33, 1108-1119.
- Segat, A., Misra, N.N., Cullen, P., Innocente, N., 2015. Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of whey protein isolate model solution. *Innovative Food Science &Emerging Technologies*. Vol 29, 247-54.

- Segat, A., Misra, N. N., Cullen, P. J., & Innocente, N., 2016. Effect of atmospheric pressure cold plasma (ACP) on activity and structure of alkaline phosphatase. *Food and Bioproducts Processing*. Vol 98, 181-188.
- Shi, H., Ileleji, K., Stroshine, R. L., Keener, K., Jensen, J. L., 2017. Reduction of aflatoxin in corn by high voltage atmospheric cold plasma. *Food and Bioprocess Technology*. Vol 10, 1042–1052.
- Siciliano, I., Spadaro, D., Prella, A., Vallauri, D., Cavallero, M. C., Garibaldi, A., Gullino, M. L., 2016. Use of cold atmospheric plasma to detoxify hazelnuts from aflatoxins. *Toxins (Basel)*. Vol 8.
- 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*. Vol 21, 114-122.
- Tappi, S., Gozzi, G., Vannini, L., Berardinelli, A., Romani, S., Ragni, L., Rocculi, P., 2016. Cold plasma treatment for fresh-cut melon stabilization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Vol 33, 225-233.
- Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmaison, J., Leprince, P., 2006. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. Vol 61, 2-30.
- Thirumdas, R., Sarangapani, C., Annapure, U.S., 2014. Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophysics*. Vol 10, 1-11.
- Tolouie, H., Mohammadifar, M. A., Ghomi, H., Hashemi, M., 2018. Cold Atmospheric Plasma Manipulation of Proteins in Food Systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol 58, 2583-2597.
- Traylor, M., Pavlovich, M., Karim, S., Hait, P., Sakiyama, Y., Clark, D., 2011. Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water. *J Phys D Appl Phys*. Vol 44.
- Vandamme, J., Durme, J., Nikiforov, A., Leys, C., Winne, A., 2014. Accelerated lipid oxidation using non-thermal plasma technology: Evaluation of volatile compounds. *Food Research International*. Vol 62, 868 - 876.
- Wang, R.X., Nian, W.F., Wu, H.Y., Feng, H.Q., Zhang, K., Zhang, J., Zhu, W.D., Becker, K.H., Fang, J., 2012. Atmospheric-pressure cold plasma treatment of contaminated fresh fruit and vegetable slices: inactivation and physiochemical properties evaluation. *The European Physical Journal D*. Vol 66.
- Won, M.Y., Lee, S.J., Min, S.C., 2017. Mandarin preservation by microwave-powered cold plasma treatment. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. Vol 39, 25–32.



- Yong, H.I., Han, M., Kim, H.J., Suh, J.Y., Jo, C., 2018. Mechanism Underlying Green Discolouration of Myoglobin Induced by Atmospheric Pressure Plasma. Scientific reports. Vol 8.

## SITOGRAFIA

- [www.elearning.uniroma1.it](http://www.elearning.uniroma1.it)
- [www.docplayer.com](http://www.docplayer.com)
- [www.magazine.unibo.it](http://www.magazine.unibo.it)
- [www.ifp.cnr.it](http://www.ifp.cnr.it)
- [www.mdpi.com](http://www.mdpi.com)
- [www.agricoltura.regioe.emilia-romagna.it](http://www.agricoltura.regioe.emilia-romagna.it)
- [www.lennetech.it](http://www.lennetech.it)
- [www.recensito.net](http://www.recensito.net)

## RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato, desidero menzionare tutte le persone, senza le quali questo lavoro di tesi non esisterebbe nemmeno.

Ringrazio in primis la professoressa Roberta Foligni che, come mia relatrice, mi ha spronata a dare il massimo, mi ha guidata nella stesura del testo e mi ha fatto capire che lo studio e la conoscenza sono pilastri fondamentali che dovrebbero sostenere la vita di chiunque.

Grazie ai miei correlatori, la professoressa Cinzia Mannozi per i suoi preziosi consigli e per avermi suggerito puntualmente le giuste modifiche da apportare alla mia tesi e in particolar modo ci terrei a ringraziare il professor Massimo Mozzon per avermi proposto l'argomento trattato e per avermi fatto capire, grazie al suo immenso bagaglio culturale e la sua spontaneità nel trasmetterlo, che ho intrapreso la strada giusta per il mio futuro.

Ringrazio di cuore i miei genitori per avermi sempre sostenuto e per avermi permesso di portare a termine gli studi universitari. Grazie per avermi aiutato a trovare la mia strada e per aver sopportato tutta la mia ansia da prestazione e la mia giornata di pianti il giorno prima di qualsiasi esame.

Ci tengo poi a ringraziare tutti i miei amici soprattutto Aurora con la quale ho condiviso molte crisi da esame e che considero forse l'unica con più angoscia di me; tutti i compagni di corso, ai quali faccio un grande in bocca al lupo per il futuro, che con me hanno condiviso momenti di gioia, tante risate ma anche momenti di delusione.

Un ringraziamento più che dovuto va inoltre ad un'amica speciale, una sorella, alla persona più importante della mia vita; Silvia. Senza di te non ce l'avrei mai fatta, mi supporti e sopporti nonostante i miei mille difetti, sei sempre pronta ad aiutarmi e a farmi stare bene. Ne abbiamo passate tante e nonostante i miei problemi di salute tu non mi hai mai abbandonata anzi, mi sei stata più vicina che mai cercando di farmi capire le cose ma mai invadendo le mie idee.

Infine, vorrei dedicare questo piccolo traguardo anche a me stessa, non mi considero mai, ma questa volta mi sento di augurarmi che la fine di questo viaggio, possa solo essere in realtà l'inizio di una lunga e brillante carriera professionale dopo la magistrale.