



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DOS MATERIAIS

ISABELY KEYVA FERNANDES COSTA

**TRATAMENTO *In vitro* DO *Colletotrichum brevisporum* COM PLASMA FRIO
ATMOSFÉRICO ASSOCIADO À CERA DE CARNAÚBA VISANDO APLICAÇÃO
EM PÓS-COLHEITA DE FRUTOS**

MOSSORÓ

2018

ISABELY KEYVA FERNANDES COSTA

**TRATAMENTO *In vitro* DO *Colletotrichum brevisporum* COM PLASMA FRIO
ATMOSFÉRICO ASSOCIADO À CERA DE CARNAÚBA VISANDO APLICAÇÃO
EM PÓS-COLHEITA DE FRUTOS.**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência e Engenharia dos Materiais do
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia dos Materiais da Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Mestre em Ciência e
Engenharia dos Materiais.

Linha de Pesquisa: Materiais e Processos para
a Sustentabilidade do Semiárido.

Orientador: Prof. Dr. Rui Sales Junior
Co- orientador: Prof. Dr. Clodomiro Alves
Junior

MOSSORÓ

2018

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

C837t Costa, isabely.
Tratamento in vitro do colletotrichum
brevisporum com plasma frio atmosférico associado
à cera de carnaúba visando aplicação em pós-colheita
de frutos. / isabely Costa. - 2018.
60 f. : il.

Orientador: Rui Sales.
Coorientador: Clodomiro Alves.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência e Engenharia de Materiais, 2018.

1. Pós-colheita. 2. Cera de carnaúba. 3.
Plasma.. I. Sales, Rui , orient. II. Alves,
Clodomiro, co-orient. III. Título.

ISABELY KEYVA FERNANDES COSTA

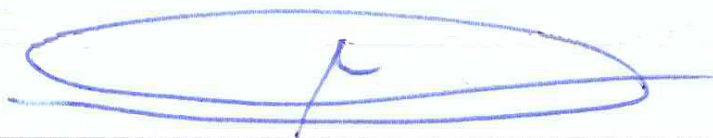
**TRATAMENTO *In vitro* DO *Colletotrichum brevisporum* COM PLASMA FRIO
ATMOSFÉRICO ASSOCIADO À CERA DE CARNAÚBA VISANDO APLICAÇÃO
EM PÓS-COLHEITA DE FRUTOS**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência e Engenharia dos Materiais do
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia dos Materiais da Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Mestre em Ciência e
Engenharia dos Materiais.

Linha de Pesquisa: Materiais e Processos para
a Sustentabilidade do Semiárido

Defendida em: ____ / ____ / 2 ____.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Clodomiro Alves Junior



Prof. Dr. Júlio Gomes Junior



Profa. Dra. Marcia Viviane Alves Saraiva

Dedico esta conquista a minha mãe e ao meu esposo pelo apoio e incentivo de vida, estimulando a seguir sempre com perseverança e reforçando a ideia de que, se trabalhamos com determinação, chegaremos ao final de cada objetivo com sucesso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida e por ter me dado força e determinação nessa caminhada para realização deste trabalho.

A minha família, pelo apoio e incentivo durante toda a jornada. Em especial a minha mãe, Marta Maria Fernandes.

Ao meu esposo, Clecio Junior pelo amor, companheirismo e incentivo em trabalhar sempre com dedicação e determinação.

Ao professor Rui Sales Junior, meu orientador, pelo auxílio e as preciosas orientações na execução desse trabalho

Ao meu co-orientador Clodomiro Alves dos Santos, pela orientação, compreensão, confiança, incentivo e por toda a contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) pelas oportunidades de ensino e por toda estrutura para realização de pesquisas científicas.

À Pós-graduação em Ciência e Engenharia dos materiais, em especial a todos que compõem o corpo docente, pelos ensinamentos transmitidos durante o mestrado, contribuindo assim, para minha formação profissional.

À Equipe LABLASMA pelo conhecimento compartilhado e ajuda na execução deste trabalho, em especial a Jucier Oliveira.

À equipe do laboratório de fitotecnia, em especial a técnica Naama Melo e a doutoranda Andréia Mitsa pelo amizade e ajuda na execução deste trabalho, minha sincera gratidão.

Aos meus amigos da pós-graduação, em especial a Majara Raquel pela amizade, ajuda e companheirismo durante toda a jornada.

E por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

Diversos frutos apresentam características de elevada atividade respiratória, o que contribui significativamente para um rápido amadurecimento e para o desenvolvimento de patógenos em um curto período de tempo, com consequente redução de sua vida útil pós-colheita. Em virtude disto, métodos alternativos de controle que aumentam a vida útil pós-colheita destes frutos vêm sendo estudados, como a utilização do plasma frio à pressão atmosférica. Neste sentido, este trabalho apresentou um estudo experimental *in vitro* com o objetivo de verificar ação do plasma frio à pressão atmosférica por descarga de barreira dielétrica (DBD), quanto a inativação do *Colletotrichum brevisporum* presentes em diversos tipos frutos, e verificar se a presença do revestimento de cera de carnaúba iria potencializar ou reduzir sua ação. Esporos deste fungo em suspensão (100 ml de solução contendo 4×10^4 conídios $\times$ ml⁻¹) foram inoculados tanto em placas de petri contendo meio de cultura BDA quanto em placas contendo ágar batata dextrose (BDA) misturados com cera de carnaúba. A descarga foi produzida por pulsos de tensão elétrica de 45 kV aplicado na frequência de 405 Hz, durante 9 minutos e caracterizado quimicamente por espectroscopia de emissão ótica (OES). Foi verificado que o plasma foi efetivo para ambos os casos, com e sem cera, imediatamente após inoculação dos fungos. Além do mais, na presença da cera foi verificado que o plasma foi efetivo mesmo quando aplicado imediatamente antes da inoculação da suspensão. Esses resultados indicam que o plasma DBD com e sem a utilização da cera de carnaúba apresentou eficiência quanto a inativação do *Colletotrichum brevisporum* e que essa técnica é promissora no controle antifúngico, com potencial de uso em substituição aos fungicidas tradicionais na fase de pós-colheita, e o desafio é aplicação em grande escala e estudos devem ser realizados com este objetivo.

Palavras-chave: pós-colheita, cera de carnaúba, plasma.

ABSTRACT

Several fruits have characteristics of high respiratory activity, which contributes significantly to a rapid maturation and to the development of pathogens in a short period of time, with consequent reduction in their post-harvest shelf life. Because of this, alternative control methods that increase the post-harvest shelf life of these fruits have been studied, such as the use of cold plasma at atmospheric pressure. In this sense, this work presented an experimental in vitro study with the objective to verify the action of cold plasma at atmospheric pressure by discharge of dielectric barrier (DBD), inactivation of *Colletotrichum brevisporum* present in several types of fruits, and to verify if the presence of carnauba wax coating would potentiate or reduce its action. Spores of this suspension fungus (100 ml solution containing 4×10^4 conidia $\times$ ml⁻¹) were inoculated into both petri dishes containing BDA culture medium and potato dextrose agar (BDA) plates mixed with carnauba wax. The discharge was produced by pulses of electric voltage of 45 kV applied in the frequency of 405 Hz, during 9 minutes and characterized chemically by optical emission spectroscopy (OES). It was verified that the plasma was effective for both cases, with and without wax, immediately after inoculation of the fungi. Moreover, in the presence of the wax it was found that the plasma was effective even when applied immediately prior to inoculation of the suspension. These results indicate that DBD plasma with and without the use of carnauba wax showed efficiency in the inactivation of *Colletotrichum brevisporum* and that this technique is promising in antifungal control, with potential to replace traditional fungicides in the post-harvest phase, and the challenge is large-scale implementation and studies must be carried out with this goal.

Key words: post-harvest, carnauba wax, plasma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Padrão de respiração de um fruto climatérico	21
Figura 2- A doença antracnose nos frutos: a) mamão b) banana c) manga d) morango	22
Figura 3- Características morfológicas do <i>Colletotrichum brevisporum</i> .(A, anverso; B, reverso); C-E: apresoria; F, G: Conídio (barras de escala C-G = 10 µm).	23
Figura 4- Diagrama esquemático de quatro estados da matéria	26
Figura 5- Constituintes do Plasma.....	27
Figura 6- Curva característica da voltagem X corrente entre dois eletrodos, numa descarga elétrica em gases.....	28
Figura 7- Configurações básicas de DBD a) plano com eletrodos de dielétrico, b) plano com um único eletrodo coberto com dielétrico, c) plano com dielétrico no espaço de descarga d) configuração coplanar onde ambos os eletrodos são incorporados dentro do dielétrico e) configuração para geração de descarga superficial com um eletrodo incorporado em dielétrico	31
Figura 8- Os tipos de regime DBD a) modo difuso b) modo filamentar.....	32
Figura 9- Mecanismos de inativação microbiana	33
Figura 10- Espectro de emissão óptica característico do plasma DBD.	35
Figura 11- Desenho do protocolo utilizado para o experimento I.....	36
Figura 12- Desenho do protocolo experimental utilizado para o experimento II.....	37
Figura 13- Crescimento fúngico do <i>colletotrichum brevisporum</i> . Ver lado anverso (esquerda) e (direita) reverso.....	39
Figura 14- Conídios do <i>colletotrichum brevisporum</i>	40
Figura 15- Aparato experimental.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 16- Crescimento das unidades formadoras de colônias (UFC) após tratamento com plasma. a) ST _v , b) TvPI, c) Tv24I e d) TvP+24I.....	44
Figura 17- Crescimento das unidades formadoras de colônias (UFC) com revestimento de cera de carnaúba após tratamento com plasma a) ST, b) ST _c , c) T _c AI , d) T _c PI e) T _c P+24I f) T _c 24I.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Tratamentos x UFC	44
Gráfico 2- Tratamentos x UFC (contendo revestimento de cera de Carnaúba)	46
Gráfico 3- OES para o sistema DBD.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação do plasma baseado na Temperatura	29
Tabela 2-Unidade formadora de colônias por mL (UFC/ml) do <i>C. brevisporum</i> após tratamentos com Plasma	42
Tabela 3- Unidade formadora de colônias por mL (UFC/ml) do <i>C. brevisporum</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DBD	Descarga de barreira dielétrica
LTP	Plasma de baixa temperatura
HTP	Plasma de alta temperatura
CAPP	Plasma Frio de Pressão Atmosférica
ROS	Espécies reativas de oxigênio
OES	A espectroscopia de emissão óptica
UFC	Unidade formadora de colônias
BDA	Agar batata dextrose
MDA	Peroxido lipídico malondialdeído
UV	Radiação ultravioleta
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

LISTA DE SÍMBOLOS

G^0 Átomo ou molécula no estado fundamental

G^+ Íon deste gás e

e^- Élétron.

% Porcentagem

kV Quilovolts

Hz Hertz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Fruticultura.....	20
2.1.1 <i>Colletotrichum brevisporum</i>	22
2.2 Revestimentos de frutos	24
2.2.1 Cera de carnaúba	25
2.3 Plasma.....	26
2.3.1 Plasma DBD	30
2.3.2 Aplicação do plasma na inativação de microrganismos	32
2.3.3 Oxidação lipídica por plasma.....	34
2.4 Espectroscopia de emissão óptica (OES)	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Protocolo experimental	36
3.2 Aparato experimental.....	38
3.3 Isolado e produção do inóculo	39
3.4 Preparação do revestimento de cera de carnaúba.....	41
3.5 Análise de Espectroscopia de emissão óptica (OES).....	41
3.6 Análise estatística.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Caracterização óptica.....	48
5 CONCLUSÕES.....	49
6 REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Diversos frutos possuem elevada atividade respiratória e produção de etileno, sendo assim chamadas de frutos climatéricos. Estes apresentam rápido amadurecimento e possui facilidade para o desenvolvimento de patógenos em um curto intervalo de tempo na fase pós-colheita. Sendo assim, faz-se necessário alguns cuidados no cultivo, manejo e armazenamento pós-colheita, objetivando-se evitar perdas por danos mecânicos, amadurecimento rápido e ataque fúngico (BAUTISTA-BANÕS et al., 2013 ; JACOMINO et al., 2007). Tais problemas são responsáveis pela redução na qualidade comercial dos frutos e consequentes perdas econômicas para as empresas do setor produtivo

O gênero *Colletotrichum* é um dos principais patógenos causador da antracnose em diversas culturas. Como patógenos de frutos, as principais culturas afetadas são morango, manga, abacate, banana e principalmente o mamão (CANNON et al., 2012). Essa doença é responsável por importantes perdas pós-colheita, refletindo na redução do período de conservação e consequentemente a não aceitabilidade por parte do consumidor final (LUIZA et al., 2009; MADANI et al., 2015; RETRIEVED, 2016).

Na fase pós-colheita emprega-se diversos tratamentos que visam o controle de doenças pós-colheita e do amadurecimento rápido dos frutos que, se não controlados, afetam sua qualidade comercial. Entre os diversos compostos que podem ser empregados, estão aqueles à base de proteínas, lipídeos e polissacarídeos. A partir destes é possível desenvolver filmes comestíveis, biodegradáveis e não tóxicos que, quando aplicados, resultam em frutos com melhor qualidade organoléptica e melhor aparência externa, mais atrativa para o consumidor (FERREIRA et al., 2016; SAUCEDO-POMPA et al., 2007). A cera de carnaúba é um lipídio obtido a partir da palmeira brasileira *Copernicia cerifera* e é amplamente utilizada como revestimento filmogênico pelas empresas de beneficiamento de frutos. Por apresentar baixa polaridade e ser hidrofóbica, quando aplicados aos frutos favorece a redução de perda de água, taxa respiratória, atividade metabólica e murchamento, além de proporcionar maior brilho, melhor aparência externa e preservando as características físico-químicas dos mesmos (LUVIELMO; LAMAS, 2012; FERNÁNDEZ-GUTIERREZ et al., 2010; PEREIRA et al., 2006; MAHAJAN et al., 2014).

A cera de carnaúba associada a fungicidas apresenta boa eficiência nos controles de doenças pós-colheita (VIANA et al., 2008). Entretanto, devido à restrição crescente do uso de produtos químicos e uma vez que o uso da cera sem ação dos fungicidas não apresenta ação antifúngica, sua eficiência torna-se limitada. Em virtude disto, métodos alternativos de controle que aumentam a vida útil pós-colheita dos frutos vêm sendo estudados, como plasma frio à pressão atmosférica, que quando aplicado aos frutos tende a eliminar a atividade microbiana na superfície do produto (SCHNABEL et al., 2015; LU et al., 2014) e ainda modificar as propriedades da superfície dos revestimentos filmogênicos, promovendo barreiras antimicrobianas (AROLKAR et al., 2015; OH et al., 2016).

O plasma é um gás ionizado e eletricamente neutro constituído de fótons, elétrons, íons positivos e negativos, radicais livres, moléculas excitadas e não-excitadas, radiações UV e calor (MISRA et al., 2014; YUSAF; AL-JUBOORI, 2014; PANKAJ et al., 2015; OH et al., 2016). Durante a geração de plasma podem ser produzidas espécies como oxigênio, ozônio, nitrogênio, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e óxido nítrico. Essas espécies estão sendo estudadas na descontaminação de alimentos através da inativação dos microrganismos. Estas são revertidas a gás atmosférico original no prazo de minutos a horas após o tratamento, interagem com macromoléculas celulares tais como lipídios e proteínas, e comprometem a sua funcionalidade, conduzindo-os à morte celular (KEENER, 2011; LU et al 2014).

Uma das maneiras de se gerar plasma é através da descarga de barreira dielétrica - DBD. Essa descarga é um plasma frio de não equilíbrio a pressão atmosférica. O plasma DBD ocorre quando uma diferença de potencial é aplicada entre dois eletrodos preenchidos com gás, em pressão atmosférica, em que pelo menos um dielétrico sólido é inserido entre eles (FERNÁNDEZ-GUTIERREZ et al., 2010; PANKAJ et al., 2015). Os principais dielétricos usados são vidro, plástico e quartzo. Ao aplicar uma diferença de potencial entre os eletrodos, cargas elétricas se acumulam na superfície dielétrica até um determinado limite, ocorrendo uma ruptura de rigidez dielétrica do gás, gerando o plasma (BHIDE, 2016).

O plasma frio à pressão atmosférica elimina a necessidade de um sistema de vácuo, tornando o processo mais prático e barato (LU et al., 2014). Uma das características atrativas do plasma atmosférico no estado de não equilíbrio termodinâmico é o seu caráter químico, produzido pela abundância de espécies ativas, que elimina a necessidade de temperaturas elevadas do gás, com temperaturas próximo à ambiente (NASCIMENTO,

2011; MATTHES et al., 2013) e principalmente por se tratar de um processo que não causa efeitos indesejáveis como toxicidade residual e poluição ambiental, além de não oferecer e riscos para a saúde humana (SCHNABEL et al., 2015; LU et al., 2014; MISRA et al., 2014).

Assim, é provável que a combinação dos dois métodos: revestimentos lipídicos (cera de carnaúba) associado ao tratamento por plasma pode oferecer uma alternativa promissora para aumentar a conservação e manter a qualidade dos frutos.

Deste modo, foi realizado um estudo experimental *in vitro* com o objetivo de verificar a ação do plasma frio à pressão atmosférica por descarga de barreira dielétrica (DBD), quanto a inativação de um dos principais fungos que se prolifera na pós-colheita de vários frutos, principalmente no mamão, o *Colletotrichum brevisporum*. Além disso, o trabalho objetivou verificar se o revestimento de cera de carnaúba potencializa ou reduz o efeito do plasma.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fruticultura

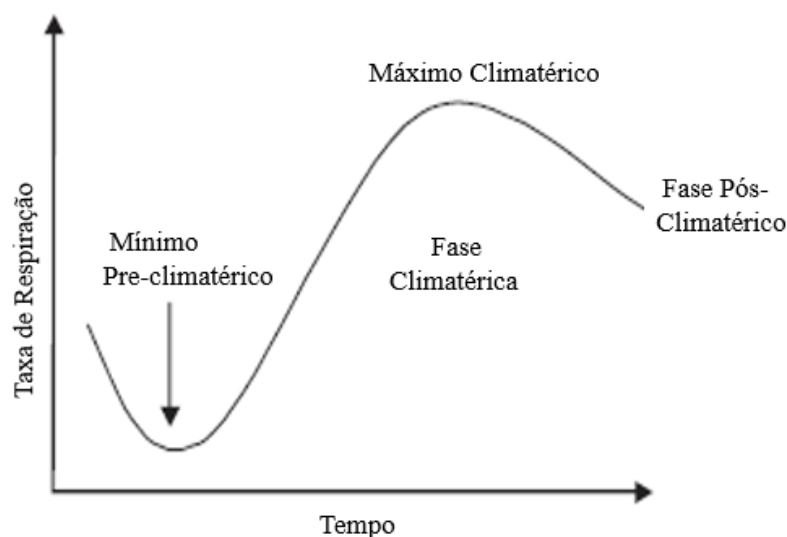
Os frutos são produtos comestíveis de vital importância e que devem ser consumidos diariamente por apresentarem valores nutricionais e medicinais elevados, como vitaminas, minerais, diferentes fibras alimentares, compostos protetores que ajudam a regular o organismo e antioxidantes que são nutrientes essenciais.

No processo de beneficiamento dos frutos geralmente para o mercado nacional praticamente não existe instalações de armazenamento, fazendo com que as atividades de operação pós-colheita acabem sendo realizadas no campo, onde os frutos estão expostos a luz do sol, alta umidade relativa e poeira. Diferente do beneficiamento para o mercado externo, onde as operações são feitas na empacotadeira sob condições controladas de temperatura, onde os mesmos passam por processos bem definidos de tratamento, dependendo da legislação de importação do país de destino (BAUTISTA-BANÕS et al., 2013).

Diversos frutos, a exemplo da manga, abacate, banana, goiaba e mamão são classificados como climatéricos que durante a transição entre o crescimento e a senescência ocorrem mudanças bioquímicas que são iniciadas pela produção autocatalítica de etileno, favorecendo um aumento na respiração, e conseqüentemente sua senescência, caracterizando assim, uma vida pós-colheita relativamente curta (CHITARRA e CHITARRA, 2005; SINGH; SUDHAKAR RAO, 2011).

Este comportamento climatérico é exemplificado na Figura 1. A menor taxa de respiração acontece na fase mínimo pré-climatérico, ainda não comestível. O ápice da maturação acontece no pico da taxa de respiração, fase máximo climatérico. A partir deste pico da taxa de respiração inicia-se o declínio para a fase pós-climatérica, onde ocorre a senescência do fruto.

Figura 1- Padrão de respiração de um fruto climatérico

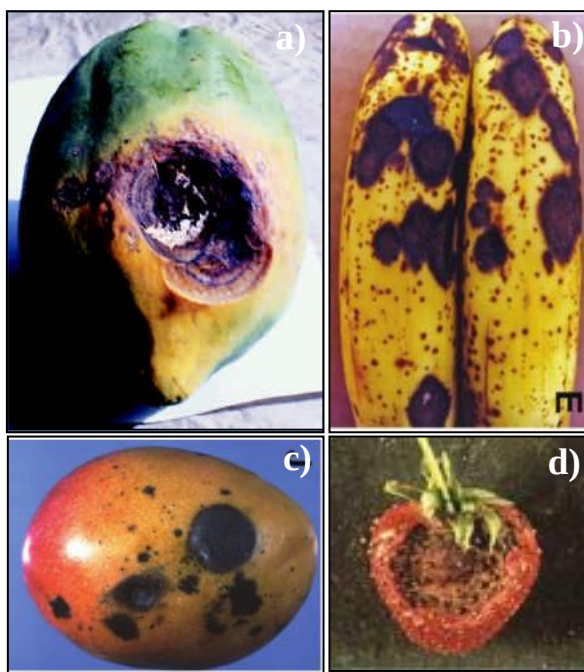


Fonte:(VERMA et al., 2016)

Apesar da importância destas culturas, a comercialização destes frutos, principalmente a do mamão, apresentam uma série de limitações como amadurecimento rápido, aumento da suscetibilidade aos danos mecânicos e infecções patogênicas, durante o manuseio e armazenamento, reduzindo vida útil pós-colheita e ocasionando perdas que podem chegar a 40% (SHARMA, 2015; ZERPA-CATANHO et al., 2017).

As infecções patogênicas causadas por fungos são os problemas mais significativos durante o manuseio e armazenamento dos frutos, especialmente o mamão porque, com poucas exceções, seus sintomas são observados no exterior da fruta (BAUTISTA-BANÕS et al., 2013). Dentre os vários patógenos que acometem as culturas no período pós-colheita, os do gênero *Colletotrichum* são os mais comuns. Este foi recentemente eleito o oitavo grupo mais importante de fungos patogênicos das plantas no mundo, com base na importância científica (DEAN et al., 2012). É o principal agente microbiano que ocasiona a antracnose e as principais culturas afetadas são morango, goiaba, manga, abacate, banana e mamão (CANNON et al., 2012; ABAYASEKARA et al., 2013; SOARES-COLLETTI; LOURENÇO, 2014; MADANI et al., 2015) (Figura 2).

Figura 2- A doença antracnose nos frutos: a) mamão b) banana c) manga d) morango



Fonte: Adaptado:(HOWARD et al., 1992; CANNON et al., 2012; ABAYASEKARA et al., 2013)

2.1.1 *Colletotrichum brevisporum*

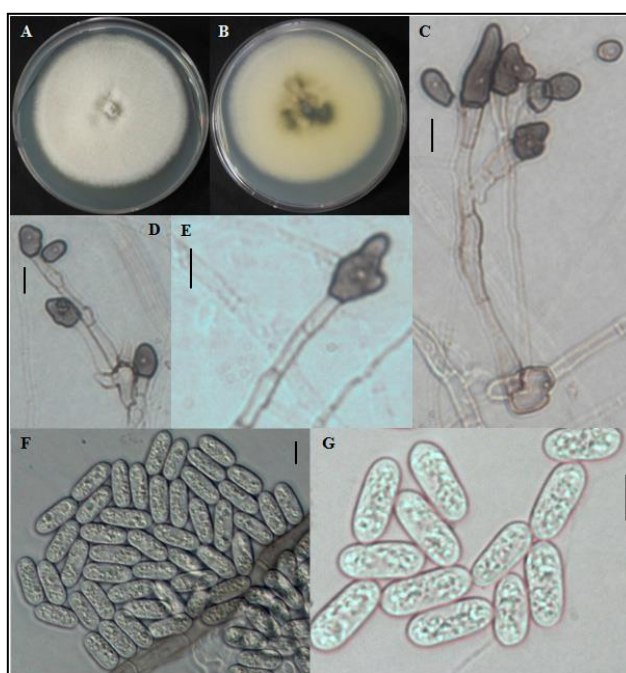
O gênero *Colletotrichum* é um dos principais patógenos que atacam frutos de diversas culturas em pré e pós-colheita (NOIREUNG et al., 2012). Este gênero apresenta uma série de espécies, que se diferenciam uma das outras por pequenos traços morfológicos e recentemente por características moleculares (PAUL et al., 2014; LIU et al., 2016).

A espécie *C. brevisporum* apresenta as seguintes características morfológicas: As colônias no anverso apresentam micélios em pequenos tufo, brancos e com conídios, e o lado reverso um negruzado escuro no centro com bordas brancas a acinzentadas com um halo branco. Os conídios exibem formatos cilíndricos com extremidades claramente redondas, de paredes lisas, hialinas e variando em tamanho de $12,2 - 24,2 \times 2,6 - 6,0 \mu\text{m}$. As apresorias em torno de $10,0 - 16,8 \times 5,0 - 9,4 \mu\text{m}$ em culturas de forma irregular, às vezes ovoides,

tornando-se complexas ao longo do tempo e taxa de crescimento 7,5 - 9,8 (NOIREUNG et al., 2012; PAUL et al., 2014; ALMEIDA, 2015) (Figura 3).

A espécie *C. brevisporum*, especificamente, apresentou os primeiros registros de proliferação em mamões no Brasil em 2012 na região Nordeste (LIMA et al., 2013). Esta espécie de patógeno, considerado agente etiológico da doença antracnose, apresenta como sintomas lesões cilíndricas na superfície do fruto, que gradativamente aumentam de tamanho e tornam-se elípticas, profundas e com coloração de pálida a preta (LIMA et al., 2013; BEZERRA et al., 2015).

Figura 3- Características morfológicas do *Colletotrichum brevisporum*. (A, anverso; B, reverso); C-E: apresoria; F, G: Conídio (barras de escala C-G = 10 µm).



Fonte: (PAUL et al., 2014)

Devido sua incidência nas diversas culturas, existe uma serie de tratamento contra a proliferação fúngica pós-colheita, como tratamentos químicos , físicos já estabelecidos , além de métodos ainda em fases de experimentação (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013b).

Dentre os tratamentos químicos mais utilizados destaca-se o uso por fungicidas. Existe uma série que pertencem ao benzimidazol (tiabendazol e benomil), imidazol (Phrochloraz) e etileno, grupos ditiocarbamate (APDC). Outros fungicidas registrados são as dos strobilins grupo químico (azoxistrobina) e o composto benzonitrilo (Chlorothalonil). Exceto para o

benomil, a maioria dos fungicidas são registrados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. O Tiabendazol e benomil são dois dos fungicidas mais comuns aplicadas durante a pós-colheita de várias culturas e os fungos mais avaliados são os do gênero *colletotrichum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Alternaria alternata*, *R. stolonifer* e *B. theobromae* (EPA)(BAUTISTA-BAÑOS et al., 2013a).

Quanto aos tratamentos físicos, o revestimento de frutos são os mais utilizados, oriundos de compostos como proteínas, polissacarídeos, lipídios que podem ser empregados como material estruturante de biofilmes, como proteínas e por representar uma alternativa potencial na conservação dos frutos e associar a praticidade e o fator econômico (VARGAS et al., 2008).

2.2 Revestimentos de frutos

A maioria dos frutos ao serem colhidos apresenta uma aceleração no processo de maturação e deterioração de modo inevitável e irreversível, devido as mudanças bioquímicas e fisiológicas, bem como os métodos inadequados de manuseio e armazenamento (CHITARRA e CHITARRA, 2005; LUVIELMO; LAMAS, 2012). A tecnologia de aplicação de revestimentos comestíveis tem se destacado, principalmente pelo fato de elevar o tempo de conservação e permitir uma maior flexibilidade de manuseio e comercialização (VARGAS et al., 2008).

Estes revestimentos ou coberturas comestíveis promovem um preenchimento parcial dos estômatos e lenticelas dos frutos, gerando uma atmosfera modificada que reduz a produção de etileno e a perda da firmeza da polpa, consequentemente retardando o amadurecimento dos frutos (CHITARRA e CHITARRA, 2005; GORRIS; PEPPELENBOS, 1992; CHIUMARELLI; HUBINGER, 2012; GALUS; KADZIŃSKA, 2015), contribuindo, além disso, para a preservação do valor nutricional, reduzindo as trocas gasosas superficiais e a perda excessiva de peso. O revestimento dos frutos apresenta como uma das principais vantagens a substituição, pelo menos parcial, de embalagens de polímeros sintéticos, que por não serem biodegradáveis geram um grande impacto ambiental. Aproximadamente 40 milhões de toneladas de embalagens plásticas são usadas todos os anos e descartadas no meio ambiente (AZEREDO et al., 2010). Outra vantagem é que os equipamentos envolvidos na produção de revestimento são simples, o que estende o uso para pequenos produtores rurais.

Existe uma variedade de compostos que podem ser usados nas formulações desses revestimentos comestíveis, e os principais componentes são proteínas, polissacarídeos, e lipídios ou a combinação destes, que proporcionam a vantagem de utilizar as características distintas de cada classe e agregar propriedades desejadas aos revestimentos (VARGAS et al., 2008; CHIUMARELLI; HUBINGER, 2012; ASSIS; BRITTO, 2014; HAN, 2014).

Os lipídios comestíveis utilizados para desenvolver revestimentos filmogênicos são os mais empregados para frutos. Os mais utilizados são cera de abelha, cera de candelila e cera de carnaúba. Entretanto, a cera de carnaúba é a mais empregada pelas empresas de beneficiamentos de frutos por apresentar boa barreira de gases e as melhores propriedades de barreira à umidade (CHIUMARELLI; HUBINGER, 2012).

2.2.1 Cera de carnaúba

A cera de carnaúba é um lipídio obtido a partir da palmeira de carnauba, *Copernicia cerifera*, espécie nativa do nordeste brasileiro (PUTTALINGAMMA V, 2014). É composta de ésteres de cadeia linear (85% ésteres alquílicos de diversos tipos), álcoois, ácidos e hidrocarbonetos, sendo encontrada normalmente em pó amarelo-pálido ou flocos. Além disso, é solúvel em muitos solventes orgânicos polares. Apresenta aplicações nas áreas médica, de cosméticos, limpeza, alimentícia e automobilística (PINHEIRO, 2012; PUTTALINGAMMA V, 2014). Na área alimentícia, desde os anos 30, a cera de carnaúba vem apresentando aplicações comerciais de revestimentos protetores para frutos e hortaliças com o objetivo principal de diminuir a abrasividade durante o manuseio dos frutos (HAGENMAIER; BAKER, 1994).

Os revestimentos de cera de carnaúba passaram a ser conhecidos como uma medida eficiente para aumentar a vida útil e manter a qualidade pós-colheita de vários frutos, principalmente por apresentar como características baixa polaridade e hidrofobia, possibilitando assim retardar os processos metabólicos associados ao amadurecimento e melhorar a aparência dos frutos proporcionando-lhes um brilho superficial, deixando-os mais atrativos para o consumidor final (PEREIRA et al., 2006; FERNÁNDEZ-GUTIERREZ et al., 2010; LUVIELMO; LAMAS, 2012; MAHAJAN et al., 2014).

O revestimento de cera de carnaúba aplicado tanto de forma isolada bem como de forma combinada é bastante eficiente para diversos frutos. Vários estudos comprovaram que esse lipídio comestível atua significativamente na redução da transferência de umidade

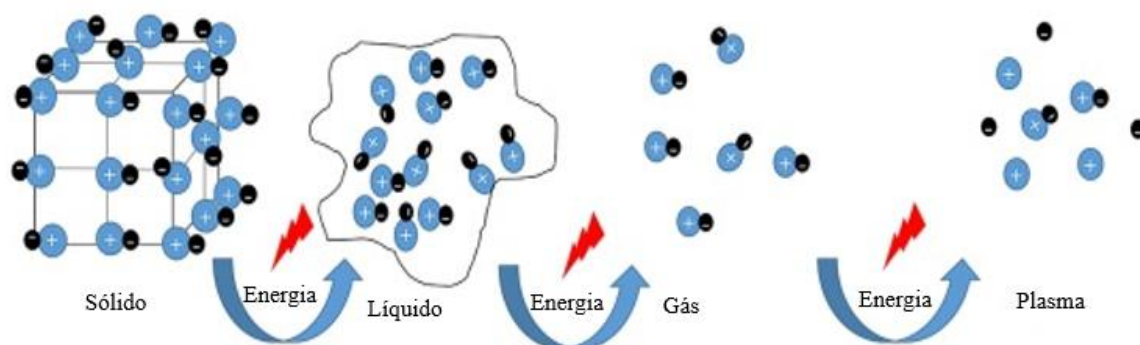
(transpiração) e nas trocas gasosas (respiração). Pode ser aplicada em produtos dos quais se consome a casca, devido ao fato de não ser tóxica, conferir brilho e reduzir a perda de umidade, além de ser facilmente removida com água, se necessário. Entretanto, este revestimento, quando aplicado sozinho, não apresenta características antifúngicas e, conseqüentemente, não controla as doenças que comumente se proliferam no armazenamento pós-colheita dos frutos. Em virtude disso, é comum utilizarem associados a este revestimento fungicidas químicos convencionais. No entanto, devido ao uso de grandes quantidades de fungicidas, da crescente preocupação sobre os riscos que podem causar a saúde humana, o dano ambiental, bem como a criação de patógenos fúngicos mais resistentes, devido ao seu uso prolongado, a utilização destes produtos vem se tornando restrita (PALOU et al., 2016). Como alternativa, pode-se utilizar a aplicação de plasma frio à pressão atmosférica que se destaca pelo seu enorme potencial de utilização na preservação de alimentos, pelo seu alto potencial antimicrobiano e por não apresentar efeitos colaterais.

2.3 Plasma

O plasma foi primeiro observado por William Crookes em 1879 e Irving Langmuir e Tonks, em 1929, que fizeram a primeira tentativa de introduzir o termo de plasma na física (LIAO et al., 2017). Este é considerado o quarto estado da matéria e consiste em um gás parcialmente ou totalmente ionizado (LOEB, 1960).

O aumento do nível de energia na matéria, causa uma transição do estado sólido para o líquido e posteriormente para o estado gasoso. Se mais energia for fornecida nesta fase gasosa, os átomos/moléculas constituintes começam a colidir violentamente e ocorre a quebra das moléculas do gás, resultando na formação de espécies carregadas e neutras, e liberação de radiação em comprimentos de onda variáveis conforme ilustra a Figura 4. Esta mistura de espécies e radiação caracteriza o plasma (D'AGOSTINO et al., 2005; LIAO et al., 2017).

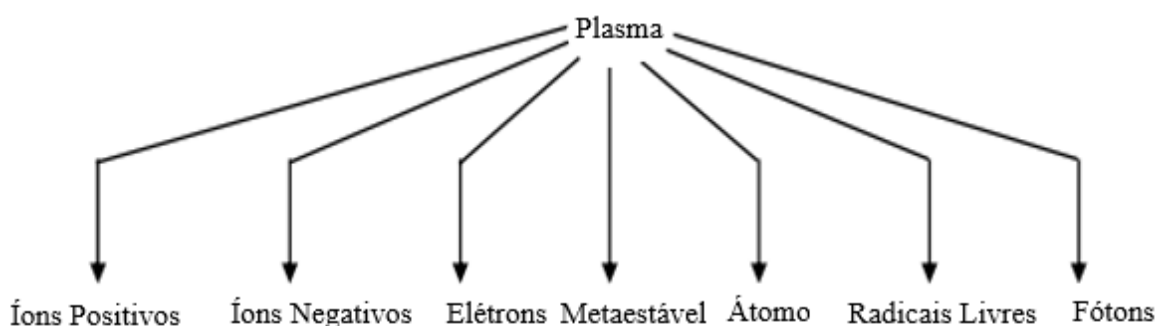
Figura 4- Diagrama esquemático de quatro estados da matéria



Fonte: (LIAO et al., 2017)

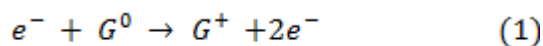
O plasma é constituído de átomos, moléculas, íons, elétrons, radiação ultravioleta e calor, sendo na média eletricamente neutro (Figura 5) (ALVES JR, 2001). Este compõe 99% da matéria do universo sensível conhecido, sendo 1% referente aos outros estados da agregação da matéria (sólido, líquido e gasoso). Alguns exemplos de plasma natural que estão presentes no nosso universo são relâmpagos, o interior das estrelas e a aurora boreal (D'AGOSTINO et al., 2005).

Figura 5- Constituintes do Plasma



Fonte: (NEHRA et al., 2008)

A geração do plasma consiste na utilização de dois eletrodos e um gás neutro submetido a uma diferença de potencial que gera um campo elétrico e acelera os elétrons e os íons (elétrons livres). Estes colidem com partículas neutras transferindo energia, em paralelo, e devido ao campo elétrico mais elétrons e íons são liberados e colidem com outras partículas proporcionando a ionização do gás. A equação 1 abaixo explica esse processo.



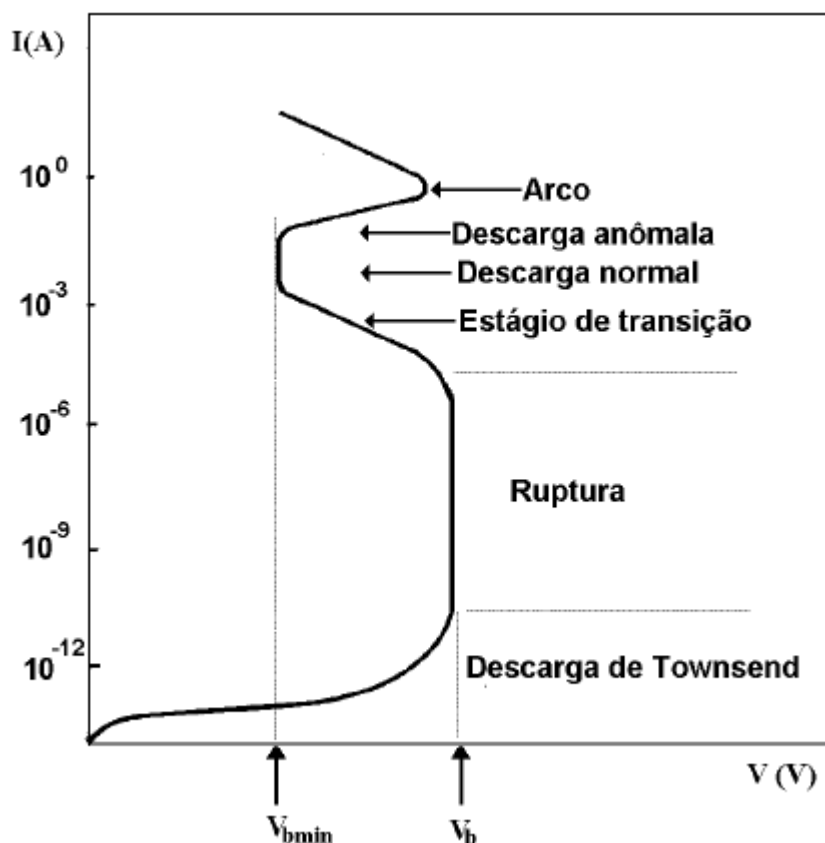
Onde G^0 é o átomo ou molécula do gás no estado fundamental;

G^{+} representa um íon deste gás;

e^{-} representa o elétron.

Para este processo de ionização do gás, uma relação de corrente elétrica e diferença de potencial entre os eletrodos é dado pela curva da Figura 6.

Figura 6- Curva característica da voltagem X corrente entre dois eletrodos, numa descarga elétrica em gases



Fonte: (ALVES JR, 2001)

Podem ser vistas três regiões distintas nesta curva: a primeira região corresponde a descarga de Townsend, uma zona onde a corrente auto sustentada aumenta sem um aumento significativo na tensão elétrica, gerando o plasma ao momento que o gás se torna brilhante. A segunda região é chamada de descarga luminosa (ou luminescente). Essa região envolve a descarga luminosa normal, que é apresentada com uma pequena diferença de potencial, comparada com a necessária para geração do plasma; e a descarga luminosa ab-normal ou anômala, corresponde a um grande aumento da tensão com a corrente favorecendo uma maior densidade de corrente e eficiência quando utilizadas para aplicações de deposição de plasma. Por fim, a última região corresponde ao arco elétrico observado para valores altos de corrente elétrica e baixos de tensão, próximos ao potencial de ionização dos gases (ALVES JR, 2001).

O plasma pode ser classificado com base na sua temperatura, sendo de baixa temperatura (LTP- *Low Temperature Plasma*) ou de alta temperatura (HTP- *High*

Temperature Plasma) como mostrado na Tabela 1. O plasma de baixa temperatura é ainda dividido em plasma térmico e não térmico (NEHRA et al., 2008; RUTSCHER, 2008)

Tabela 1- Classificação do plasma baseado na Temperatura

Plasma de Baixa Temperatura (LTP)		Plasma de alta temperatura (HTP)
LTP Térmico	LTP Não térmico	
$T_g \approx T_i \approx T_e \lesssim 2 * 10^4 \text{ K}$	$T_g \approx T_i \approx 300 \text{ K} ;$ $T_i \ll T_e \lesssim 10^5 \text{ K}$	$T_i \approx T_e > 10^7 \text{ K}$

Fonte: (RUTSCHER, 2008)

Onde: T_g = Temperatura das moléculas de gás;

T_i = Temperatura dos íons;

T_e = Temperatura dos elétrons.

O LTP não térmico é conhecido como Plasma Frio de Pressão Atmosférica (CAPP - *Cold Atmospheric Pressure Plasma*). Por apresentar baixa temperatura no sistema ($\leq 10^5 \text{ K}$) as partículas carregadas e neutras não colidem frequentemente como acontece com o LTP térmico e o HTP. Deste modo, o LTP não térmico resulta em uma ionização parcial do gás.

Plasmas de alta temperatura e térmicos não são adequados para uso em alimentos sensíveis ao calor, porque a transferência de calor do plasma para o alimento causa deterioração na qualidade dos mesmos (KEENER, 2011). Deste modo, o CAPP é relatado como altamente vantajoso para a descontaminação microbiana de produtos alimentares, incluindo organismos esporulantes e patogênicos devido as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pelo plasma (CHIZOBA EKEZIE et al., 2017). Além disso, é caracterizado como prático e barato por não necessitar de um sistema a vácuo (LU et al., 2014). No entanto, por ser uma tecnologia recente, ainda não foi totalmente explorada pela indústria de alimentos.

O CAPP pode ser gerado de várias maneiras, mas os três métodos de geração mais comuns que são relatados como efetivos contra contaminantes biológicos são através de descarga de barreira dielétrica (DBD), jato de plasma à pressão atmosférica e descarga de corona. Entretanto, O CAPP gerado através do DBD apresenta algumas vantagens em relação

aos demais, principalmente a possibilidade de ser utilizado em quase todas as combinações de gases, desde gases nobres, ar, ou vapor de água, até adições especiais de precursores. Destaca-se ainda a flexibilidade, devido adaptabilidade da geração do plasma por diferentes geometrias dos eletrodos (EHLBECK et al., 2011; CHIZOBA EKEZIE et al., 2017).

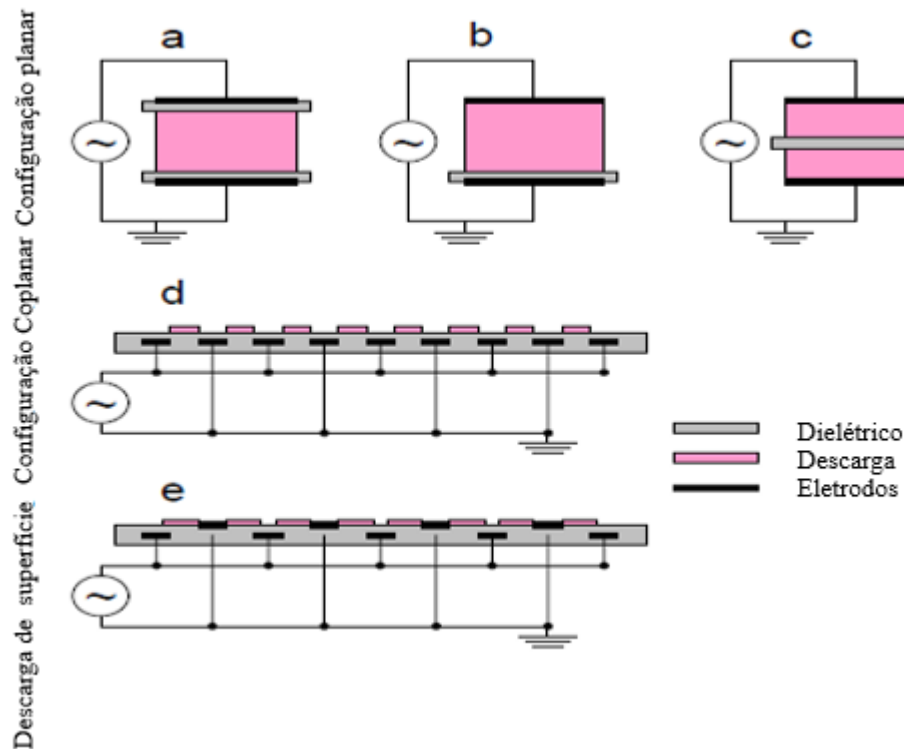
2.3.1 Plasma DBD

As descargas da barreira dielétrica (DBD) ou apenas descargas de barreira são conhecidas há mais de um século (KOGELSCHATZ, 2003). As primeiras investigações experimentais foram focadas para a geração de ozônio que foram obtidas através de um fluxo de Ar/Oxigênio sob controle de uma descarga de barreira dielétrica por um campo elétrico alternado com amplitude satisfatória (SIEMENS, 1857). Por esta razão, a descarga da barreira dielétrica também é referida como "descarga ozonizante"(KOGELSCHATZ, 2003).

Esta descarga é um plasma frio de não equilíbrio a pressão atmosférica que é gerado por uma corrente alternada, emitida a partir de uma diferença de potencial aplicada entre dois eletrodos, onde uma camada dielétrica é inserida entre eles. Os materiais dielétricos comuns incluem vidro, quartzo, cerâmica e polímeros (CHIZOBA EKEZIE et al., 2017). Quando a voltagem é aplicada entre os eletrodos, cargas elétricas acumulam-se na superfície do dielétrico até romper a rigidez dielétrica do gás e provocar microdescargas (FERNÁNDEZ-GUTIERREZ et al., 2010; BHADE, 2016). As microdescargas são de curta duração e são governadas por processos de ionização e excitações atômicas e moleculares (BÁRDOS; BARÁNKOVÁ, 2010). Os dielétricos limitam a quantidade de carga e a energia transmitida a uma microdescarga individual, distribuindo as microdescargas ao longo de toda a área do eletrodo (KOGELSCHATZ, 2003).

Este plasma DBD pode ser operado em uma ampla gama de configurações geométricas. Dependendo da aplicação, é possível usar configurações planares, coplanares ou superficiais. A Figura 7 aborda as configurações típicas de DBD.

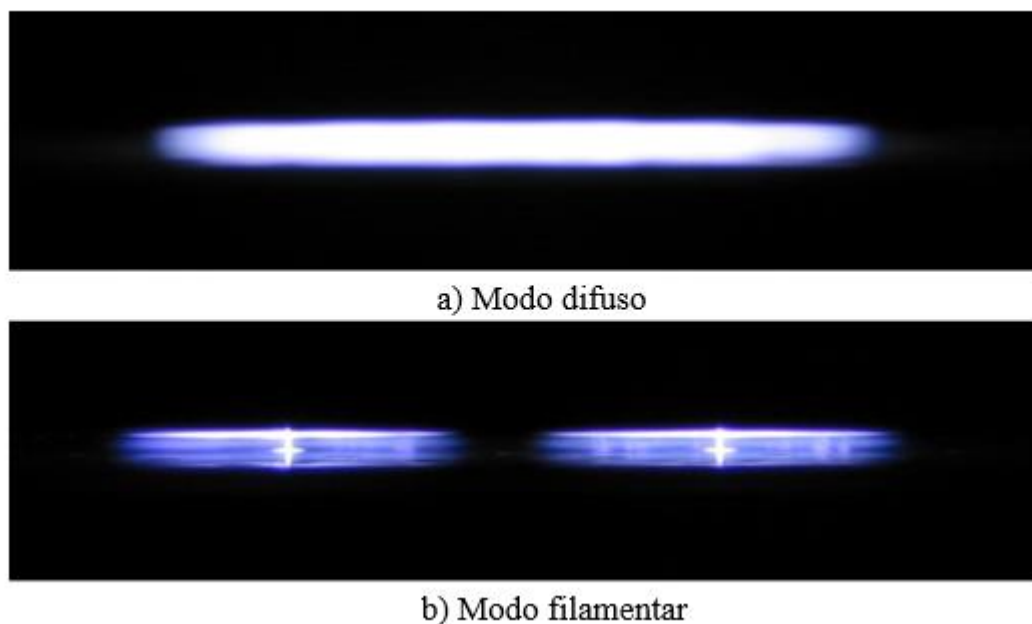
Figura 7- Configurações básicas de DBD a) plano com eletrodos de dielétrico, b) plano com um único eletrodo coberto com dielétrico, c) plano com dielétrico no espaço de descarga d) configuração coplanar onde ambos os eletrodos são incorporados dentro do dielétrico e) configuração para geração de descarga superficial com um eletrodo incorporado em dielétrico



Fonte: (EHLBECK et al., 2011)

Além disso, as descargas de barreira dielétrica podem operar em regime filamentar e regime difuso (ZHANG et al., 2016). O regime filamentar ocorre no momento em que ocorre tensão de ruptura e as microdescargas geradas se acumulam na superfície do dielétrico de forma não uniforme. Se a diferença de potencial for aumentada, serão geradas mais microdescargas que se acumularam em toda a superfície do dielétrico, caracterizando uma descarga em regime difuso, que é homogênea, uniforme e luminescente (ZHANG et al., 2016). Estes regimes são apresentados na Figura 8.

Figura 8- Os tipos de regime DBD a) modo difuso b) modo filamentar



Fonte: (FRIDMAN, 2007)

A tecnologia DBD recebeu grande atenção nos últimos anos e tem sido utilizada em uma variedade de aplicações, incluindo biologia, medicina e segurança alimentar. Na indústria alimentícia mostrou grande potencial para inativação de microrganismos desde células bacterianas, esporos e leveduras, modificação de componentes alimentares, embalagem para alimento e germinação de sementes (LI et al., 2017).

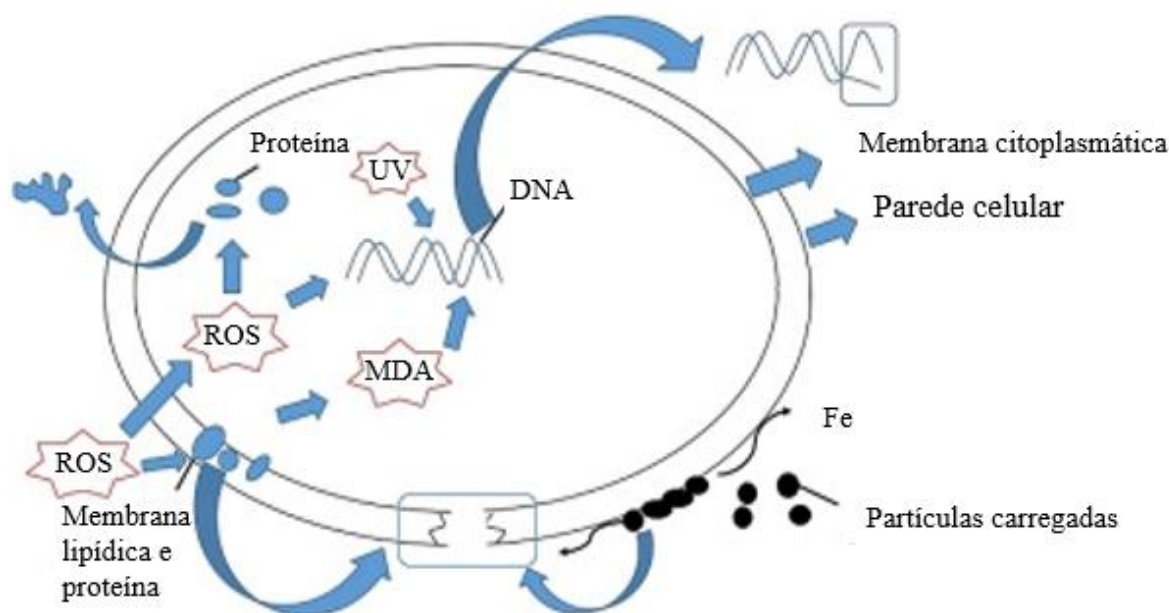
2.3.2 Aplicação do plasma na inativação de microrganismos

A tecnologia do plasma tem sido aplicada atualmente na inativação de microrganismos. Tal tecnologia depende muito das condições operacionais, como potência de entrada (tensão e frequência), tempo de tratamento, tipo de gás, taxa de fluxo e modo de exposição. Estudos mostram que com uma maior potência de entrada é possível obter uma maior efetividade de inativação por plasma, possivelmente, devido a produção de uma maior densidade de energia de entrada. No entanto, os mecanismos de inativação de microrganismos por plasma ainda não são totalmente conhecidos devido à sua natureza complexa e dinâmica, mas estudos relatam que os mecanismos podem ser divididos em aspectos biológicos e físicos. E os principais mecanismos propostos para esse processo de inativação são através da interrupção eletrostática e oxidação de constituintes celulares (LIAO et al., 2017).

Na interrupção eletrostática, as espécies carregadas geradas pelo plasma acumulam-se na membrana celular e produzem forças eletrostáticas que excedem a força de tração da

membrana celular levando à ruptura das mesmas, seguindo de morte celular (LUNOV et al., 2015). Já a oxidação de constituintes celulares ocorre quando as espécies reativas como oxigênio, nitrogênio, superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxílicos (OH), ozônio (O_3), óxido nítrico (NO), interagem com macromoléculas celulares, como lipídios, proteínas e DNA, comprometendo sua funcionalidade e levando à morte celular. As espécies oxidativas reativas interagem com os lipídios, considerados os mais vulneráveis devido à localização próxima a superfície celular e a sensibilidade a espécies reativas de oxigênio (ROS). Na membrana celular inicia-se um processo chamado de peroxidação lipídica que compromete a integridade estrutural da membrana, prejudicando o DNA e as proteínas de forma irreversível e consequentemente levando à lise celular (LIAO et al., 2017). A Figura 9 ilustra esses mecanismos de inativação.

Figura 9- Mecanismos de inativação microbiana



Fonte: (LIAO et al., 2017)

Além destes principais mecanismos, existe ainda o fenômeno de eletroporação que consiste na formação de poros a partir de pulso de campo elétrico de alta tensão desestabilizando a bicamada lipídica e as proteínas das membranas celulares e provocando assim a morte celular (SALE; HAMILTON, 1967; ZIMMERMANN et al., 1974; LIAO et al., 2017).

O plasma é destaque como uma técnica altamente inovadora e desafiadora em várias aplicações. Além da inativação de microrganismos, estudos relatam que o plasma não térmico

(NTP) mostram ter grande potencial no aceleração do processo de oxidação lipídica e pode ser orientado como uma alta correlação com o processo de oxidação à temperatura ambiente nas pesquisas para a qualidade dos alimentos.

2.3.3 Oxidação lipídica por plasma

A oxidação lipídica ocorre através de um mecanismo complexo bem conhecido que é referido como auto-oxidação. Durante este mecanismo de auto-oxidação, os hidroperóxidos são formados como produtos de oxidação primária. A degradação destes hidroperóxidos conduz à formação de uma grande variedade de compostos de baixo peso molecular, tais como alcanos, alcenos, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, epóxidos e ácidos carboxílicos (HELMKE et al., 2009).

Os mecanismos de oxidação lipídica por processamento de plasma não são totalmente estabelecidos e entender as interações do plasma com os lipídios e os parâmetros críticos que governam a oxidação lipídica são necessários (HELMKE et al., 2009)

Segundo HELMKE et al., 2009 a presença das espécies reativas de oxigênio (oxigênio singlete, oxigênio atômico) geradas pelo plasma não térmico acelera o mecanismo de oxidação lipídica, levando à formação de compostos que também foram encontrados nas amostras oxidadas pelo mecanismo de auto-oxidação.

SARANGAPANI et al., 2017 em seus estudos relatou que a oxidação dos lipídios pelo plasma frio apresentou produtos de oxidação típicos identificados que incluíram ozonetos, aldeídos (hexanal, pentenal, nãoanal e não-real) e ácidos carboxílicos (ácido 9-oxononanóico, ácido octanóico, ácido nonanoico), juntamente com hidroperóxidos (9 - e 13-hidroperoxi-octadecadianoilglicerol) Além disso, observaram a parti da técnica Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) que com aumento do tempo de tratamento de plasma e a tensão aplicada ampliam a banda de carbonilo, o que sugere a formação de novos compostos de carbonilo. Isto é atribuído à produção de aldeídos saturados, ácidos carboxílicos ou outros produtos secundários de oxidação e enfatizaram que vários autores também relataram a formação de compostos carbônicos como subprodutos do tratamento com plasma.

Estes grupos carboxílicos apresentam características antimicrobianas e sua toxicidade está amplamente relacionada ao dano na membrana dos microrganismos (JARBOE et al., 2013). A permeabilidade dos grupos carboxílicos na membrana celular tem sido apresentado

como um dos principais mecanismos de inibição microbiana (RICKE, 2003; DESBOIS; SMITH, 2010).

Logo, a aplicação do plasma em revestimentos lipídicos (por exemplo, cera de carnaúba) pode favorecer uma oxidação lipídica com a formação de grupos carboxílicos que torne estes revestimentos com características antimicrobianas.

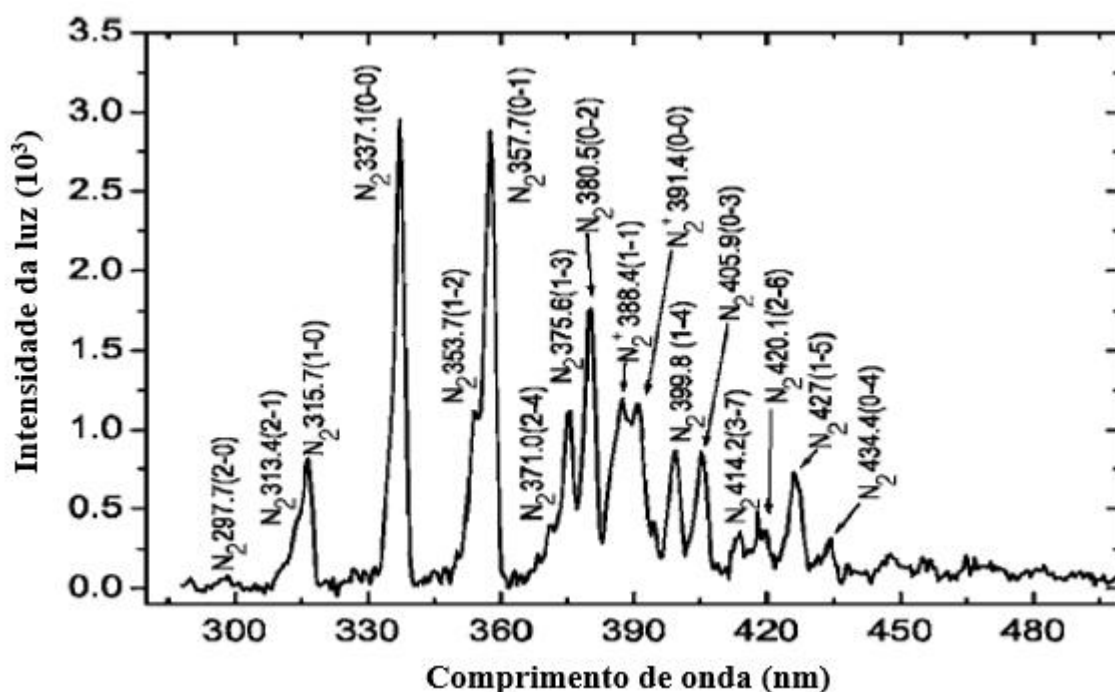
São as espécies produzidas pelo plasma, como oxigênio, ozônio, nitrogênio, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e óxido nítrico que favorece tanto a inativação de microrganismos quanto a oxidação lipídica com formação de grupos carboxílicos. E estas podem ser identificadas através da técnica de caracterização de espectroscopia de emissão ótica (OES).

2.4 Espectroscopia de emissão ótica (OES)

A espectroscopia de emissão ótica (OES- *Optical Emission Spectroscopy*) é uma técnica utilizada para identificar espécies atômicas, moleculares e íons formados pelo plasma e analisar sua intensidade luminosa.

As espécies geradas pelos diferentes tipos de plasma apresentam espectros característicos para cada espécie presente. Deste modo, os espectros óticos típicos do plasma frio atmosférico DBD é composto de alguns picos correspondentes a molécula de N_2 e se concentram mais na faixa de 300 nm a 420 nm. A Figura 10 apresenta um espectro característico do Plasma DBD atmosférico.

Figura 10- Espectro de emissão ótica característico do plasma DBD.



Fonte: (QIU et al., 2007)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Protocolo experimental

Figura 11- Desenho do protocolo utilizado para o experimento I

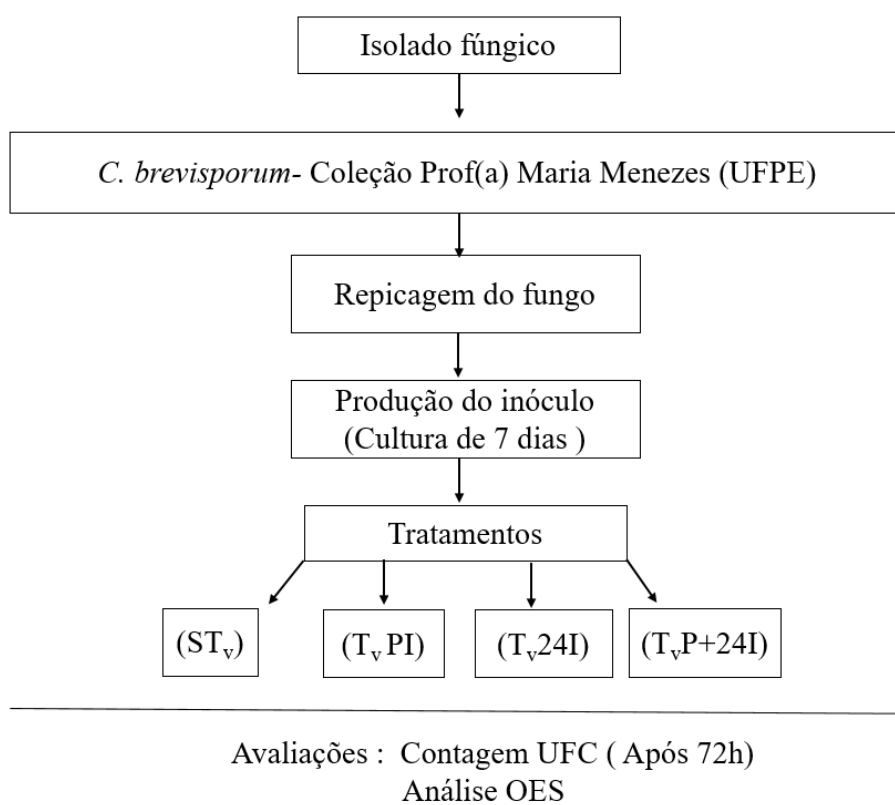
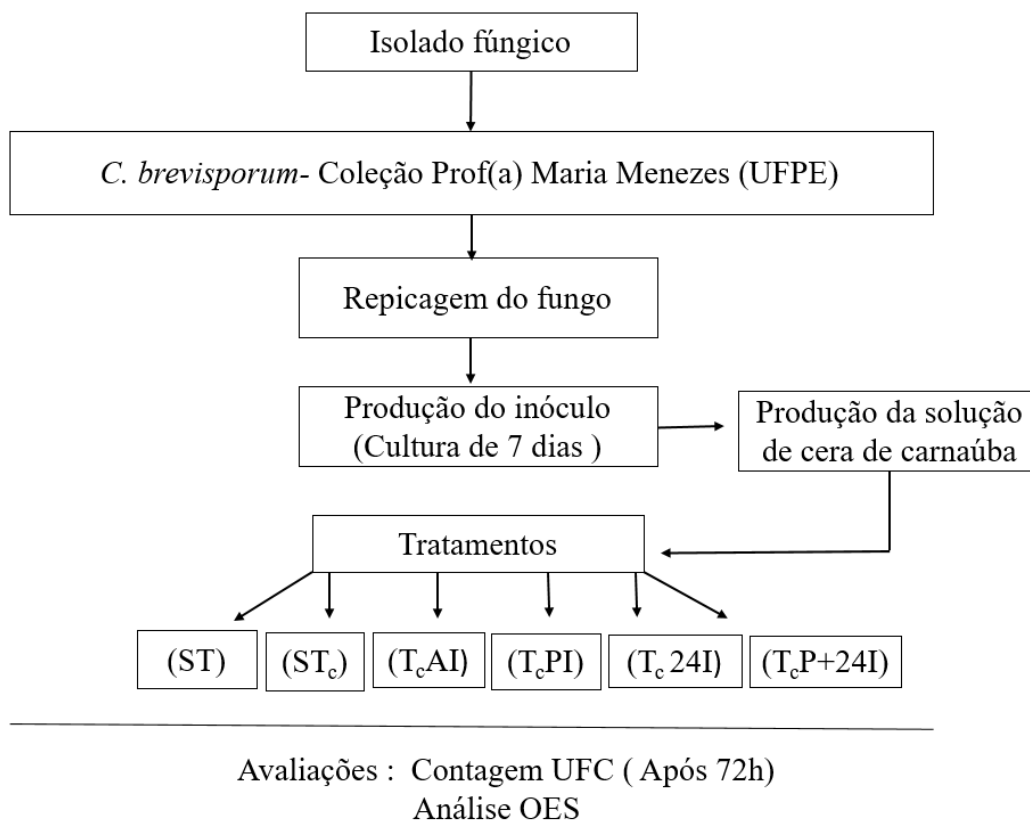


Figura 12- Desenho do protocolo experimental utilizado para o experimento II



Fonte: Autoria Própria

Este trabalho foi dividido em duas etapas: experimento 1 e 2. Para o experimento 1, o isolado fúngico *C. brevisporum* foi repicado para a produção dos inóculos que foi realizado após 7 dias de crescimento da colônia fúngica, as quais foram posteriormente submetidos aos tratamentos:

- Sem tratamento (ST_v- BDA);
- Tratamento após inoculação da suspensão de esporos (T_vPI);
- Tratamento 24 horas após inoculado a suspensão de esporos (T_v24I);
- Tratamento após e 24 horas da inoculação da suspensão de esporos (T_vP+24I).

Em seguida, as placas foram analisadas quanto a presença e quantidade de UFC (após 72 horas) e as espécies geradas pelo plasma foram identificadas pela análise da técnica de OES.

O experimento 2 ocorreu de forma semelhante, porém com adição da solução de cera de carnaúba que continham em todos os tratamentos misturados ao meio de cultura BDA, com exceção da testemunha absoluta (Sem tratamento) que se trata de um controle negativo sem a presença do revestimento de cera. Os tratamentos foram os seguintes:

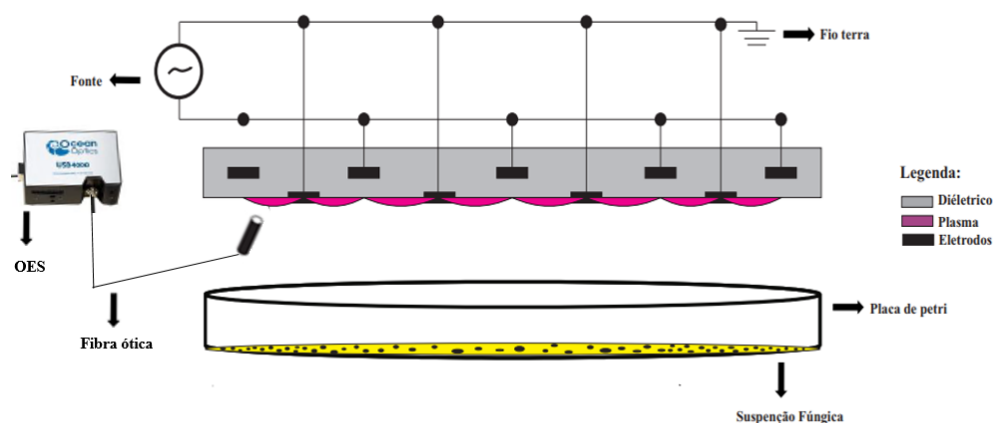
- Sem tratamento (ST- BDA SEM CERA)
- Sem tratamento (ST_C – BDA COM CERA);
- Tratamento antes de inocular a suspensão de esporos (T_CAI);
- Tratamento após inoculado a suspensão de esporos (T_CPI);
- Tratamento 24 horas após inoculado a suspensão de esporos (T_C24I);
- Tratamento após e 24 horas depois de inoculado a suspensão de esporos (T_C P+24I).

3.2 Aparato experimental

O aparato experimental apresentado neste trabalho para geração do plasma foi o sistema DBD. A configuração utilizada foi do tipo descarga de superfície com eletrodos incorporados no material dielétrico conforme ilustrado na Figura 13. Um dos eletrodos é conectado a uma fonte e o outro é conectado ao fio terra. O material dielétrico utilizado foi o fenolite e os eletrodos pelo material condutor cobre.

Para os experimentos 1 e 2 as placas com a suspensão de conídios foram submetidos aos tratamentos ST_V, T_VPI, T_V24I, T_VP+24I, ST, ST_C, T_CAI, T_CPI, T_C24I e T_C P+24I. A placas foram colocadas sob o aparato e submetidos a uma tensão de 45 kV a pico a pico e frequência 405 Hz por 9 minutos.

Figura 13- Aparato experimental



Fonte: Autoria própria

3.3 Isolado e produção do inóculo

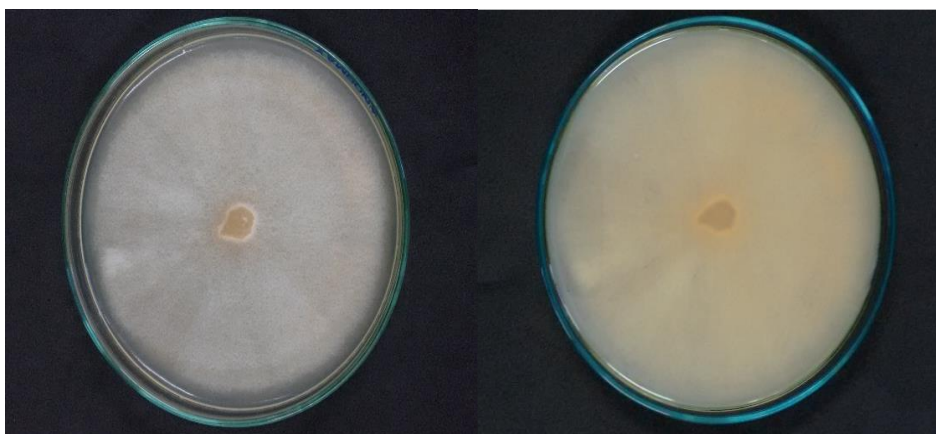
O isolado de *C. brevisporum* (1672) foi obtido da coleção de culturas da Prof^a Maria Menezes da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, localizado na cidade de Recife - PE.

Para produção do inóculo, discos miceliais foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA). As placas foram mantidas em incubadora BOD a 27 °C por 7 dias para o crescimento da colônia fúngica (Figura 14). As suspensões de conídios foram preparadas com 10 ml de água destilada estéril que foi adicionada a placa de Petri, e posterior raspagem do meio para liberação de esporos (Figura 15).

A suspensão resultante foi diluída em água autoclavada, sendo a mesma ajustada para a concentração de 4×10^4 conídios $\times$ ml⁻¹, mediante a utilização de uma câmara de Neubauer.

As Figuras 13 e 14 apresentam o crescimento fúngico do *colletotrichum brevisporum* após 7 dias de modo anverso e inverso e as imagens dos conídios visualizadas a partir de um microscópio óptico com 400X, respectivamente.

Figura 14- Crescimento fúngico do *colletotrichum brevisporum*. Ver lado anverso (esquerda) e (direita) reverso



Fonte: Autoria Própria

Figura 15- Conídios do *colletotrichum brevisporum*



Fonte: Autoria Própria

O plaqueamento foi feito a partir de uma alíquota 100 microlitros da suspensão de esporos feita anteriormente. Em seguida, com um auxílio de uma alça de drigalski as suspensões foram depositadas uniformemente sob as placas de Petri contendo o meio de cultura BDA. Todos foram tratados por plasma por um tempo de nove minutos conforme

estudo de DIÓGENES (2017). Depois de 72 horas as unidades formadoras de colônias (UFC) foram quantificadas em um contador de colônias (CP 600 PLUS PHOENIX) com auxílio de um contador manual.

3.4 Preparação do revestimento de cera de carnaúba

Para a produção do revestimento de cera de carnaúba foram utilizados cera de carnaúba tipo 1 produzida pela empresa ORTAL, óleo de canola saponificado disponibilizado pelo laboratório de Processos Químicos (LPQ) da UFERSA e água destilada.

Foram utilizadas concentrações de 10% de cera de carnaúba e 5 % do óleo em relação a massa de cera de carnaúba. Estes produtos foram misturados em 10 ml de água destilada e agitados em um agitador com aquecimento LUKADEMA até solubilização completa da cera no meio aquoso. Posteriormente, a solução foi misturada em 250 ml de meio de cultura BDA, que foi utilizado apenas para os tratamentos do segundo experimento.

3.5 Análise de Espectroscopia de emissão ótica (OES)

A técnica OES foi utilizada para analisar a intensidade luminosa do plasma. As medições foram feitas em um espectrômetro de modelo USB4000 UV-VIS (Ocean Optics) com auxílios do software *SpectraSuite*. Para obtenção do espectro, a fibra ótica do equipamento foi colocado próximo do plasma gerado pela configuração DBD.

3.6 Análise estatística

Aos tratamentos foi aplicado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) a 5% de probabilidade. Cada tratamento constou de cinco repetições representada cada uma por uma placa de Petri. Os dados obtidos foram comparados pelo teste de Tukey com o auxílio do programa estatístico SISVAR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os conídios de *Colletotrichum brevisporum* foram tratados com plasma DBD por 9 minutos, com tensão de 45 kV e frequência de 405 Hz nos dois experimentos para observar tanto a ação do plasma na inativação deste fungo quanto analisar se a presença de um revestimento de cera de carnaúba influenciaria sua ação.

No primeiro experimento, após os conídios serem tratados por plasma, os tratamentos T_VPI e T_VP+24I apresentaram inativação completa do crescimento das colônias *C. brevisporum*, diferente do tratamento T_V24I que não apresentou redução e diferença significativa comparada com o sem tratamento ST_V (Tabela 2).

Tabela 2-Unidade formadora de colônias por mL (UFC/ml) do *C. brevisporum* após tratamentos com Plasma

Tratamentos	Unidade Formadora de colônias 10 ³ (UFC/ml)
ST _V	141,4 ± 20,9 a
T _V PI	0 ± 0,0 b
T _V 24I	139,4 ± 10,1 a
T _V P+24I	0 ± 0,0 b

Todos os dados são expressos como média ± desvio-padrão. Média seguidas de mesma letra na coluna, não diferem significativamente (P <0,05).

Fonte: Autoria própria

A destruição celular por plasma ocorre se os níveis de exposição excedem a capacidade dos sistemas de defesa celular, afetando as macromoléculas dentro da célula, incluindo DNA, proteínas e lipídios (SOHBATZADEH et al., 2016). No entanto, tal destruição depende da maneira na qual o plasma frio é gerado, que pode ser através de jatos, corona e DBD, e parâmetros tensão, frequência, tipo de gás e tempo de exposição utilizados.

Possivelmente, os esporos *C. brevisporum* após os tratamentos T_VPI e T_VP+24I, tiveram sua estrutura celular comprometida como verificado por BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., (2013) que estudaram o efeito do plasma frio sobre a inativação da bactéria *Escherichia coli*, e observaram um alto grau de eletroporação, perda e ruptura da membrana e deformação

dos microrganismo. Entretanto, os resultados deste trabalho quanto a inativação/redução do *C. brevisporum*, foi ainda mais promissor já que foi obtido uma inativação de 100% após tratamento imediato com plasma.

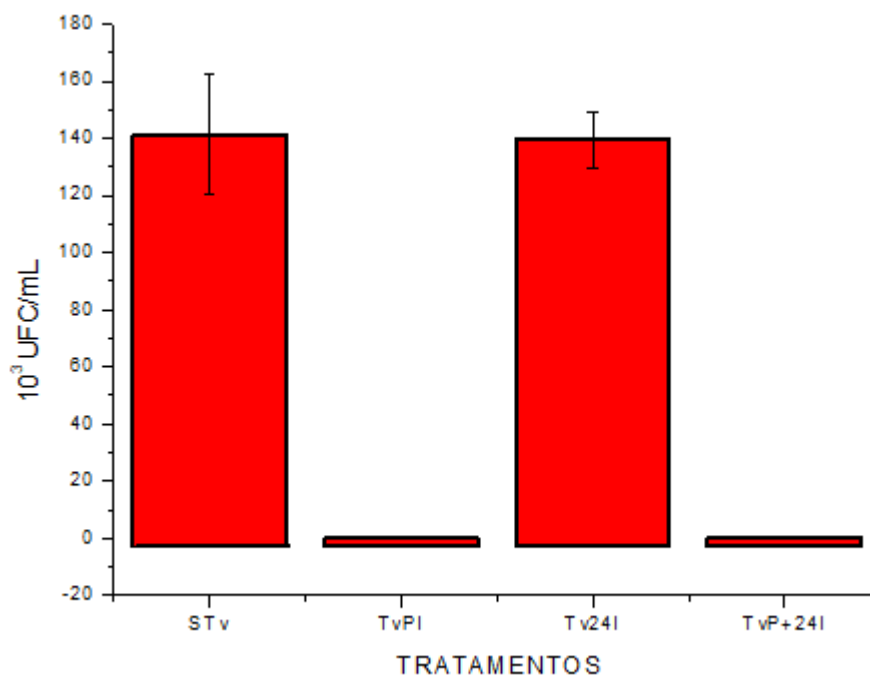
SOHBATZADEH *et al.*, (2016) realizaram estudos com o microrganismo *Aspergillus flavus* e observaram uma redução no crescimento após tratadas com plasma e relataram que as espécies geradas pelo plasma como oxigênio (O), nitrogênio (N₂), óxido nítrico (NO) e Hidroxila (OH), todos identificados nos espectros da região UV, colidem com a superfície da amostra e danificam as paredes fúngicas que foram observadas através da técnica Microscopia Eletrônica de Varredura -MEV. DEVI *et al.*, (2017) avaliaram o crescimento fúngico das espécies *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus* tratadas pelo plasma frio e obtiveram 97,9% e 99,3% de redução no crescimento destes fungos e mostraram que também as espécies reativas geradas pelo plasma favoreciam a desintegração completa da membrana celular dos esporos.

Por outro lado, no presente estudo o tratamento Tv24I não apresentou redução e não diferiu estatisticamente do sem tratamento (STv) como pode ser visualizado no Gráfico 1. É provável que os esporos tratados 24 horas depois de inoculado na placa de petri tenham criado uma maior estabilidade ao meio em que se encontravam e os níveis de exposição de plasma não excederam o sistema de defesa celular deste microrganismo, deixando claro que o plasma apresenta ação direta na superfície de aplicação, não apresentando efeito quando as colônias já estão em fase de crescimento avançado com múltiplas camadas.

O tratamento TvP+24I, como já relatado, apresentou inativação completa, entretanto vale ressaltar que este tratamento equivale a duas aplicações de plasma: sendo a primeira aplicada imediatamente após inoculado a suspensão fúngica na placa de petri e a segunda depois de 24 horas de inoculação. Este tratamento foi realizado com o objetivo de avaliar se haveria redução e/ou inativação com apenas uma aplicação ou duas aplicações. Logo, o resultado foi bastante satisfatório, pois se o tratamento TvPI inibiu totalmente o crescimento do microrganismo e este apresentava apenas uma aplicação de plasma, o tratamento TvP+24I consequentemente seria eficiente já que uma de suas aplicações foi igual ao tratamento TvPI.

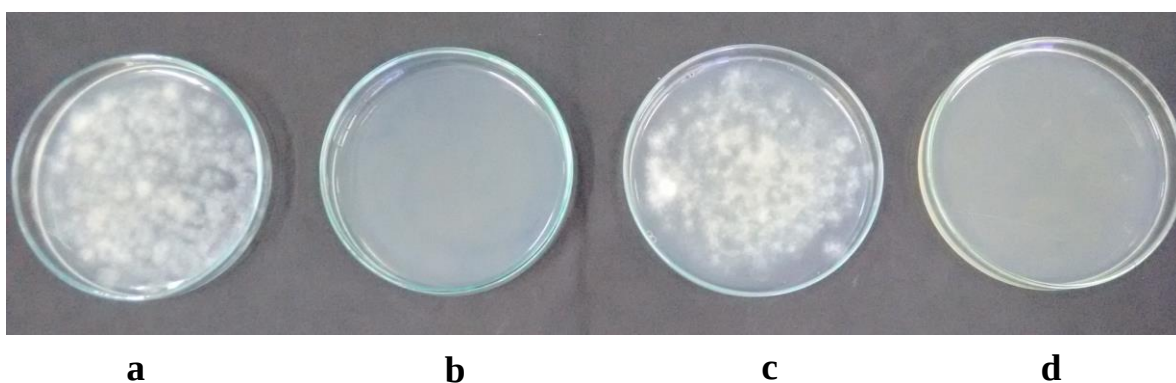
A Figura 16 apresenta imagens das placas comprovando que os tratamentos TvPI e TvP+24I foram os mais eficientes por apresentarem inativação completa do microrganismo *Colletotrichum brevisporum*.

Gráfico 1- Tratamentos x UFC



Fonte: Autoria própria

Figura 13- Crescimento das unidades formadoras de colônias (UFC) após tratamento com plasma. a) ST_v, b) TvPI, c) Tv24I e d) TvP+24I



Fonte: Autoria própria

No segundo experimento os tratamentos T_CAI e T_CPI e T_CP+24I apresentaram inativação completa do crescimento das colônias *C. brevisporum*. Os valores das unidades de colônias após os tratamentos são apresentados na Tabela 3. O tratamento T_C24I não apresentou resultado satisfatório e quando comparado com o sem tratamento sem cera (ST) e o sem tratamento com cera (ST_C) não apresentou diferença significativa, como pode ser visualizado no Gráfico 2.

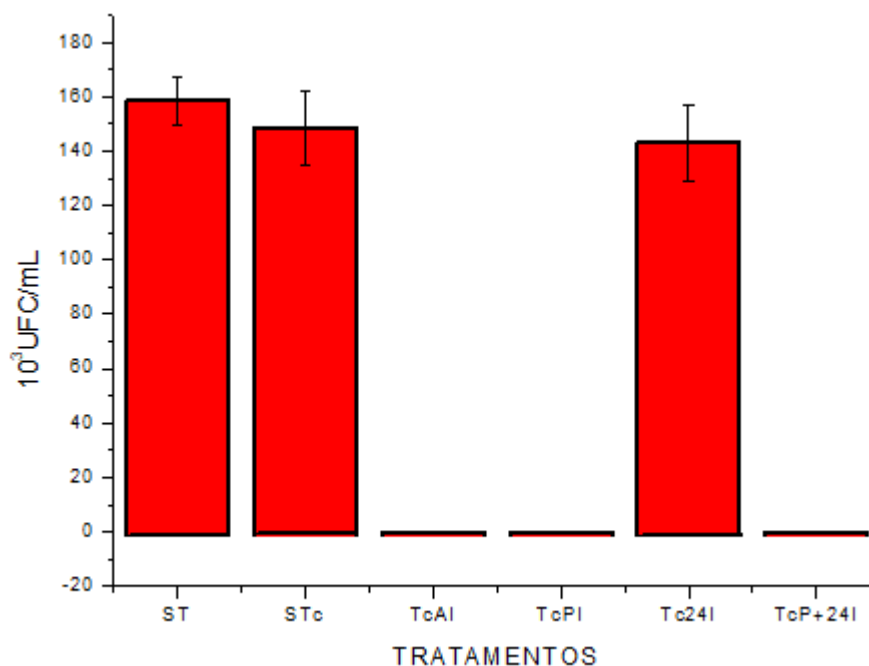
Tabela 3- Unidade formadora de colônias por mL (UFC/ml) do *C. brevisporum* contendo revestimento de cera de carnaúba após tratamentos com Plasma

Tratamentos	Unidade Formadora de colônias 10^3 (UFC/ml)
ST	158,40 $\pm$ 8,82 a
ST _C	148,4 $\pm$ 13,4 a
T _C AI	0 $\pm$ 0,0 b
T _C PI	0 $\pm$ 0,0 b
T _C 24I	143,2 $\pm$ 13,9 a
T _C P+24I	0 $\pm$ 0,0 a

Todos os dados são expressos como média $\pm$ desvios-padrão. Os valores de significados com as diferentes letras em uma linha diferente diferem significativamente (P <0,05).

Fonte: Autoria própria

Gráfico 2- Tratamentos x UFC (contendo revestimento de cera de Carnaúba)



Fonte: Autoria própria

A presença do revestimento da cera de carnaúba no meio de cultura BDA após tratadas com plasma não influenciou a ação do plasma mais possibilitou um resultado promissor por permitir a utilização conjunta de ambas técnicas que tende a melhorar a vida útil dos frutos. A inativação completa do microorganismo *C. brevisporum* foi obtida quando o plasma foi aplicado imediatamente após inoculados (T_CPI) e o plasma aplicado imediatamente e 24 horas após inoculados (T_CP+24I) e a justificativa quanto a esta inibição das colônias foi a anteriormente discutida no primeiro experimento.

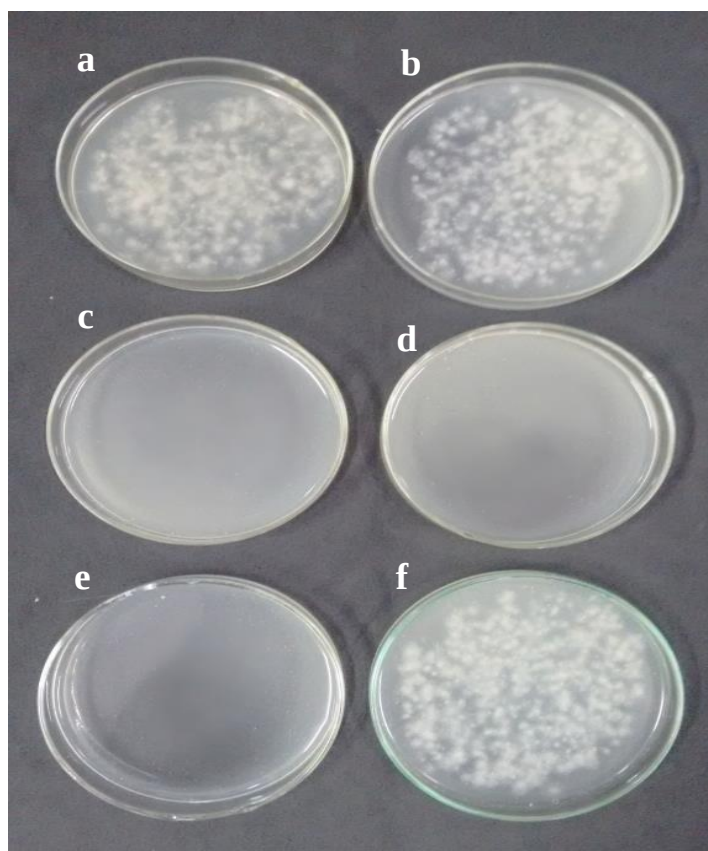
O tratamento T_CAI (contendo meio de cultura BDA com solução de cera de carnaúba antes de inocular a suspensão fúngica) foi equivalente ao tratamento T_CPI e o resultado obtido foi bastante promissor, apesar da ação do plasma não ter sido direta sobre os esporos do *C. brevisporum*. A inativação completa dos esporos nesse tratamento pode ter sido ocasionada provavelmente pela interação das espécies quimicamente reativas do plasma com a cera de carnaúba. Pode-se ter formado grupos funcionais na estrutura da cera de carnaúba, que favoreceu, por exemplo, a oxidação lipídica e consequentemente a formação de grupos carboxílicos (HELMKE et al., 2009; VANDAMME et al., 2016; SARANGAPANI et al., 2017). Estes apresentam características antimicrobianas e possivelmente foi o responsável pela inativação do *C. brevisporum* neste tratamento.

JARBOE et al., 2013 relatou em seus estudos que os ácidos carboxílicos saturados e de cadeia linear, como os ácidos hexanoico, octanoico, decanoico e laurico podem ter sobre *E. coli* e *S. cerevisiae*, destacando que os principais efeitos incluem danos à membrana celular e diminuição do pH interno microbiano tornando inibitórios. E BEEK *et al.*, 2010 também mostrou que grupos carboxílicos apresentam atividade antimicrobiana.

Entretanto, estudos ainda devem ser realizados para investigar sobre esta interação cera e plasma, já que pode oferecer um primeiro passo para tornar o revestimento de cera carnaúba com características antimicrobianas.

A Figura 17 apresenta as imagens das placas após tratadas, ressaltando que os tratamentos T_CAI, T_CPI e T_CP+24I apresentaram inibição completa quanto ao crescimento das colônias do *C. brevisporum*.

Figura 14- Crescimento das unidades formadoras de colônias (UFC) com revestimento de cera de carnaúba após tratamento com plasma a) ST, b) ST_c, c) T_CAI, d) T_CPI e) T_CP+24I f) T_C24I

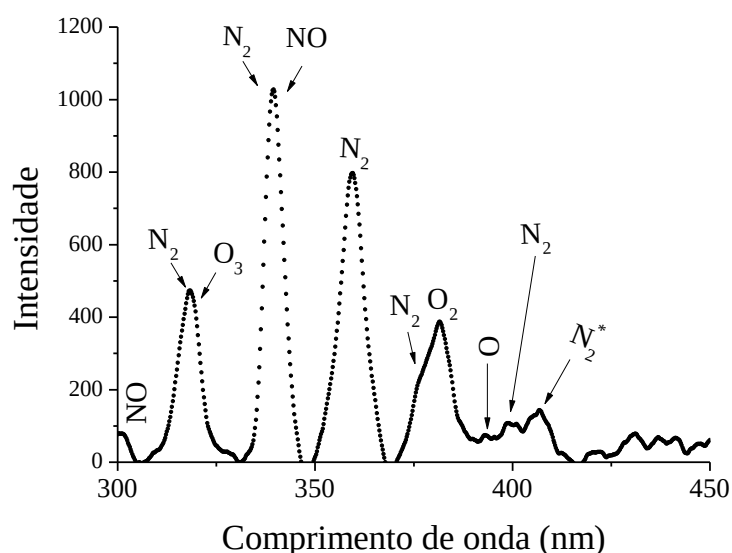


Fonte: Autoria própria

4.1 Caracterização óptica

A caracterização óptica foi realizada para analisar as espécies ativas do plasma gerado a partir do sistema DBD. No gráfico 16 é mostrado o espectro luminoso obtido por OES para o sistema DBD com uma tensão de 45 kV pico a pico e uma frequência 405 Hz.

Gráfico 3- OES para o sistema DBD



Fonte: Autoria própria

Na análise de OES, foram observados vários picos incluindo NO (301 e 339), O₃ (319), N₂ (360 e 405 nm), O₂ (381 nm) e O (395 nm), todos na região do UV. Estas espécies identificadas segundo MOREAU et al., 2008 e BUTSCHER et al., (2016) são conhecidas em oxidar membranas celulares, moléculas de proteínas e DNA caracterizando como letal para os microrganismos.

O resultado obtido quanto a caracterização espectral do plasma foi semelhante ao estudo de PARK e HWANG, 2013 que avaliou o desempenho antibacteriano através de uma descarga de barreira dielétrica. Os picos obtidos foram NO (301 e 339 nm), OH (317 e 320 nm), O₃ (319 nm), N₂O + (356 nm), N₂ (354, 360, 371, 400, 434 nm), NO₂ (378 nm), O₂ (381 nm), O (395 e 533 nm), H₂ (407 nm) e N₂ + (428 nm) caracterizando os espectros das espécies presentes.

De acordo com este resultado, podemos confirmar os espectros característicos das espécies presentes do sistema DBD desta pesquisa e conforme a literatura, os responsáveis pela ruptura da membrana celular, proteínas e DNA do fungo *Colletotrichum brevisporum*.

5 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos desta pesquisa experimental *in vitro* foi possível verificar que o plasma frio a pressão atmosférica por descarga de barreira dielétrica (DBD) apresenta

eficiência quanto a inativação do *Colletotrichum brevisporum* quando realizada em uma aplicação única, pós-inoculação (T_vPI) ou em dupla aplicação (T_vP+24I).

Quando associado ao revestimento lipídico permaneceu a eliminação de 100% do microrganismo *C. brevisporum* quando aplicação foi única (T_cPI) e em dupla aplicação (T_cP+24I) e paralelamente a aplicação do plasma foi efetiva quando realizada antes da inoculação (T_cAI) o que abre possibilidades para o desenvolvimento de novos materiais que aumente a vida útil dos frutos.

Logo, conclui-se a parti deste experimento *in vitro*, que a associação destes dois métodos em frutos poderá apresentar resultados satisfatórios e que a técnica plasma DBD é promissora no tratamento pós-colheita de frutos, em substituição aos fungicidas tradicionais.

6 REFERÊNCIAS

ABAYASEKARA, C. L.; ADIKARAM, N. K. B.; WANIGASEKARA, U. W. N. P.; BANDARA, B. M. R. Phyllosticta musarum infection-induced defences suppress anthracnose disease caused by Colletotrichum musae in banana fruits cv “Embul.” **Plant Pathology Journal**, v. 29, n. 1, p. 77–86, 2013.

ALMEIDA, C. **Diversidade de espécies de Colletotrichum causadoras de antracnose em chuchuzeiro**, 2015.

ALVES JR, C. **Nitretação a plasma: Fundamentos e Aplicações**. 2001.

AROLKAR, G. A.; SALGO, M. J.; KELKAR-MANE, V.; DESHMUKH, R. R. The study of air-plasma treatment on corn starch/poly(??-caprolactone) films. **Polymer Degradation and Stability**, v. 120, p. 262–272, 2015.

ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. Revisão : coberturas comestíveis protetoras em frutas : fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 87–97, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjft/v17n2/a01v17n2.pdf>>. .

AZEREDO, H. M. C.; BRITTO, D. DE; ASSIS, O. B. G. Chitosan edible films and coatings – a review. **Chitosan: Manufacture, Properties, and Usage**, p. 179–194, 2010.

BÁRDOS, L.; BARÁNKOVÁ, H. Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 23, p. 6705–6713, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2010.07.044>>. .

BAUTISTA-BAÑOS, S.; SIVAKUMAR, D.; BELLO-PÉREZ, A.; VILLANUEVA-ARCE, R.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. **Crop Protection**, v. 49, n. April, p. 8–20, 2013a.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; SIVAKUMAR, D.; BELLO-PÉREZ, A.; VILLANUEVA-ARCE, R.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. **Crop Protection**, v. 49, p. 8–20, 2013b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219413000471>>.

Acesso em: 7/6/2017.

BEEK, A. TER; BRUL, S. To kill or not to kill Bacilli: Opportunities for food biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 168–174, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.014>>. .

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; WEMLINGER, E.; PEDROW, P.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.; GARCIA-PEREZ, M. Effect of atmospheric pressure cold plasma (APCP) on the inactivation of *Escherichia coli* in fresh produce. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 149–157, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.022>>. .

BEZERRA, J. P.; FERREIRA, P. V; BARBOSA, L. DA F.; et al. First Report of Anthracnose on Chayote Fruits (*Sechium edule*) Caused by *Colletotrichum brevisporum*. **Plant Disease**, , n. September, p. 1–4, 2015.

BHIDE, S. **EFFECT OF SURFACE ROUGHNESS IN MODEL AND FREH FRUIT SYSTEMS ON MICROBIAL INACTIVATION EFFICACY OF COLD ATMOSPHERIC PRESSURE PLASMA**, 2016.

BUTSCHER, D.; LOON, H. VAN; WASKOW, A.; RUDOLF VON ROHR, P.; SCHUPPLER, M. Plasma inactivation of microorganisms on sprout seeds in a dielectric barrier discharge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 222–232, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.006>>. .

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* - current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181–213, 2012. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3114/sim0014>>. .

CHIUMARELLI, M.; HUBINGER, M. D. Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch - Carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 1, p. 59–67, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.006>>. .

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. D. **Pós-colhieta de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2 ed. Lavras: UFLA: 2005. 785 p

CHIZOBA EKEZIE, F.-G.; SUN, D.-W.; CHENG, J.-H. A review on recent advances in cold

plasma technology for the food industry: Current applications and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 46–58, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224417304582>>. .

D'AGOSTINO, R.; FAVIA, P.; OEHR, C.; WERTHEIMER, M. R. Low-temperature plasma processing of materials: Past, present, and future. **Plasma Processes and Polymers**, v. 2, n. 1, p. 7–15, 2005.

DEAN, R.; KAN, J. A. L. VAN; PRETORIUS, Z. A.; et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.

DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1629–1642, 2010.

DEVI, Y.; THIRUMDAS, R.; SARANGAPANI, C.; DESHMUKH, R. R.; ANNAPURE, U. S. Influence of cold plasma on fungal growth and aflatoxins production on groundnuts. **Food Control**, v. 77, p. 187–191, 2017.

DIÓGENES, F. E. P. EMPREGO DO PLASMA DE DESCARGA POR BARREIRA DIELÉTRICA (DBD) NA INATIVAÇÃO DE FUNGOS E NA SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA EM SEMENTES DE *Erythrina velutina* Willd. Tese, 2017.

EHLBECK, J.; SCHNABEL, U.; POLAK, M.; et al. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 44, n. 1, p. 13002, 2011. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/0022-3727/44/i=1/a=013002?key=crossref.0390e970db31e45f99a7ac0921a7d924>>. .

FERNÁNDEZ-GUTIERREZ, S. A.; PEDROW, P. D.; PITTS, M. J.; POWERS, J. Cold atmospheric-pressure plasmas applied to active packaging of apples. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 38, n. 4 PART 4, p. 957–965, 2010.

FERREIRA, A. R. V.; TORRES, C. A. V.; FREITAS, F.; et al. Development and characterization of bilayer films of FucoPol and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 8–15, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861716303423>>. Acesso em: 19/4/2016.

FRIDMAN. Pulsed RF discharges, glow and filamentary mode at atmospheric pressure in

argon. **Plasma Sources Science and Technology**, v. 16, n. 2, p. 217–225, 2007.

GALUS, S.; KADZIŃSKA, J. Food applications of emulsion-based edible films and coatings. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 273–283, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415001788>>. .

GORRIS, L.; PEPPELENBOS, H. Modified atmosphere and vacuum packaging to extend the shelf life of respiring food products. **HortTechnology**, v. 2, n. 3, p. 303–309, 1992. Disponível em: <<http://horttech.ashspublications.org/content/2/3/303.short>>. .

HAGENMAIER, R. D.; BAKER, R. A. **Internal gases, ethanol content and gloss of citrus fruit coated with polyethylene wax, carnauba wax, shellac or resin at different application levels** *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 1994.

HAN, J. H. **Edible Films and Coatings**. Elsevier Ltd, 2014.

HELMKE, A.; HOFFMEISTER, D.; MERTENS, N.; et al. The acidification of lipid film surfaces by non-thermal DBD at atmospheric pressure in air. **New Journal of Physics**, v. 11, 2009.

HOWARD, C. M.; MAAS, J. L.; CHANDLER, C. K.; AFBREGTS, E. E. Anthracnose of Strawberry Caused by the Colletotrichum Complex in Florida. **Plant Diseases**, , n. 10, 1992.

JARBOE, L. R.; ROYCE, L. A.; LIU, P. Understanding biocatalyst inhibition by carboxylic acids. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. SEP, p. 1–8, 2013.

KEENER, K. Atmospheric Plasma Technology in the Meat Industry. **Food Safety Magazine**. 2011. Disponível em: <<http://www.foodsafetymagazine.com/magazinearchive1/augustseptember-2011/atmospheric-plasma-technology-in-the-meat-industry/>>. Acesso em 17 de maio de 2016.

KOGELSCHATZ, U. Dielectric-barrier Discharges : Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications. **Plasma Chemistry and Plasma Processing**, v. 23, n. 1, p. 1–46,

2003. Disponível em: <file:///C:/Users/jordi/Dropbox/Publications_Volatilomes/LTP/DBD physics/2003_PCPP_Kogelschatz_dbd_review.pdf>. .

LI, J.; XIANG, Q.; LIU, X.; et al. Inactivation of soybean trypsin inhibitor by dielectric-barrier discharge (DBD) plasma. **Food Chemistry**, v. 232, p. 515–522, 2017.

LIAO, X.; LIU, D.; XIANG, Q.; et al. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. **Food Control**, v. 75, p. 83–91, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.021>>. .

LIMA, N. B.; MARQUES, M. W.; MICHEREFF, S. J.; et al. First Report of Mango Anthracnose Caused by *Colletotrichum karstii* in Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 9, p. 1248–1248, 2013. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84881504941&partnerID=tZOtx3y1>>. .

LIU, F.; TANG, G.; ZHENG, X.; et al. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32761, 2016. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep32761>>. .

LU, Q.; LIU, D.; SONG, Y.; ZHOU, R.; NIU, J. Inactivation of the tomato pathogen *cladosporium fulvum* by an atmospheric-pressure cold plasma jet. **Plasma Processes and Polymers**, v. 11, n. 11, p. 1028–1036, 2014.

LUIZA, M.; VIEIRA, G.; DOTTO, G. L.; ANTONIO, L.; PINTO, D. A. Uso de quitosana com diferentes massas moleculares como filmes microbiológicos no recobrimento de mamões-papaia 1. , , n. 1995, 2009.

LUNOV, O.; CHURPITA, O.; ZABLOTSKII, V.; et al. Non-thermal plasma kills bacteria: Scanning electron microscopy observations. **Applied Physics Letters**, v. 106, n. 5, 2015.

LUVIELMO, M. DE M.; LAMAS, S. V. Revestimentos comestíveis em frutas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 1, p. 8–15, 2012. Disponível em: <http://revistas.unisinos.br/index.php/estudos_tecnologicos/article/view/ete.2012.81.02>. .

MADANI, B.; MIRSHEKARI, A.; YAHIA, E. Effect of calcium chloride treatments on calcium content, anthracnose severity and antioxidant activity in papaya fruit during ambient

storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, , n. May, 2015.

MAHAJAN, P. V; CALEB, O. J.; SINGH, Z.; WATKINS, C. B.; GEYER, M. Postharvest treatments of fresh produce. **Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**, v. 372, n. 2017, p. 20130309, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4006172&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

MATTHES, R.; KOBAN, I.; BENDER, C.; et al. Antimicrobial efficacy of an atmospheric pressure plasma jet against biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. **Plasma Processes and Polymers**, v. 10, n. 2, p. 161–166, 2013.

MISRA, N. N.; KEENER, K. M.; BOURKE, P.; MOSNIER, J. P.; CULLEN, P. J. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 2, p. 177–182, 2014.

MOREAU, M.; ORANGE, N.; FEUILLOLEY, M. G. J. Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p. 610–617, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975008000852>>. .

NASCIMENTO, I. O. **Construção de um aparato experimental para monitoramento in situ da deposição de filmes finos de titânio por magnetron sputtering**, 2011.

NEHRA, V.; KUMAR, A.; DWIVEDI, H. K. Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources. **International Journal of Engineering**, v. 2, n. 1, p. 53–68, 2008.

NOIREUNG, P.; PHOULIVONG, S.; LIU, F.; et al. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 33, n. 3, p. 347–362, 2012. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84874883753&partnerID=40&md5=513128f64af35778da1a1a716c7cd971>>. .

OH, Y. A.; ROH, S. H.; MIN, S. C. Cold plasma treatments for improvement of the applicability of defatted soybean meal-based edible film in food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 150–159, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.022>>. .

PALOU, L.; ALI, A.; FALLIK, E.; ROMANAZZI, G. GRAS, plant- and animal-derived

compounds as alternatives to conventional fungicides for the control of postharvest diseases of fresh horticultural produce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 122, n. 2015, p. 41–52, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.017>>. .

PANKAJ, S. K.; BUENO-FERRER, C.; MISRA, N. N.; et al. Characterization of dielectric barrier discharge atmospheric air cold plasma treated gelatin films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 6, p. 61–67, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289415300132>>. .

PARK, C. W.; HWANG, J. Susceptibility constants of airborne bacteria to dielectric barrier discharge for antibacterial performance evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 244–245, p. 421–428, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.12.006>>. .

PAUL, N. C.; LEE, H. B.; LEE, J. H.; et al. Endophytic fungi from *Lycium chinense* mill and characterization of two new korean records of *Colletotrichum*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 15272–15286, 2014.

PEREIRA, M. E. C.; SILVA, A. S. DA; BISPO, A. S. DA R.; et al. Amadurecimento de mamão formosa com revestimento comestível à base de fécula de mandioca. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1116–1119, 2006. Editora UFPA. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542006000600011&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 29/4/2016.

PINHEIRO, N. M. D. S. REVESTIMENTOS COM CERA DE CARNAÚBA INCORPORADOS DE ANTIMICROBIANOS EM CAJU (*ANACARDIUM OCCIDENTALE* L) E GOIABA (*PSIDIUM GUAJAVA*) Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa , como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Te. , 2012.

PUTTALINGAMMA V. Edible Coatings of Carnauba Wax —A Novel Method For Preservation and Extending Longevity of Fruits and Vegetables-A Review. **Internet Journal of Food Safety**, v. 16, p. 1–5, 2014.

QIU, X.; MELLINGER, A.; WIRGES, W.; GERHARD, R. Spectroscopic study of dielectric barrier discharges in cellular polypropylene ferroelectrets. **Applied Physics Letters**, v. 91, n. 13, p. 2005–2008, 2007.

RETRIEVED, P. S. ADVANCES IN CONTROL OF POST -HARVEST DISEASES OF PAPAYA FRUIT-A REVIEW. , , n. January 2012, 2016.

RICKE, S. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 632–639, 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ps/article-lookup/doi/10.1093/ps/82.4.632>>. .

RUTSCHER, A. Characteristics of low-temperature plasmas under nonthermal conditions—a short summary. **Low temperature plasmas: Fundamentals, Technologies and Techniques**, p. 1–14, 2008. Disponível em: <http://bilder.buecher.de/zusatz/22/22923/22923655 lese_1.pdf>. .

SALE, A.; HAMILTON, W. Effects of high electric fields on microorganismsI. Killing of bacteria and yeasts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 148, n. 3, p. 781–788, 1967. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304416567900529>>. .

SARANGAPANI, C.; RYAN KEOGH, D.; DUNNE, J.; BOURKE, P.; CULLEN, P. J. Characterisation of cold plasma treated beef and dairy lipids using spectroscopic and chromatographic methods. **Food Chemistry**, v. 235, p. 324–333, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.016>>. .

SAUCEDO-POMPA, S.; JASSO-CANTU, D.; VENTURA-SOBREVILLA, J.; et al. Effect of Candelilla wax With Natural Antioxidants on the Shelf Life Quality of Fresh-Cut Fruits. **Journal of Food Quality**, v. 30, n. 2007, p. 823–836, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4557.2007.00165.x/pdf>>. .

SCHNABEL, U.; NIQUET, R.; SCHLÜTER, O.; GNIFFKE, H.; EHLBECK, J. Decontamination and Sensory Properties of Microbiologically Contaminated Fresh Fruits and Vegetables by Microwave Plasma Processed Air (PPA). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 653–662, 2015.

SHARMA, V. Evaluation of Incidence and Alternative Management of Post Harvest Fungal Diseases of Papaya Fruits (*Carica papaya* L .) in Western U . P . **International Journal of Theoretical & Applied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 6–12, 2015.

SIEMENS, W. Ueber die elektrostatische Induction und die Verzögerung des Stroms in Flaschendrahten. **Poggendorfs Ann. Phys. Chem.**, v. 102, p. 66–122, 1857.

SINGH, S. P.; SUDHAKAR RAO, D. V. **Papaya (Carica papaya L.)**. Woodhead Publishing Limited, 2011.

SOARES-COLLETTI, A. R.; LOURENÇO, S. DE A. Effect of temperature, wetness duration and cultivar on the development of anthracnose in guava fruits. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 4, p. 307–312, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052014000400001&lng=en&tlng=en>. .

SOHBATZADEH, F.; MIRZANEJHAD, S.; SHOKRI, H.; NIKPOUR, M. Inactivation of *Aspergillus flavus* spores in a sealed package by cold plasma streamers. **Journal of Theoretical and Applied Physics**, v. 10, n. 2, p. 99–106, 2016. Springer Berlin Heidelberg.

VANDAMME, J.; NIKIFOROV, A.; ROOSE, M. DE; et al. Controlled accelerated oxidation of oleic acid using a DBD plasma: Determination of volatile oxidation compounds. **Food Research International**, v. 79, p. 54–63, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.028>>. .

VARGAS, M.; PASTOR, C.; CHIRALT, A.; MCCLEMENTS, D. J.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Recent Advances in Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 6, p. 496–511, 2008. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390701537344>>. .

VERMA, C.; KUMAR, A.; TIWARI, M.; MISHRA, S. Review Article Biochemical and Molecular Characterization of Cell Wall Degrading Enzyme , Pectin Methylesterase Versus Banana Ripening : An Overview. **Asian J. Biotechnol**, v. 9, p. 1–23, 2016.

VIANA, F. M. P.; UCHÔA, C. N.; VIEIRA, I. G. .; et al. Processamento mínimo , atmosfera modificada , produtos químicos e resfriamento no controle da podridão basal pós-colheita em frutos do coqueiro anão verde. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 4, p. 326–331, 2008.

YUSAF, T.; AL-JUBOORI, R. A. Alternative methods of microorganism disruption for agricultural applications. **Applied Energy**, v. 114, p. 909–923, 2014.

ZERPA-CATANHO, D.; ESQUIVEL, P.; MORA-NEWCOMER, E.; et al. Transcription analysis of softening-related genes during postharvest of papaya fruit (*Carica papaya* L. “Pococi” hybrid). **Postharvest Biology and Technology**, v. 125, p. 42–51, 2017. Elsevier

B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.11.002>>. .

ZHANG, Y.; LI, J.; JIANG, N.; et al. Optical characteristics of the filamentary and diffuse modes in surface dielectric barrier discharge. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 168, p. 230–234, 2016.

ZIMMERMANN, U.; PILWAT, G.; RIEMANN, F. Dielectric breakdown of cell membranes. **Biophys J.**, v. 14, n. 11, p. 881–99., 1974.