



Plasma rece în industria agro-alimentară și medicină: elemente de bază și aplicații

Raport efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a
agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*

(cod –PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Coordonator:

Conf. dr. Tulcan Camelia

Membrii:

Cocan Ileana

Obistoiu Monica

Tripon Roberta

Boldura Oana Maria

Acknowledgements

Activities under this work were carried out in the Research Laboratory Complex "Horia Cernescu" - financed by project "A bio-economical approach of the antimicrobial agents - use and resistance", in the frame of contract PCCDI 7/19.03.2018, code: PN-III P1-1.2-FPRD- 2017.

Știința și tehnologia utilizării plasmei reci reprezintă un domeniu cheie al cercetării actuale datorită transpunerii acesteia în rezolvarea unor serii de probleme cu care diverse sectoare ale agriculturii și prelucrării alimentelor se confruntă. Diversitatea mecanismelor de acțiune ale plasmei reci și flexibilitatea acestei tehnologii emergente, o transformă într-o resursă bogată de soluții inovatoare. Există o gamă largă de factori care determină o nevoie accentuată de tehnologii eficiente, durabile și economice pentru sectorul agricol și alimentar, inclusiv o populație globală în continuă creștere, care la rândul său determină cererea necesității resurselor alimentare, a apei și a energiei. O altă cauză determinantă pentru dezvoltarea unor noi tehnici de prelucrare a produselor o reprezintă contaminarea acestora cu microorganisme, pesticide, toxine sau alergeni.

Totuși, majoritatea problemelor cauzate de contaminare, care conduc la deteriorarea și afectarea siguranței din sectorul agricol și alimentar sunt determinate de contaminarea microbiană, astfel încât, la nivel mondial se constată o continuă creștere a presiunii datorate răspândirii rezistenței antimicrobiene la un număr din ce în ce mai mare de bacterii. Prin urmare, sunt necesare abordări alternative în ceea ce privește controlul microbian atât în sectorul agricol, al prelucrării alimentelor, cât și în sectorul medical.

Plasma atmosferică rece reprezintă o abordare flexibilă cu eficacitate demonstrată în controlul calității produselor destinate consumului uman și cu perspective mari de a oferi tehnici noi, economice, durabile și ecologice. Tehnologia cu plasmă rece a fost explorată pentru o serie de aplicații în mai multe etape ale producției primare și secundare, inclusiv tratarea materiei prime, a produselor intermediare sau finite și tratarea echipamentelor de procesare, a instalațiilor și a mediului, rezultând o serie de avantaje ale utilizării acesteia. Aceste avantaje includ funcționarea la temperaturi scăzute, timpi scurți de procesare, eficiență energetică și eficacitate antimicrobiană ridicată, cu un impact minim asupra calității alimentelor și a mediului (1).

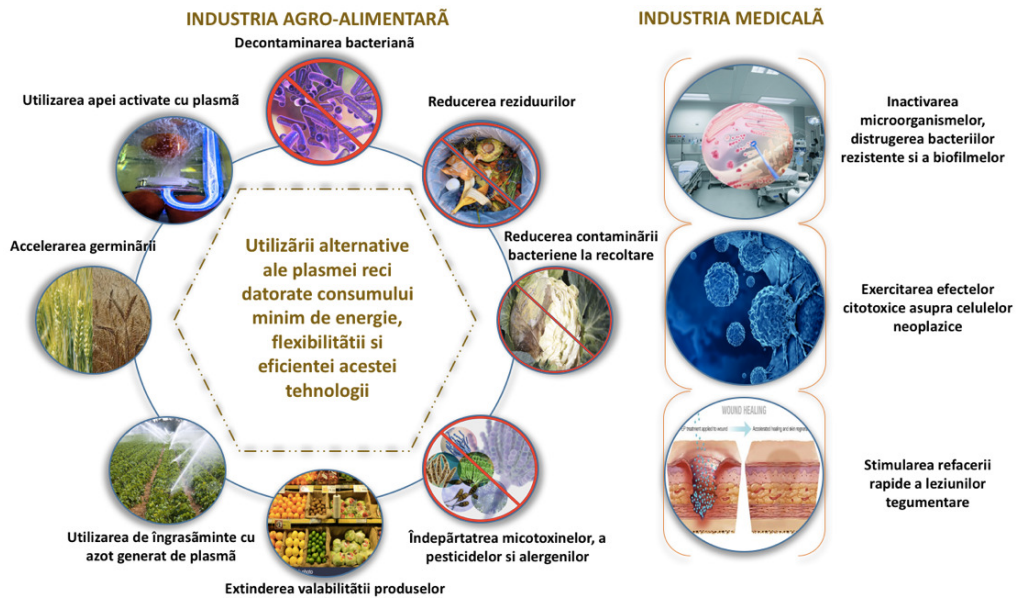


Figura 1. Multiple utilizări ale plasmei reci în industria agro-alimentară și medicală

Calitatea, atât în ceea ce privește caracteristicile obiective ale produsului, cât și percepția subiectivă a consumatorilor, reprezintă un factor esențial al succesului oricărui produs alimentar. Prelucrarea termică a alimentelor este utilizată de mai bine de două secole și este în continuare cea mai importantă tehnică de procesare utilizată în industria alimentară. Totuși, utilizarea căldurii severe duce la apariția unor efecte nedorite precum schimbarea culorii și a texturii alimentelor, dar și pierderea substanțelor nutritive, fapt ce a determinat cercetătorii să exploreze alternative non-termice pentru prelucrarea alimentelor. Plasma rece este una dintre tehnologiile non-termice ale secolului care a demonstrat un potențial semnificativ în acest sens. Inactivarea prin tratarea cu plasmă rece a microorganismelor patogene ar putea conduce spre produse alimentare minim procesate, sigure, cu termen de valabilitate extins (2).

În general, plasma este caracterizată ca „*a patra stare a materiei*”. Potrivit lui Whitehead, J.C., 2016(3) plasma conține gaze complet sau parțial ionizate cu o gamă largă de specii reactive neutre sau încărcate electric. Whitehead, J.C., 2016(3) a definit conceptul de plasmă rece ca reprezentând o sursă de electroni de înaltă energie, aflați la temperatura și presiunea ambientală, care interacționează într-un mediu deschis sau controlat. Dacă se aplică suficientă energie unui gaz, aceasta separă interacțiunile dintre

molecule și atomi, ceea ce duce la generarea de specii încărcate și neutre, inclusiv ioni, electroni și radicali liberi, în timp ce se eliberează radiații la diferite lungimi de undă. Complexul de specii și radiații poartă denumirea de plasmă. În funcție de temperatura utilizată, plasma poate fi clasificată drept plasmă fierbinte sau plasmă rece (4).

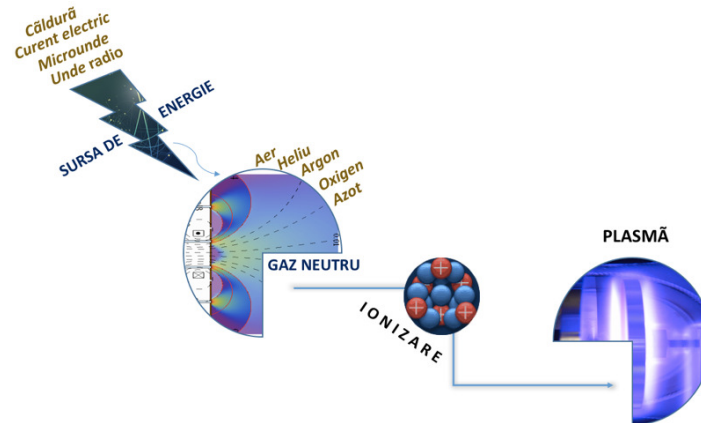


Figura 2. Schematizarea mecanismului de generare a plasmăi

Plasma rece produce specii reactive, precum unele molecule, particule reactive, radicali liberi, specii reactive la UV și elemente reactive de N_2 , O_2 și H_2 , fie în stare de echilibru, fie dezechilibru. În prezent se cunosc trei tipuri de sisteme de descărcare electrică de tip plasmă rece. În primul dintre acestea, "non-thermal glow discharge", plasma este produsă în momentul aplicării unei tensiuni asupra a doi electrozi aflați într-un mediu cu gaz la presiune scăzută. Cel de-al doilea tip, "radio frequency discharge plasma" implică existența unei descărcări intense de frecvențe radio și utilizarea electricității pulsate pentru producerea plasmăi reci în centrul unei bobine electrice. Cel de-al treilea tip de sistem utilizează un material dielectric între cei doi electrozi pentru dispersia fluxului electric și formarea plasmăi.

Lipsa necesității utilizării unor temperaturi înalte de prelucrare, diversitatea aplicabilității și mai ales rentabilitatea din punct de vedere economic, clasează tehnologia utilizării plasmăi reci în topul celor mai testate metode de prelucrare a produselor alimentare. Inactivarea cu plasmă rece a patogenilor din sfera alimentară se realizează prin trei moduri de acțiune diferite. Dintre acestea, primul are la bază interacțiunile dintre compușii chimici ai moleculelor reactive, radicalilor și particulelor încărcate negativ sau pozitiv. Cel de-al doilea implică distrugerea membranelor și împiedicarea realizării funcțiilor celulare prin acțiunea radiațiilor



UV. Ultimul mod de acțiune se canalizează pe efectul direct produs de radiațiile UV emise prin recombinația speciilor plasmatică la nivelul materialului genetic, proces finalizat prin ruperea catenei de acid deoxiribonucleic (ADN). Sistemele de plasmă rece utilizate în procesul de sterilizare a alimentelor se pot divide în trei configurații generale, fiecare dintre acestea demonstrând o anumită eficiență antimicrobiană, dependentă de interacțiunile dintre plasma generată și suprafața de contact. Dependent de contactul existent între alimente și sursele de sterilizare, acestea pot acționa de la distanță, produsul supus sterilizării nefiind plasat în corpul de generare al plasmei. În acest caz, gazul ionizat poate fi reprezentat de azot, sau un mix de gaze nobile și curent electric, microunde sau unde laser. În sistemele cu acțiune directă, produsul de sterilizat este plasat în contact direct cu plasma generată, aceasta acționând prin intermediul unui arc introdus în produsul țintă. A treia variantă de tratament cu plasmă rece presupune amplasarea produsului în proximitatea unuia dintre electrozii sistemului de generare al plasmei. În acest caz, agenții patogeni sunt supuși celui mai înalt grad de inactivare datorat combinării speciilor reactive de plasmă și a celor mai înalte concentrații de specii moleculare libere, electroni încărcăți negativ și radiații UV. Principalele componente reactive răspunzătoare pentru activitatea antimicrobiană a plasmei reci sunt reprezentate de speciile reactive de oxigen și azot (5).

În ceea ce privește inactivarea microbiană, cel mai comun mecanism de acțiune este oxidarea constituenților celulari de către radicalul superoxid (O_2^-), peroxidul de hidrogen (H_2O_2), radicalii hidroxilici (OH), ozonul (O_3) și alte specii reactive de azot, precum oxidul azotic (NO) și altele. Interacțiunile dintre aceste specii reactive și macromoleculele celulare, cum ar fi lipidele, proteinele și ADN-ul, pot conduce spre moarte celulară. Cercetătorii au demonstrat faptul că plasma rece poate inactiva în mod eficient diferite microorganisme cu păstrarea unui grad înalt al calității alimentelor. În timp ce unele microorganisme (de exemplu, *Escherichia coli*) sunt mai susceptibile la plasmă, bacteriile care formează spori, precum *Bacillus subtilis*, sunt mai dificil de distrus. Mulți dintre parametrii de funcționare pentru echipamentul generator de plasmă pot afecta cantitatea și tipul de specii moleculare generate, totuși, capacitatea de inactivare microbiană este atribuită speciilor reactive, fiind dependentă de producerea acestora (4).



Aplicațiile plasmei reci în diferite domenii ale științei și tehnologiei

Pe lângă tehnicile termice uzuale (răcire, congelare și uscare) utilizate în procesarea alimentelor, celor care nu implică prelucrare termică li s-a acordat o deosebită atenție în ultimii ani (6). Tehnologia plasmei reci (PR) reprezintă o tehnică emergentă de prelucrare non-termică a alimentelor care atrage atenția multor cercetători de pe glob. Tendințele actuale de cercetare sugerează ideea conform căreia plasma rece reprezintă o tehnologie pe cât de puternică, pe atât de profitabilă pentru industria alimentară. Tehnologia de prelucrare non-termică este extrem de avantajoasă pentru decontaminarea microbiană a alimentelor, vizând inclusiv organismele patogene producătoare de spori. Tehnicile de tratare cu plasmă rece au demonstrat vaste aplicabilități în mai multe etape ale producției de alimente primare și secundare, inclusiv în tratarea materiilor prime, a produselor intermediare sau finite, precum și cea a echipamentelor, instalațiilor și a mediului de procesare. Avantajele cheie ale utilizării plasmei se referă atât la funcționarea acesteia la temperaturi scăzute, cât și la timpul scurt de procesare, la eficiența energetică și antimicrobiană ridicată, precum și la impactul calitativ minim asupra alimentelor și a mediului (1). Totuși, în unele cazuri s-a remarcat faptul că plasma rece poate provoca procese oxidative în unele sisteme alimentare, deci aceste probleme trebuie să i se acorde o atenție deosebită (7). Cu toate acestea, spectrul de aplicații ale plasmei reci acoperă multe aspecte ale vieții de zi cu zi și aproape toate industriile majore. O analiză critică a evoluției științei și tehnologiei plasmei din ultimul deceniu demonstrează în mod clar vasta aplicabilitate a plasmei mai ales în sfera științelor vieții. Această idee marchează trecerea de la tratarea unor obiecte la populații celulare vii. Astfel de aplicații includ tratamentul alimentelor, materialelor vegetale și aplicații în medicina umană și veterinară(8).

Utilizarea plasmei reci în tehnologia prelucrării alimentelor este un proces de mare amploare. Pe baza literaturii științifice, non-științifice și a brevetelor, beneficiile tratamentului cu plasmă rece în conservarea alimentelor pot fi rezumate după cum urmează:



- plasma rece indică o eficiență ridicată în inactivarea microbiană la temperaturi de sub 50°C, asigurând o durată de păstrare extinsă a alimentelor, îmbunătățind astfel eficiența lanțului de aprovizionare;

- speciile chimice active ale plasmei se caracterizează prin difuzie rapidă, de înaltă calitate și, prin urmare, acționează pe întreaga suprafață a alimentelor, într-un timp extrem de scurt;

- până în prezent, nu a fost indicată o influență negativă majoră a tratamentului cu plasma rece asupra majorității alimentelor, iar impactul asupra matricei produselor este unul neglijabil. În plus, prin tratamentul cu plasmă rece, utilizarea conservanților s-ar reduce considerabil;

- tehnologia cu plasmă rece nu folosește apă sau alți solvenți, deci este considerată ecologică;

- în general, în urma tratamentului cu plasmă rece nu rămân reziduuri. Totuși, acest aspect nu poate fi universal valabil și necesită studii aprofundate pentru validare lui;

- majoritatea surselor de plasmă rece necesită un aport redus de energie; tehnologia fiind extrem de eficientă din punct de vedere energetic.

Un alt aspect important este acela că tehnologia poate fi aplicabilă atât produselor solide, cât și lichide (9).

Plasma rece ca alternativă pentru produsele antibacteriene comerciale

Eradicarea microorganismelor multi-rezistente este una dintre provocările clinice ale secolului 21. În plus, situația tinde să se agraveze din cauza stagnării producției de noi antibiotice. Societatea pentru Boli infecțioase din America (IDSA) subliniază faptul că, în ultimii ani, numărul de medicamente cu efect antibacterien nou-aprobate continuă să scadă (10, 11). Doar trei dintre cele opt antibiotice aprobate în ultimul deceniu acționează printr-un nou mecanism, diferit de cele clasice, în timp ce restul reprezintă doar variante modificate ale antibioticelor deja cunoscute.



În paralel, rezistența Stafilococului auriu a crescut substanțial: un total de ~ 21% din populațiile de *S. aureus* din Germania sunt rezistente la meticilină/oxacilină (12). Klevens, R.M., et al., 2006(13) a raportat o creștere globală a rezistenței la meticilină a *S. aureus* (MRSA), atingând un procent de 3,1% pe an în SUA. Astfel, există un mare interes pentru noile strategii antimicrobiene. Recent, cercetările privind utilizarea plasmei reci au demonstrat atât proprietățile sale bactericide, virucide, cât și fungicide, datorită generării de specii reactive și particule încărcate (14, 15, 16). Numeroase studii au demonstrat eficacitatea plasmei reci pentru eradicarea în special a microorganismelor planctonice (17, 18). Mai mult, distrugerea cu succes a biofilmelor generate de *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus epidermidis* rezistente la meticilină a fost demonstrată prin utilizarea plasmei non-termice de tip gazos (19).

În contextul numărului mic de noi medicamente și al rezistenței crescute a bacteriilor, dezinfecția eficientă a suprafețelor din cadrul centrelor medicale reprezintă un factor major în prevenirea infecțiilor nosocomiale. În acest sens, primele încercări au fost efectuate de Burts M.L. și colab. (2009) (20) care au reușit să demonstreze faptul că dezinfecția *pagerelor* de spital acoperite experimental cu *Stafilococ auriumeticilino*-rezistent (MRSA) ar putea fi realizată în 30 de secunde de la debutul tratamentului cu plasmă. În general, plasma atmosferică rece, care implică existența unei temperaturi mai mici de 40°C la punctul de aplicare, poate fi obținută în aerul atmosferic pentru a produce molecule reactive precum atomii, ionii și radicalii.

Acest „cocktail” chimic al speciilor reactive poate fi utilizat în diferite aplicații biomedicale, având o eficiență remarcabilă. Cu toate acestea, în datele existente până în prezent, există doar câteva rapoarte cu privire la utilizarea plasmei atmosferice reci pentru decolonizarea bacteriilor aplicate pe suprafețele vitale ale pielii (21). Lademann, O. și colab. (2011) (22), de exemplu, au folosit un jet de plasmă tolerabil pentru țesutul epitelial și au obținut o reducere de 94% a încărcăturii bacteriene utilizând un model *ex vivo* pentru pielea de la nivelul cartilajului articular la suine. Cu toate acestea, jetul de plasmă este capabil să dezinfecteze doar zone restrânse de piele (zona de inhibare de 2 mm).

Plasma rece la temperatura atmosferică (PRA) reprezintă o tehnologie promițătoare non-termică eficientă împotriva unei game largi de agenți patogeni.



Speciile reactive de oxigen (SRO) joacă un rol crucial în inactivare acestora. Sub acțiunea unui stres oxidativ puternic, celulele pot fi deteriorate prin peroxidare lipidică, inactivare enzimatică și clivaj al ADN-ului. Identificarea SRO și înțelegerea rolului acestora este importantă pentru avansarea aplicațiilor PRA pentru o serie de probleme microbiologice complexe.

Tehnologiile de procesare a alimentelor au evoluat foarte mult odată cu evoluția aplicării tratamentelor de temperatură înaltă, a utilizării microorganismelor, conservanților naturali și chimici și aplicarea câmpurilor electromagnetice pentru conservare (9). Utilizarea plasmei reci nu se limitează numai la aplicațiile alimentare, ci și la agricultură (23) și domeniul medical (24). Au fost efectuate numeroase studii cu privire la decontaminarea bacteriilor, drojdiilor, ciupercilor, sporilor și toxinelor cultivate pe medii microbiologice folosind surse de plasmă „în pachet”. În multe cazuri, aceste sisteme au permis o reducere a coloniilor de *E. coli*, *L. monocytogenes* și *Staphylococcus aureus* la un procent nedetectabil, pornind de la o sarcină bacteriană inițială considerabilă (25).

Produsele proaspete, netratate termic rămân principala cauză a dezvoltării unor boli de origine alimentară care implică agenți patogeni precum *E. coli*, *Salmonella spp.* și *L. monocytogenes*, printre altele. Olaimat, A. și Holley, R.A., 2012 (26) susțin că produsele proaspete contaminate cu *E. coli*, *Salmonella* și *L. monocytogenes* precum spanacul, salata, ridichiile, lucerna, ardeiul roșu, pepenii, căpșunile și ale fructe și legume au provocat principalele focare de boli alimentare transmisibile în primele decenii ale secolului XXI.

Între 1982 și 2002, focarele alimentare produse de *E. coli* au devenit mai frecvente, peste 350 de astfel de focare fiind raportate în Statele Unite (27). În 2006, tot în Statele Unite, din cauza unui focar multi-statal de *E. coli* transmis prin intermediul spanacului, 276 de cazuri de boală au fost înregistrate și au avut loc trei decese (28). În 2011, apariția unui focar major asociat cu *E. coli* a avut loc în Germania, implicând 3911 cazuri de boală, urmate de 47 de decese (26).

La fel ca în cazul produselor pe bază de plante proaspete, ansamblul nutrienților din carne o transformă într-un mediu ideal pentru creșterea și proliferarea microorganismelor de degradare, în special a patogenilor alimentari. În acest context, de



mare importanță sunt *E. coli* și *L. monocytogenes*, care, deși sunt inactivate prin prelucrarea clasică, sunt deseori transmise prin alimentele consumate ca atare, precum brânza moale, produse din carne, pește afumat și fructe de mare (29).

Decontaminarea fructelor și legumelor cu plasmă rece

În ultimii ani, tratamentul cu plasmă rece aplicat fructelor și legumelor proaspete a reprezentat obiectul multor cercetări, care au arătat că această tehnologie oferă o bună alternativă la metodele convenționale utilizate în producția de alimente (8).

Într-una dintre lucrările sale, Critzer, F.A. și colab., 2007(30) au investigat eficacitatea descărcării de plasmă într-o atmosferă uniformă la 9 kV, rezultând o reducere remarcabilă a contaminării cu *E. coli* inoculat pe mere, după numai 2 minute de tratament. Rezultate similare au fost înregistrate de Niemira, B.A. și Sites, J., 2008 (31) după 3 minute de tratament cu plasmă atmosferică rece generată prin descărcarea arcului glisant e unor mere. De asemenea, Klockow, P.A. și Keener, K.M., 2009 (32) au aplicat tratament cu plasmă rece pe frunze de spanac preambalate și inoculate cu *E. coli*, prin expunerea acestora timp de 5 minute la plasmă rece. În acest caz, cele mai mari reduceri ale procentului de contaminare au fost obținute după 24 de ore de la depozitare. În acest studiu, parametrul critic studiat a fost reprezentat de prelungirea timpului de păstrare a alimentelor. Un timp record de procesare a fost înregistrat de Wang, H. și colab., 2012 (33) cu un procent de inactivare a *Salmonella inoculată* pe morcovi, castraveți și pere feliate de 90-100%, obținut la numai 4 secunde de la debutul tratamentului cu plasmă rece (34).

Eficiența tehnologiei plasmei pentru decontaminarea fructelor este afectată de mai mulți factori. Puterea de intrare este un parametru vital al tehnicii de prelucrare. Cu cât puterea de intrare este mai mare în timpul tratamentului cu plasmă, cu atât inactivarea microbiană este mai eficientă. Cu toate acestea, trebuie precizat faptul că aplicarea unei puteri mari de intrare poate afecta uneori atributele calitative ale fructelor și legumelor. Timpul de tratament este un alt parametru important care influențează eficiența procesării. Industria procesării fructelor și a legumelor cercetează neconținut tehnologii eficiente pentru a controla activitatea microbiană și perioadele de



depozitare, cu un efect minim asupra calității produselor, luându-se în vedere parametrii precum culoarea, aroma și compoziția fitochimică. De-a lungul ultimilor ani, s-au folosit diferite surse de plasmă pentru inactivarea diferitor clase de agenți patogeni. De exemplu, Critzer, F.A. și colab., 2007 (30) au mai raportat și inactivarea unei tulpini de *Salmonella* din mere prin folosind plasmei reci. S-a constatat faptul că plasma atmosferică este eficientă la temperatura camerei împotriva speciilor microbiene active, reducând considerabil numărul de bacterii, sporii bacterieni, precum și drojdiile, după numai 2 minute de expunere.

O alta echipă de cercetători a studiat influența plasmei atmosferice reci asupra inactivării unor microorganisme din afine. Acestea au fost supuse timp de 0, 15, 30, 45, 60, 90 și 120 de secunde la jet de plasmă rece. Comparativ cu martorul (afine nesupuse tratamentului cu plasmă rece), numărul bacteriilor aerobe a fost redus semnificativ. Într-un alt studiu tratamentul cu plasmă aplicat timp de 10, 60 și 120 secunde a dus la o reducere a numărului de colonii de *Salmonella*, *E. coli* și *Listeria spp.* de pe roșii, până la niveluri nedetectabile din populațiile inițiale. Cu toate acestea, un timp de expunere de până la 300 de secunde a fost necesar pentru reducerea semnificativă a populațiilor de *E. coli*, *Salmonella* și *L. monocytogenes* inoculate în căpșuni. Acest lucru se poate datora diferențelor dintre suprafața netedă a roșiilor și cea poroasă a căpșunilor. S-a raportat eficiența tratamentului cu plasmă rece asupra pepenelui galben și a fructului de mango inoculat cu *S. cerevisiae*, *P. agglomerans*, *Gluconacetobacter liquefaciens* și *E. coli* (35). Cele mai rezistente dintre acestea, *P. agglomerans* și *G. liquefaciens*, au fost aduse sub limita cuantificabilă după 2,5 secunde, în timp ce pentru coloniile de *E. coli* a fost nevoie de 5 secunde de tratament. Tratamentul cu plasmă rece a fost raportat în literatura de specialitate și pentru protecția antimicrobiană a fructelor uscate.

Culoarea și fermitatea fructelor sunt importanți factori calitativi care trebuie luați în considerare după tratamentul cu plasmă rece. Misra, N.N. și colab., 2014(36) au raportat faptul că tratamentul cu plasmă sub presiune efectuat direct asupra produselor ambalate nu a afectat în mod semnificativ culoarea și fermitatea căpșunilor și a roșiilor cherry, însă Ramazzina, I. și colab. 2015 (37) au raportat faptul că tratamentul a afectat într-un mod pozitiv, semnificativ calitatea fructelor de kiwi proaspăt tăiate, prin



menținerea culorii și reducerea apariției zonelor de necroză la nivelul pulpei în timpul depozitării. Totuși, tratamentul cu plasmă rece nu a afectat textura produsului.

Fructele și legumele reprezintă o sursă importantă de produse fitochimice esențiale pentru sănătatea umană. Modificarea capacității antioxidante și a compușilor fenolici din structura fructelor prin tratamentul cu plasmă rece a fost studiată pe larg. Garofuli, I.E. și colab. 2015 (38) au optimizat faza tehnică de tratament cu plasmă rece utilizând trei variabile independente și anume timpul de tratament (3-5 min), volumul probei (2-4 ml) și debitul de gaz aplicat ($0,75-1,25 \times 1 \text{ min}^{-1}$). Tratamentul a avut ca rezultat creșterea cantității de antocianine (228,53 mg /100 g) și compuși fenolici (162,95 mg/100 g) în sucul de cireșe tratat cu plasmă rece, în raport cu cel pasturizat (196,31 și 143,36 mg/100 g) și chiar cel netratat (170,51 și 141,77 mg/100 g). Ramazzina, I. și colab. 2015 (37) au raportat modificări nesemnificative ale antioxidanților, precum acidul ascorbic și polifenolii, în fructele de kiwi, tratate cu plasmă rece. Won, M.Y. și colab. 2017 (39) au observat un potențial antioxidant și conținut fenolic mărit semnificativ în coaja de mandarină, ca răspuns la tratamentul cu plasmă rece.

Decontaminarea produselor de origine animală cu plasmă rece

O problemă deosebit de importantă la nivel mondial reprezintă faptul că în produsele din carne congelate, agenții patogeni precum *E. coli* enterohemoragică (EHEC) pot supraviețui chiar și 180 de zile (40). Pentru a satisface cerințele consumatorilor prin evitarea utilizării conservanților artificiali, dar totodată fără a compromite siguranța alimentară, este necesară dezvoltarea și aplicarea unor noi tehnologii de intervenție în industria procesării cărnii. Tratamentul cu plasmă rece reprezintă o alternativă utilizată cu succes în această ramură alimentară. Potențialul plasmei reci ca nouă tehnologie de decontaminare în sectorul procesării cărnii poate fi justificat prin efectul său de inactivare a unei game largi de microorganisme(8).

În conformitate cu tendințele actuale, la nivel mondial se dezvoltă diverse produse alimentare semipreparate, destinate consumului imediat, tocmai pentru a oferi alternative mai simple și mai rapid de preparat. Cu toate acestea, odată cu consumul



crescut de carne astfel comercializată, a crescut și numărul cazurilor de boli cu origine alimentară. Centrele pentru Controlul și Prevenirea Bolilor (CDC, 2019) au raportat că aproximativ 129 de focare, 3562 de îmbolnăviri, 94 de spitalizări și 2 decese au avut loc între 2000 și 2016 în SUA din cauza consumului de alimente ce conțin piept de pui, inclusiv salată cu pui, chifle și pui la grătar. Dintre patogeni, *Escherichia coli* a fost cauza a 3 focare, 119 îmbolnăviri și 14 spitalizări; *Salmonella* a fost cauza a 23 de focare, 749 de îmbolnăviri și 36 de spitalizări; *Listeria monocytogenes* a provocat 1 focar, 3 îmbolnăviri și 3 spitalizări; iar norovirusul a fost cauza apariției a 39 de focare, 990 de îmbolnăviri și 8 spitalizări (CDC, 2019). Ca atare, s-a constatat faptul că numai consumul de carne de pui inadecvat procesat a determinat un număr considerabil de incidente. Una dintre cauzele contaminării cu agenți patogeni de origine alimentară poate fi expunerea produselor la diferiți contaminanți în timpul procesului de spălare, dezosare și ambalare. Pentru a îmbunătăți siguranța cărnii din punct de vedere microbiologic, sunt aplicate frecvent metode chimice care utilizează acizi organici sau clor în procesul decontaminării industriale. Aceste metode pot induce semnificative probleme de sănătate prin remanența elementelor chimice reziduale pe suprafața cărnii tratate (41). Pe de altă parte, ar putea fi folosite metode de iradiere, dar acestea nu sunt tolerate și acceptate de către consumatori (42). Prin urmare, este necesară dezvoltarea unei metode noi de inactivare a microorganismelor prezente în carnea destinată consumului uman și animal. Plasma rece este o tehnologie non-termică emergentă care ar putea fi utilizată cu succes pentru conservarea produselor din carne. Lee, H.J. și colab. 2011(43) au raportat faptul că tratamentul la 2 kV timp de 2 min cu jeturi de plasmă la presiune atmosferică, alimentată de o sursă de impulsuri de 50 kHz, au redus considerabil numărul coloniilor de *L. monocytogenes* inoculate în pieptul de pui. Mai mult, generarea de plasmă la presiune atmosferică și utilizarea aerului ca gaz de formare a plasmei este opțiunea preferată pentru aplicațiile din industria alimentară (44). Cu toate acestea, niciun studiu nu a raportat încă efecte negative ale tratamentului cu plasmă rece asupra ambalajelor (45).

Speciile de *Salmonella* reprezintă un factor major de risc în ceea ce privește siguranța alimentelor, dovedindu-se prezența acestora în special în ouă și în numeroase alimente care conțin ouă (46). Pentru diminuarea problemelor de siguranță cu privire la



focarele produse de speciile de *Salmonella*, mai multe abordări de decontaminare non-termică asupra suprafeței ouălor au fost dezvoltate începând cu anii 1990, incluzând lumina pulsatilă, ozonul, radiatiile UV și electroliza (47), dar au demonstrat doar un efect limitat.

Din aceasta cauză, o variantă alternativă extrem de eficientă este reprezentată de tehnologiile cu plasmă rece. Donner, A. și Keener, K. 2011 (48) în studiul lor au tratat ouăle în pungi de plastic închise, proces urmat de depozitarea acestora pentru 24 de ore. Au observat o reducere a *S. enteritidis* cu 3 log₁₀.

Utilizarea unui jet de plasmă de radiofrecvență (RF) a influențat eficient și sinergic efectele inhibitorii ale uleiurilor esențiale de plante (usturoi, ulei de busuioc dulce și ulei de tei) împotriva *E. coli*, *S. typhimurium* și *S. aureus* găsite pe ouăle de găină (49). În cadrul studiului s-a constatat inhibarea totală a celor trei tipuri de bacterii de pe coaja de ou după expunerea la plasmă la 40 W. În general, tratamentele cu plasmă rece s-au dovedit a fi eficiente în reducerea microorganismelor patogene din ouă și produse care conțin ouă.

Într-un alt studiu, laptele a fost supus unui tratament plasmatic la 0, 3, 6, 9, 12, 15 și 20 de minute. O reducere semnificativă (54%) a populațiilor de *E. coli* a fost observată la numai 3 minute de tratament, indiferent de conținutul de grăsime din lapte. Numărul inițial al bacteriilor din laptele integral (7,78 log CFU/ml) a scăzut la 3,63 log CFU/ml după 20 de minute de tratament plasmatic. În acest caz, tratamentul nu a provocat nicio modificare semnificativă a valorii pH-ului și a culorii laptelui. De asemenea, nu s-au mai detectat celule viabile nici după o săptămână post-tratament în probele de lapte integral, situația rămânând la fel pe întreaga perioadă de depozitare de 6 săptămâni (50).

Reduceri semnificative ale populației de *E. coli* și *S. aureus* inoculate pe brânză au fost înregistrate după tratamentul cu plasmă (gazul fiind reprezentat de un amestec de He și O₂) (51). Cu toate acestea, după 10 minute de tratament cu plasmă, s-a observat deteriorarea feliilor de brânză.



Gradul de afectare a calității produsele tratate cu plasma rece

1. Culoarea

Culoarea produselor alimentare este un atribut important cu efect direct asupra percepției consumatorilor și, prin urmare, succesul oricărui produs. Culoarea produselor alimentare se datorează în principal prezenței pigmentilor (naturali sau sintetici) și reacțiilor chimice (enzimatice sau non-enzimatice). Orice modificare nedorită a culorii produselor alimentare apărută din cauza tehnicilor de prelucrare reprezintă un mare obstacol pentru acceptabilitatea acestora. Efectele variabile ale tratamentului cu plasmă rece asupra culorii fructelor și legumelor proaspete au fost raportate în funcție de severitatea condițiilor de tratament. Diverși cercetători au raportat modificări nesemnificative de culoare după tratamentul cu plasmă rece asupra căpșunilor, merelor, fructului de kiwi, roșiilor cherry, salatei și morcovilor.

Câțiva cercetători au raportat diminuarea intensității culorii în cazul perioadelor mai mari de tratament. Modificarea culorii s-ar putea datora degradării parțiale a pigmentilor precum clorofila și antocianina, după cum s-a raportat în unele studii. În general, aceste rezultate demonstrează faptul că procesarea cu plasmă rece are un efect minim asupra culorii produselor alimentare la timpi de tratament mai mici. Tipul produsului (întreg sau tăiat, solid sau lichid), parametrii de tratament cu plasmă (tensiunea de intrare, timpul, puterea, gazul de lucru) și condițiile de depozitare sunt câțiva dintre factorii critici care afectează culoarea produselor. Yong și colab. au folosit plasma rece în tratarea pastramei de porc fără adăugarea de nitrit de sodiu. Aceștia au folosit parametrii specifici de procesare a plasmei pentru a obține roșeața specifică acestui produs, fără utilizarea de aditivi chimici. Totalitatea acestor studii extind aria actuală de cercetare pentru dezvoltarea de noi tehnologii de condiționare a alimentelor.

2. Textura

Multe dintre studiile recente raportate sugerează păstrarea texturii produselor alimentare după procesarea cu plasmă rece. În cazul fructelor și legumelor proaspete, nu s-a observat nicio diferență semnificativă după tratamentul cu plasmă rece al căpșunilor, merelor, pepenilor și roșiilor cherry. Într-un alt studiu privind tratamentul căpșunilor în



ambalaje, menținerea fermității acestora s-a dovedit a fi mai bună într-un mediu cu conținut ridicat de oxigen (65% O₂ + 16% N₂ + 19% CO₂) decât într-unul cu azot (90% N₂ + 10% O₂). Acest studiu demonstrează faptul că tipul de gaz plasmatic utilizat reprezintă un factor important al menținerii texturii produselor. Tratamentul cu plasmă rece a semințelor și a leguminoaselor a dus la diminuarea durității și facilitarea procesului de masticăție. Studiile au indicat o reducere a timpului de gătire pentru produsele tratate cu plasmă. Studiile privind tratamentul cu plasmă rece al făinii, au raportat o creștere a calității proteinelor din făina de grâu.

3. pH-ul și aciditatea

pH-ul și aciditatea sunt atribute de calitate strâns reglementate pentru majoritatea produselor alimentare procesate. Orice schimbare a acestora ar putea conduce la un impact negativ asupra gustului, texturii și termenului de valabilitate a produselor. Există mai multe studii raportate în care s-a demonstrat faptul că tratamentul cu plasmă rece modifică pH-ul produselor alimentare. Schimbările de pH și aciditate post-tratament au fost atribuite în principal interacțiunii gazelor reactive cu umiditatea prezentă în produsele alimentare. La produsele alimentare solide, speciile de plasmă reacționează cu apa de suprafață, formând compuși acizi exclusiv la suprafață, în timp ce la produsele lichide, efectele au fost mai pronunțate.

4. Proteinele și enzimele

Mecanismele denaturării proteice prin tratamentul cu plasmă rece s-ar putea datora interacțiunii speciilor reactive plasmatice cu aminoacizii și a structurii secundare, din cauza afectării α -helixului. Efectele tratamentului cu plasmă rece asupra proteinelor musculare au fost studiate pe bucăți de macrou proaspăt, înregistrându-se o reducere a conținutului de apă din rețeaua miofibrilară. Un alt studiu efectuat asupra făinii de grâu a sugerat, de asemenea, modificări ale structurii proteinelor datorită oxidării grupărilor sulfhidril și a formării de legături disulfurice, afectând proprietățile structurale și funcționale.

5. Vitaminele

Analiza sensibilității vitaminelor la diferite tehnici de prelucrare este esențială pentru păstrarea proprietăților nutritive ale produselor alimentare. În timp ce unele vitamine, precum riboflavina (B2), piridoxina (B6) și biotina, sunt de obicei stabile, altele, cum ar fi tiamina (B1) și vitaminele A, C și E, sunt relativ labile.

Majoritatea studiilor raportate privind tratamentul cu plasmă rece al produselor alimentare s-au concentrat doar asupra urmării stabilității acidului ascorbic. Acestea nu au indicat nicio reducere semnificativă a conținutului de acid ascorbic după tratamentul cu plasmă. Cu toate acestea, este importantă sublinierea necesității unor studii suplimentare pentru analiza efectelor plasmă reci asupra altor vitamine din produsele alimentare.

6. Lipidele

Oxidarea lipidică reprezintă o preocupare majoră în ceea ce privește produsele din carne. Acest proces determină modificări nedorite asupra culorii, gustului, mirosului și termenului de valabilitate. Oxidarea lipidelor este un proces complex care implică mecanisme ale lanțului de radicali liberi care formează peroxizi de acid gras sau alți produși de oxidare. Nu s-a observat niciun efect semnificativ asupra oxidării lipidice după tratamentul cu plasmă rece al cărnii de porc proaspăt congelată sau crudă. Cu toate acestea, unele studii au raportat o creștere a oxidării lipidelor la carnea proaspătă de porc și vită după tratarea acesteia pentru o perioadă extinsă de 10 minute. Un alt studiu recent a indicat o nouă aplicabilitate a tratamentului cu plasma rece. În cadrul studiului a fost demonstrată eficacitatea hidrogenului plasmatic utilizat pentru fabricarea uleiului de soia parțial hidrogenat, fără acizi grași. Tehnologia a indicat avantaje unice față de procesele actuale de hidrogenare, deoarece poate fi efectuată la temperatura camerei, sub presiune atmosferică, fără niciun catalizator. Deși această abordare demonstrează o alternativă pentru hidrogenarea catalitică tradițională, sunt necesare cercetări suplimentare pentru a optimiza procesul de tratament și a evalua performanța uleiului parțial hidrogenat obținut din plasmă (52).



Concluzii

Plasma rece este o tehnologie nouă, non-termică, care a demonstrat un potențial remarcabil de decontaminare a alimentelor. Cu toate acestea, majoritatea cercetărilor se concentrează în special pe studiul mecanismului și al capacității acesteia de inactivare microbiană, cu accent limitat pe calitatea alimentelor. S-a demonstrat faptul că prelucrarea cu plasmă rece are efecte minore asupra calității produselor alimentare în timpul tratamentului, precum și pe perioada depozitării. Aceasta tehnologie reprezintă o direcție nouă de cercetare datorită posibilității de explorare a efectelor plasmei reci asupra proprietăților fizico-chimice și senzoriale ale produselor alimentare, atât la nivel micro, cât și macromolecular. Diferențele dintre rezultatele obținute în cadrul studiilor raportate demonstrează necesitatea aprofundării mecanismelor de acțiune ale plasmei, tocmai pentru a facilita înțelegerea efectelor rezultate în urma interacției dintre speciile reactive și componentele alimentare. De asemenea, sunt necesare studii de optimizare pentru a evita impactul negativ al tratamentului cu plasmă rece asupra calității alimentelor.

Referinte bibliografice

1. Bourke, P., Ziuzina, D., Boehm, D., Cullen, P.J. Keener, K., 2018. The Potential of Cold Plasma for Safe and Sustainable Food Production. *Trends in Biotechnology*. 36(6): 615–26. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.11.001>.
2. Pankaj, S.K., Wan, Z., Keener, K.M., 2018, Effects of cold plasma on food quality: A review. *Foods*. 7(1): 4.
3. Whitehead, J.C., 2016. The Chemistry of Cold Plasma. In *Cold Plasma in Food and Agriculture*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. 53–81.
4. Ender E.H., Salvi, D., Fridman, G., Schaffner, D.W., Karwe, M.V., 2021. Microbial Inactivation by Non-Equilibrium Short-Pulsed Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge (Cold Plasma): Numerical and Experimental Studies. *Food Engineering Reviews* 13 (1): 136–47. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09256-7>.
5. Varilla, C., Marcone, M., Annor, G.A., 2020. Potential of cold plasma technology in ensuring the safety of foods and agricultural produce: A review. *Foods*. 9(10): 1435.
6. Mandal, R., Singh, A., Singh, A.P., 2018. Recent developments in cold plasma decontamination technology in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 80, 93–103.
7. Gavahian, M., Chu, Y.-H. Khaneghah, A.M., Barba, F.J., Misra, N.N., 2018. A critical analysis of the cold plasma induced lipid oxidation in foods. *Trends in Food Science & Technology*. 77: 32–41.
8. von Woedtke, Th., Metelmann, H.-R., Weltmann, K.-D., 2014. Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of in Vivo Application of Cold Atmospheric Plasma. *Contributions to Plasma Physics*. 54(2): 104-117 <https://doi.org/10.1002/ctpp.201310068>.
9. Misra, N.N., Schlüter, O., Cullen, P.J., 2016. *Cold Plasma in Food and Agriculture, Fundamentals and Applications*, Ed AP Elsevier.
10. Rice, L.B., 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis*. 197(8): 1079-81. doi: 10.1086 / 533452.
11. Spellberg, B., Guidos, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H.W., 2008. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 46 (2): 155-64.
12. EARSS MT Raport anual EARSS 2008. pp. 55-57., 2009, disponibil: <http://www.rivm.nl/ro/>.
13. Klevens, R.M., Edwards, J.R., Tenover, F.C., McDonald, L.C., Horan, T., 2006. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin Infect Dis*. 42 (3): 389-91.

14. Zimmermann, J., Dumler, K., Shimizu, T., Morfill, G., Wolf, A., 2011. Effects of cold atmospheric plasma on adenoviruses in solution. *J Phys D: Phys Phys.*44 (50): 1-9.
15. Shimizu, T., Zimmermann, J.L., Morfill, G.E., 2011. The bactericidal effect of surface micro-discharge plasma under different ambient conditions. *New Journal of Physics.* 13: 1-7.
16. Kong, M.G., Kroesen, G., Morfill, G.E., Nosenko, T., Shimizu, T., 2009. Plasma medicine: an introductory analysis. *New Journal of Physics.* 11: 1–35.
17. Ermolaeva, S.A., Varfolomeev, A.F., Chernukha, M.Y., Yurov, D.S., Vasiliev, M.M., 2011. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J Med Microbiol.* 60 (Pt 1): 75-83.
18. Joshi, S.G., Paff, M., Friedman, G., Fridman, G., Fridman, A., 2010. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: a biocidal efficacy study of non-thermal dielectric barrier plasma discharge. *Am J Infect Control.* 38 (4): 293-301.
19. Kim, J.J., Maguire, P., Soberon, F., Daniels, S., O'Gara, J.P., 2011. Disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms using a remote non-thermal gas plasma. *J Hosp Infect.* 78 (3): 204-207.
20. Burts, M.L., Alexeff, I., Meek, E., McCullers, J.A., 2009. Use of atmospheric non-thermal plasma as a disinfectant for objects contaminated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *American Journal of Infection Control.* 37(9), 729-733.
21. Kim, P.Y., Kim, Y.S., Koo, I.G., Jung, J.C., Kim, G.J., 2011. Bacterial Inactivation of Wound Infection in a Human Skin Model by Liquid-Phase Discharge Plasma. *PLoS One.* 6(8): e24104.
22. Lademann, O., Kramer, A., Richter, H., Patzelt, A., Meinke, M.C., 2011. Skin Disinfection by Plasma-Tissue Interaction: Comparison of the Effectivity of Tissue-Tolerable Plasma and a Standard Antiseptic. *Skin Pharmacol Physiol.* 24(5): 284-8.
23. Puač, N., Gherardi, M., Shiratani, M., 2018. Plasma agriculture: A rapidly emerging field. *Plasma Processes and Polymers.* 15(2): 1700174.
24. Bobkova, E., Rybkin, V., 2015. Peculiarities of Energy Efficiency Comparison of Plasma Chemical Reactors for Water Purification from Organic Substances. *Plasma Chemistry & Plasma Processing.* 35(1): 133-142.
25. Han, L., Patil, S., Boehm, D., Milosavljevic, V., Cullen, P.J., Bourke, P., 2016. Mechanisms of Inactivation by High-Voltage Atmospheric Cold Plasma Differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol.* 82 (2), 450-458.
26. Olaimat, A., Holley, R.A., 2012, Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review, *Food Microbiology*, 32(1), 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.016>.
27. Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M., Swerdlow, D.L., 2005. Epidemiologia *Escherichia coli* O157: focare H7, Statele Unite, 1982–2002. *Emerg. Infecta. Dis.* 11(4): 603-609.



28. Goodburn, C., Wallace, CA, 2013. Microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh products: a review. *Food Control*.32(2): 418–427.
29. Martin, B., Perich, A., Gomez, D., Yanguela, I., Rodriguez, A., Garriga, M., et al., 2014. Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food Microbiology*. 44: 119-127.
30. Critzer, F.A., Kelly-Wintenberg, K., South, S.L. Golden, D.A., 2007. Atmospheric plasma inactivation of foodborne pathogens on fresh produce surfaces. *J. Food Prot.* 70: 2290-2296.
31. Niemira, B.A., Sites, J., 2008. Cold plasma inactivates *Salmonella* Stanley and *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on golden delicious apples. *J. Food Prot.* 71: 1357-1365.
32. Klockow, P.A., Keener, K.M., 2009. Safety and quality assessment of packaged spinach treated with a novel ozone-generation system. *LWT – Food Sci. Technol.* 42: 1047-1053.
33. Wang, H., Zhou, B., Feng, H., 2012. Surface characteristics of fresh produce and their impact on attachment and removal of human pathogens. *Produce contamination V.M. Gomez-Lopez (Ed.). Decontamination of Fresh and Minimally Processed Produce.* Wiley-Blackwell Publishing, USA. 43-55.
34. Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P.J., Keener, K.M., Bourke, P., 2014. Cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. *Food Microbiol.* 42: 109-116.
35. Perni, S., Liu, D.W., Shama, G., Kong, M.G., 2008. Cold atmospheric plasma decontamination of the pericarps of fruit. *J Food Prot.* 71(2):302-8. doi: 10.4315/0362-028x-71.2.302.
36. 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. *Journal of Food Engineering.* 125: 131-138.
37. Ramazzina, I., Annachiara, B., Rizzi, F., Tappic, S., Ragni, L., Sacchetti, G., Rocculi, P., 2015. Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwi fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 107: 55-65.
38. Garofulic, I.E., Rezek-Jambrak, A., Milosevic, S., Dragovic-Uzelac, V., Zoric, Z., Herceg, Z., 2015. The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca) juice. *LWT Food Sci. Technol.* 62(1): 894-900.
39. Won, M.Y., Lee, S.J., Min, S.C., 2017. Mandarin preservation by microwave-powered cold plasma treatment. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 39: 25– 32.
40. Ro, E.Y., Ko, Y.M., Yoon, K.S., 2015. Supraviețuirea *Escherichia coli* enterohemoragică patogenă (EHEC) și controlul cu oxid de calciu în produsele din carne congelate. *Food Microbiol.* 49.
41. Ko, J.K., Ma, Y.H., Song, K.B., 2005. Effect of electron beam irradiation on the microbial growth and qualities of chicken breast. *Applied Biological Chemistry.* 48(2): 120-127.
42. Frewer, L.J., Bergmann, K., Brennan, M., Lion, R., Meertens, R., Rowe, G. et al., 2011. Consumer response to novel agri-food technologies: Implications for predicting consumer acceptance of



- emerging food technologies. *Trends in Food Science & Technology*. 22(8): 442-456. 10.1016/j.tifs.2011.05.005.
- 43.** Lee, H.J., Jung, H., Choe, W., Ham, J.S., Lee, J.H., Jo, C., 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on agar and processed meat surfaces by atmospheric pressure plasma jets. *Food Microbiology*. 28(8): 1468-1471. 10.1016/j.fm.2011.08.002.
- 44.** Pina-Perez, M.C., Martinet, D., Palacios-Gorba, C., Ellert, C., Beyrer, M., 2020. Low-energy short-term cold atmospheric plasma: Controlling the inactivation efficacy of bacterial spores in powders. *Food Research International*. 130: 108921, 10.1016/j.foodres.2019.108921.
- 45.** Roh, S.H., Yeong, J.O., Seung, Y.L., Joo, H.K., Sea, C.M., 2020. Inactivation of *Escherichia Coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria Monocytogenes*, and *Tulane Virus* in Processed Chicken Breast via Atmospheric in-Package Cold Plasma Treatment. *Lwt*. 127(March): 109429.
- 46.** Berchieri, Jr., A., Wigley, P., Page, K., Murphy, C., Barrow, P., 2001. Further studies on vertical transmission and persistence of beech *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* type 4 in chickens. *Avian Pathol*. 30: 297-310.
- 47.** Bermudez-Aguirre, D., Corradini, M.G., 2012. Kinetics of inactivation of *Salmonella* spp. Under heat and emergent treatments: a review. *Food Res. Int*. 45(2): 700-712.
- 48.** Donner, A., Keener, K., 2011. Investigation of in-package ozonation. *Journal of Purdue undergraduate research*. 1:3. <https://doi.org/10.5703/jpur.01.1.2>.
- 49.** Matan, N., Nisoa, M., Matan, N., 2013. Antibacterial activity of essential oils and their enhanced major components of atmospheric RF plasma. *Food control*, 39: 97-99.
- 50.** Gurol, C., Ekinci, F.Y., Aslan, N., Korachi, M., 2012. Low temperature plasma for decontamination of *E. coli* in milk, *International Journal of Food Microbiology*. 2012, 157 (1): 1-5.
- 51.** Lee, H.J., Jung, S., Jung, H., Park, S., Choe, W., Ham, J.S., Jo, C., 2012. Evaluation of a plasma dielectric barrier discharge system for inactivation of pathogens on cheese slices. *J. Anim. Știință. Tehn.* 54: 191-198.
- 52.** Pankaj, S.K., Wan, Z., Keener, K.M., 2018. Effects of cold plasma on food quality: A review. *Foods*, 7(1): 4.