



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

LÁZARO JOSÉ ALVES DE LIMA

VIABILIDADE DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO NA INATIVAÇÃO DA
Alternaria sp.

MOSSORÓ - RN

2018

LÁZARO JOSÉ ALVES DE LIMA

VIABILIDADE DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO NA INATIVAÇÃO DA
Alternaria sp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, PPGCEM, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Linha de Pesquisa: Processamento de materiais por plasma.

Orientador: Prof. Dr. Clodomiro Alves Junior.

MOSSORÓ - RN

2018

LÁZARO JOSÉ ALVES DE LIMA

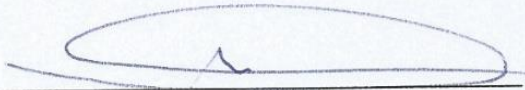
VIABILIDADE DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO NA INATIVAÇÃO DA
Alternaria sp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, PPGCEM, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

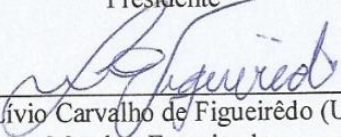
Linha de Pesquisa: Processamento de materiais por plasma.

Defendida em: 14 / 05 / 2018.

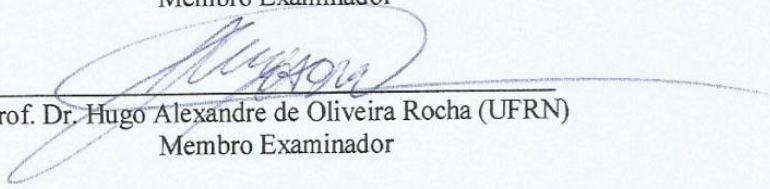
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Clodomiro Alves Junior (UFERSA)
Presidente



Prof. Dr. Lívio Carvalho de Figueirêdo (UFERSA)
Membro Examinador



Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha (UFRN)
Membro Examinador

© 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.

Lv LIMA, LÁZARO.

VIABILIDADE DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO NA
INATIVAÇÃO DA *Alternaria* sp. / LÁZARO LIMA. -
2018.

55 f. : il.

Orientador: CLODOMIRO ALVES JUNIOR.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação
em Ciência e Engenharia de Materiais, 2018.

1. descarga elétrica. 2. antifúngico. 3.
antimicrobiano. 4. , dicloro. 5. fungicida. I.
ALVES JUNIOR, CLODOMIRO, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me proporcionado a oportunidade de desenvolver o presente estudo, sempre com muita motivação e empenho.

À minha família, que sempre me deu força para continuar na luta diária, vencendo todas as adversidades. Ao meu pai, Francisco Alves de Lima, incentivador nato e motivador, à minha mãe, Maria Valtair da Conceição Alves de Lima, também incentivadora e amorosa, sempre com sábias palavras. À minha irmã Maria Thereza Alves de Lima, estudante de engenharia química e apoiadora da carreira e da pesquisa, irmã fantástica, exemplar. Ao meu irmão Thomás Gustavo Alves de Lima (*in memoriam*) que sempre acreditou no meu potencial, por isso dedico cada vitória da minha vida a ele. Minha especial esposa, Maria Carla da Silva Campêlo, companheira de experimento e de vida, com incentivos, apoio e força sempre rumo aos objetivos.

Ao meu orientador, Professor Dr. Clodomiro Alves Junior, que me apoiou, motivou e ajudou, jamais medindo esforços, em busca do êxito no trabalho e na vida. Orientações que irão além do mestrado, serão para toda a vida.

Aos amigos do labplasma, Maurício, Isabely, Edvaldo, Matheus e Danilo, pessoas que tive o prazer de conviver e ter boas conversas científicas.

Agradeço a UFERSA, por proporcionar a estrutura e recursos necessários à pesquisa.

A todos agradeço, que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho, embora não citados (já que são muitos), jamais serão esquecidos.

Honestamente, obrigado!

RESUMO

Nesse estudo, tratamentos com tempos distintos, entre 1 e 15 minutos, foram utilizados para inativar esporos de *Alternaria* sp. isolado do mamão Formosa, já que esse microrganismo é causa comum e frequente de prejuízos econômicos para empresas exportadoras no Brasil. Uma suspensão fúngica foi tratada a plasma frio atmosférico de corrente contínua. Foi produzida uma descarga elétrica com pulsos de tensão de 10 kV e 20 kV, repetidos a uma frequência de 15,5 kHz, aplicadas dentro de um tubo de ensaio contendo a suspensão de esporos de *Alternaria* sp. (5×10^3 conídios.mL⁻¹). A eficiência do tratamento a plasma foi comparada com a eficiência de um sanitizante (dicloro isocianurato de sódio 400 ppm) e de um fungicida (quaternário de amônio, 1000 ppm). A suspensão de esporos de *Alternaria* sp. foi analisada quanto ao seu pH e potencial de oxirredução (REDOX). Foi observada redução do pH e elevação do potencial redox proporcional ao tempo de tratamento e à demanda energética do plasma. A espectroscopia de emissão óptica (OES) foi empregada para identificar e monitorar as espécies presentes no sistema plasma-líquido. Verificou-se que o plasma foi mais eficiente do que o fungicida e comparável ao sanitizante. Tempos de aplicação de 3 min (20 kV) e 9 min (10 kV) foram suficientes para completa inativação dos fungos. Os resultados indicam que tratamentos a plasma possuem eficiência contra esporos fúngicos e que esta fonte de energia é promissora na ciência dos alimentos.

Palavras-chave: descarga elétrica, antifúngico, antimicrobiano, dicloro, fungicida.

ABSTRACT

In this study, treatments with different times, between 1 and 15 minutes, were used to inactivate spores of *Alternaria* sp. isolated from Papaya Formosa, since this microorganism is a common and frequent cause of economic losses for exporting companies in Brazil. A fungal suspension was treated with cold atmospheric DC plasma. An electric discharge was produced with 10 kV and 20 kV voltage pulses, repeated at a frequency of 15.5 kHz, applied inside a test tube containing the spore suspension of *Alternaria* sp. (5×10^3 conidia.mL⁻¹). The efficiency of the plasma treatment was compared with the efficiency of a sanitizer (sodium dichloro isocyanurate 400 ppm) and a fungicide (quaternary ammonium, 1000 ppm). The suspension of spores of *Alternaria* sp. was analyzed for its pH and oxidation potential (REDOX). Reduction of pH and increase of redox potential proportional to treatment time and plasma energy demand were observed. Optical emission spectroscopy (OES) was used to identify and monitor the species present in the plasma-liquid system. It was found that the plasma was more efficient than the fungicide and comparable to the sanitizer. Application times of 3 min (20 kV) and 9 min (10 kV) were sufficient for complete inactivation of fungi. The results indicate that plasma treatments have efficiency against fungal spores and that this energy source is promising in food science.

Keywords: electric shock, antifungal, antimicrobial, dichloro, fungicide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – mamoeiros (<i>Carica papaya</i> L.) em Baraúna-RN. Mamão “Formosa”. Fonte: próprio autor.	16
Figura 02 - participação dos principais países na produção mundial de mamão em 2014. Fonte: FAO, 2014.	17
Figura 03 - destino das exportações brasileiras de mamões em 2016. Fonte: ALICE WEB, 2017.	17
Figura 04 - (A) alta concentração de conídios de fungos do gênero <i>Alternaria</i> sp. (B) imagem aproximada dos fungos do gênero <i>Alternaria</i> . Fonte: próprio autor.	19
Figura 05 – lesões características de alternarioses, causadas pelos fungos do gênero <i>Alternaria</i> . Complexos fúngicos podem ser encontrados juntos com as <i>Alternarias</i> . Fonte: próprio autor.	19
Figura 06 – representação dos quatro estados da matéria. Fonte: Misra et al., 2016.	25
Figura 07 - representação esquemática de três descargas elétricas típicas para geração do PNT com tamanhos típicos indicados e aparência de descarga. Fonte: SCHOLTZ et al, 2015.	25
Figura 08 - mecanismos de inativação por oxidação das membranas celulares. Fonte: LIAO, et al., 2017.	28
Figura 09 – mecanismos de inativação por eletroporação celular. Fonte: CSFAN, 2000.	29
Figura 10 – protocolo experimental utilizado. Fonte: próprio autor.	31
Figura 11 – sistema de geração de plasma frio à pressão atmosférica usando o ar. Fonte: próprio autor.	34
Figura 12 – espectroscopia de emissão óptica (OES) do plasma na configuração de descarga elétrica em meio líquido. Fonte: próprio autor.	36
Figura 13 – desenvolvimento <i>in vitro</i> do fungo <i>Alternaria</i> sp. após 24 horas de incubação, quantificadas as UFC's de acordo com os tratamentos a plasma com pulsos de tensão elétrica de 10 kV. Fonte: próprio autor.	38
Figura 14 – crescimento fúngico observado durante os 5 dias de incubação em estufa BOD à 28°C ± 1°C em função do tempo de incubação e tratamentos realizados. Parâmetros de trabalho equivalentes a 10 kV e 15,5 KHz. Fonte: próprio autor.	38
Figura 15 – desenvolvimento <i>in vitro</i> do fungo <i>Alternaria</i> sp. após 24 horas de incubação, quantificadas as UFC's de acordo com os tratamentos a plasma com pulsos de tensão elétrica de 20 kV. Fonte: próprio autor.	40

- Figura 16 – crescimento fúngico observado durante os 5 dias de incubação em estufa BOD à $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em função do tempo de incubação e tratamentos realizados. Parâmetros de trabalho equivalentes a 20 kV e 15,5 kHz. Fonte: próprio autor. 41
- Figura 17 – comparação entre as reduções de pH ocasionadas pelo tratamento à plasma em diferentes tempos e pulsos de tensões elétricas de 10 kV e 20 kV. Fonte: próprio autor. 43
- Figura 18 – potenciais redox ocasionados pelo tratamento à plasma em diferentes tempos e pulsos de tensões elétricas de 10 kV e 20 kV. Fonte: próprio autor. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - condições de tratamentos utilizadas para descontaminação fúngica.....	33
Tabela 02 – crescimento fúngico de <i>Alternaria</i> sp. após tratamento a plasma com 10 kV.....	38
Tabela 03 – crescimento fúngico de <i>Alternaria</i> sp. após tratamento a plasma com 20 kV.....	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAP	Água ativada por plasma
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
DC	Corrente contínua
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
Há	Hectare
kHz	Kilohertz
kV	Kilovolt
OES	Espectroscopia de emissão óptica
ORP	Potencial de óxido-redução
pH	Potencial hidrogeniônico
Ppm	Partes por milhão
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
spp.	Espécies
sp.	Espécie.
Ton	Tonelada
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1. Aspectos gerais sobre a cultura do mamoeiro no Brasil	16
3.2. Doenças de pós-colheita no mamão Formosa e etiologia dos fungos do gênero <i>Alternaria</i>	18
3.3. Logística de exportação do mamão Formosa brasileiro	20
3.4. O plasma	21
3.5. Plasma frio atmosférico	23
3.5. Plasma frio atmosférico em meio líquido	26
3.6. Mecanismos de inativação de microrganismos pelo plasma frio atmosférico ..	27
4. METODOLOGIA	31
4.1. Protocolo experimental	31
4.2. Isolamento do patógeno	32
4.3. Preparo da suspensão fúngica de <i>Alternaria</i> sp.....	32
4.4. Tratamento para inativação da <i>Alternaria</i> sp.	33
4.5. Aparato de plasma	34
4.6. Análise estatística	35
4.7. Análise físico-químico da suspensão de esporos tratados à plasma.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. Espectroscopia de Emissão Óptica (OES) do plasma na configuração de descarga elétrica de alta tensão em água.....	36
5.2. Tratamento a plasma com 15,5 kHz de frequência, 10 kV e 20 kV de tensão elétrica – avaliação microbiológica.....	37
6. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

O mamão Formosa possui grande importância econômica em todo o mundo. Contudo, sua comercialização enfrenta grandes dificuldades relacionadas à fase de pós-colheita. O rápido amadurecimento da fruta intensifica a susceptibilidade aos danos mecânicos e consequentes infecções fúngicas, comprometendo a vida útil e aumentando as perdas na pós-colheita (ZERPA-CATANHO et al., 2017). Portanto, estudar mecanismos alternativos e inovadores de processos assépticos, os quais garantam inativação fúngica e consequente incremento na vida útil de produtos minimamente processados são buscados.

O controle do amadurecimento do mamão é de substancial importância para o aumento de vida útil pós-colheita, sobretudo quando o escopo da produção é o mercado externo, geralmente distante e de logística complexa (OLIVEIRA; VIANNI, 2004). As condições ideais dos frutos são, muitas vezes, comprometidas por fatores de pré e pós colheita, tais como, patógenos e influências abióticas (variações de temperatura e contaminação cruzada, por exemplo), os quais proporcionam perdas consideráveis na qualidade do produto (FOLEGATTI; MATSUURA, 2002). Em conjunto com os fatores supracitados, a alta atividade de água, comum na maioria dos frutos, faz com que estes sejam altamente susceptíveis à degradação microbiológica (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

As melhores condições de armazenamento e transporte dos produtos são aquelas, nas quais os frutos possam ser manipulados durante o maior espaço de tempo possível, não havendo redução significativa em seus atributos de qualidade (FUENTES; SANTAMARÍA, 2014). O mamão apresenta um padrão respiratório do tipo climatério, o qual caracteriza-se pelo fato do amadurecimento continuar após a colheita, expondo o produto às doenças inerentes a esta fase (CHEN et al., 2007).

Entre as doenças que ocorrem nos cultivares de mamoeiro, consideram-se as de pós-colheita como as principais responsáveis pelas perdas mensuradas durante o armazenamento do fruto. Destacam-se dentre doenças: a antracnose, originada pelo fungo *Colletotrichum* sp. e as putrefações ocasionadas pelos fungos do gênero *Alternaria*. as podridões pedunculares também podem ser causadas pelos fungos *Lasiodiplodia* sp., *Fusarium* sp., *Stemphylium* sp. e *Rhizopus* sp. (REZENDE; MARTINS, 2005).

O uso de sanitizantes químicos e fungicidas está sendo minimizado e/ou eliminado em função das exigências dos consumidores. As reivindicações estão sendo feitas no

sentido de que haja a busca por alternativas de tratamento superficial e descontaminação microbiológica dos produtos frescos com o intuito de alcançar a excelência em segurança alimentar (DELIZA et al., 2003; CASTENMILLER et al, 2008; MISRA et al, 2011).

Diante disso, a elaboração, criação e/ou desenvolvimento de uma nova tecnologia para substituir os métodos convencionais de descontaminação é exigida (MIN et al., 2016).

Dentre as alternativas, aquelas que utilizam o plasma frio como fonte energética, são fortes candidatas, principalmente pela sua versatilidade e caráter não poluente. Nos últimos anos, plasmas frios produzidos em pressão atmosférica estão sendo os mais empregados para a descontaminação e degradação microbiológica. A inovação tecnológica em pauta evidencia elevada eficiência para a inativação de contaminantes microbianos em produtos frescos, como frutas (BAIER et al., 2014; FERNANDEZ et al., 2013; LACOMBE et al., 2015; MISRA et al., 2014; ZIUZINA et al., 2015); leite e derivados lácteos (KIM et al., 2015; SONG et al., 2009; YONG et al., 2015a, b); e carne e produtos cárneos (JAYASENA et al., 2015; KIM et al., 2011, KIM et al., 2014). A versatilidade da tecnologia do plasma frio para a descontaminação de alimentos, atua em uma grande variedade de microrganismos, desde bactérias até fungos.

A química do plasma e sua interação com os sistemas orgânicos são de alta complexidade, sendo necessárias investigações aprofundadas nesse sentido. As espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são consideradas principais responsáveis pelos efeitos letais aos microrganismos, tais efeitos são oriundos dos fenômenos do plasma frio atmosférico. Além desses, a radiação ultravioleta (UV) e variações de pH atuam como intensificadores dos efeitos antimicrobianos (KALGHATGI et al, 2011; REUTER et al., 2012; NOSENKO et al., 2009; OEHMIGEN et al., 2010).

Alternaria spp. são fungos latentes, os quais apresentam picos de crescimento durante o armazenamento refrigerado de frutas, uma vez que são do tipo psicotrófico (se desenvolvem em temperaturas de 0°C a 20°C). O fungo se torna visível durante o período de comercialização (TRONCOSO-ROJAS; TIZNADO-HERNÁNDEZ, 2014) e está associado a deterioração total de frutos minimamente processados (OSTRY, 2008). Logo, a inativação deste fungo é fundamental para que frutos possuam uma vida de pós-colheita adequada à comercialização, independentemente da logística e mercado consumidor. Os fungos do gênero *Alternaria* são deteriorantes, mais de 100 espécies vegetais já foram relatadas como afetadas negativamente por esses microrganismos. (ARMITAGE et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito antifúngico do plasma frio à pressão atmosférica, aplicado em meio líquido, quanto a inativação do fungo *Alternaria* sp. isolado do mamão Formosa.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar e identificar os fungos do gênero *Alternaria* a partir de frutos (mamões Formosa) durante a fase da pós-colheita;
- Avaliar o efeito fungicida do plasma frio à pressão atmosférica (descarga elétrica) com duas tensões elétricas (10 kVe 20 kV), sobre os esporos dos isolados de *Alternaria* sp., *in vitro*;
- Identificar as principais espécies reativas do plasma frio, gerado em meio líquido, por espectroscopia de emissão óptica (OES).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Aspectos gerais sobre a cultura do mamoeiro no Brasil

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma herbácea de célere crescimento, cujo tamanho pode variar de 3 a 8 metros de altura e divide-se em dois grandes grupos, o “solo” e o “Formosa” (SALOMÃO et al., 2007), ver Figura 01. A distinção entre os dois grupos está principalmente quanto aos frutos produzidos, o “solo” caracteriza-se por frutos de pequeno porte e produtividade média de 50 ton/ha, enquanto que os híbridos do grupo “Formosa” possuem um porte maior, em média 900 g/fruto e produtividade média de 70 ton/ha (LUNA, 1986; CENTEC, 2004).

Figura 01 – mamoeiros (*Carica papaya* L.) em Baraúna-RN. Mamão “Formosa”.



Fonte: Autoria própria.

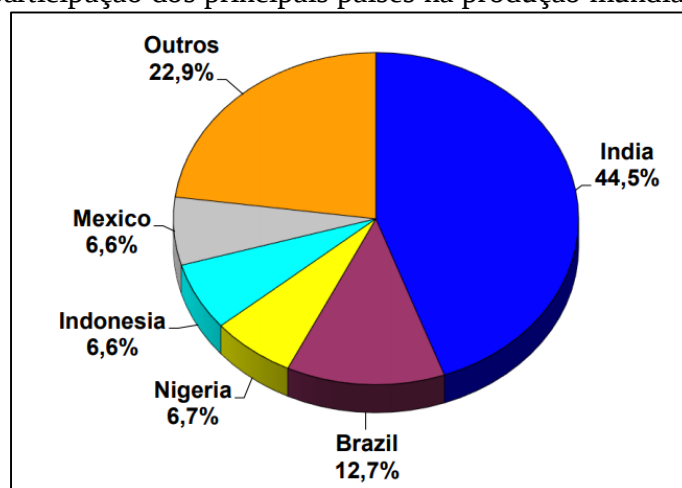
A cultura do mamoeiro exerce um importante papel socioeconômico no Brasil, uma vez que este país, é um dos maiores produtores do mundo (EMBRAPA, 2016). Vale ressaltar que, somente a partir de 1973, com a inclusão dos grupos “havaí” e “papaya” é que a cultura se expandiu para o mundo. Um novo nicho de mercado se abriu em virtude das características especiais da variedade “solo”, pois teve rápida aceitação pelos consumidores estrangeiros, fato que impulsionou a produção nacional (DANTAS et al., 2011).

Atribui-se o grande desenvolvimento comercial da cultura do mamoeiro ao incremento de novas tecnologias de produção, as quais proporcionam ampliações nas

áreas cultivadas, ascensão da capacidade produtiva e prospecção de novos mercados. Do ponto de vista do agronegócio, a fruticultura do Brasil é recebida com grande perspectiva, já que, além das condições climáticas favoráveis, existe a enorme disponibilidade de área cultivável, fato que atrai os olhares de grandes investidores (LIMA, 2001).

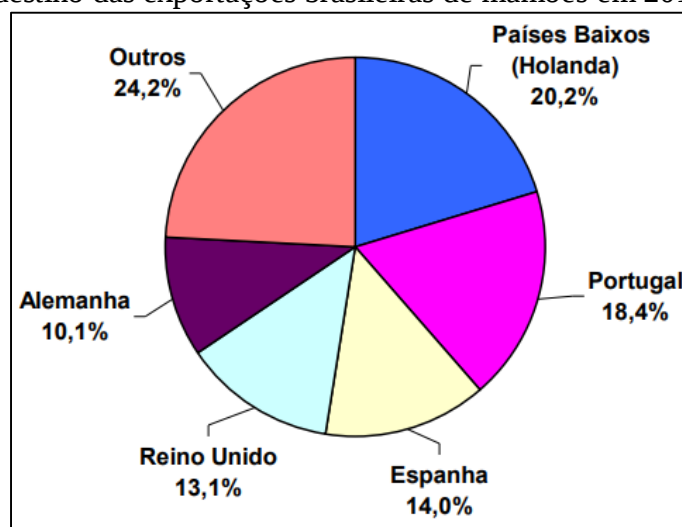
Na atualidade, o Brasil é o segundo maior produtor de mamão (*Carica papaya* L.) do mundo, estando atrás apenas da Índia e a frente da Nigéria, Indonésia e México (Figura 02). A produção nacional é escoada, em grande parte, para o mercado externo. Os principais importadores do mamão brasileiro são: Holanda (20,2%), Portugal (18,4%), Espanha (14%), Reino Unido (13,1%) e Alemanha (10,1%) (Figura 03) (FAO, 2014; ALICE WEB, 2017).

Figura 02 - participação dos principais países na produção mundial de mamão em 2014.



Fonte: FAO, 2014.

Figura 03 - destino das exportações brasileiras de mamões em 2016.



Fonte: ALICE WEB, 2017.

Em âmbito nacional, o estado federativo que mais se destaca é a Bahia, com 49,43% da produção nacional, seguido pelo estado do Espírito Santo (24,68%), Ceará (6,46%), Rio Grande do Norte (4,63%) e Minas Gerais (3,84%). Os demais entes federativos representam 10,96% da produção nacional (IBGE,2016).

3.2. Doenças de pós-colheita no mamão Formosa e etiologia dos fungos do gênero *Alternaria*

Vários fungos são responsáveis por fitopatologias no mamoeiro, tanto na planta quanto no fruto. Dentre inúmeros, destacam-se pela persistência, agressividade e peculiaridades os fungos do gênero *Alternaria*. Infecções fúngicas nos frutos são favorecidas através de condições ótimas de temperatura, umidade e ocorrência de danos mecânicos. O principal fator limitante de expansão comercial do mamão “Formosa” são as doenças de pós-colheita, uma vez que os consumidores exigem atributos ótimos, como aroma, sabor, ausência de danos mecânicos e podridões fúngicas (VIVAS et al., 2013).

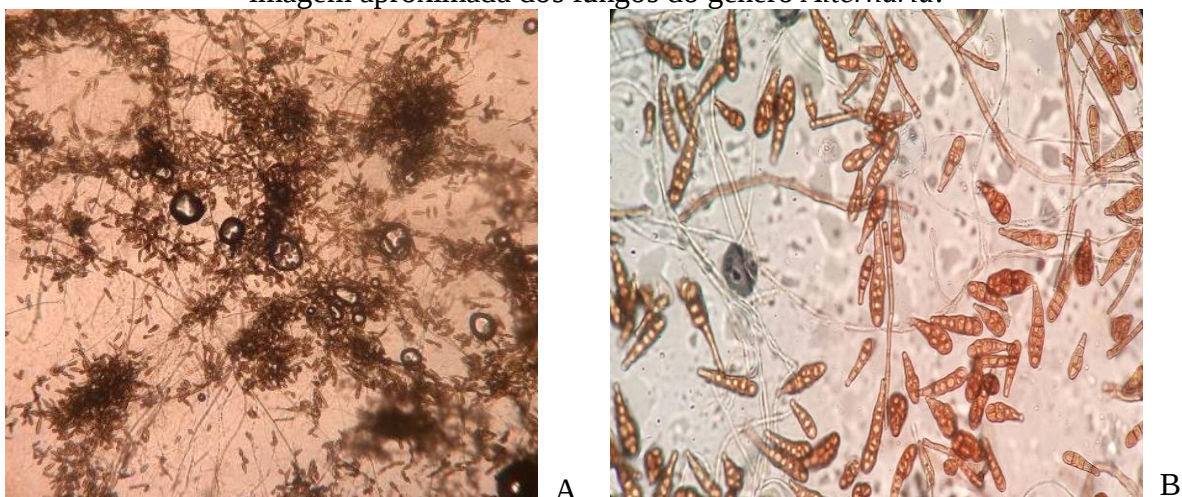
Os fungos do gênero *Alternaria* provocam lesões de forma ovalada e com coloração escura superficial em muitas espécies vegetais, inclusive em mamões “Formosa”. Esses fungos se manifestam predominantemente na fase de pós-colheita, na qual os frutos são mantidos sob refrigeração (SUÁREZ-QUIROZ, 2013). *Alternaria* spp. são fungos considerados psicotróficos, os quais têm como principal característica a predominância e a capacidade de proliferação em temperaturas de refrigeração. Esses fungos são capazes de se desenvolver em alimentos com baixíssimas atividades de água. Com relação ao pH, são pouco afetados pelas variações na faixa de 3 a 8 (SILVA et al., 2007).

Outros fitopatógenos presentes na pós-colheita do mamão (*C. papaya* L.) são: os fungos do gênero *Colletotrichum*, principal causador da antracnose. *Lasiodiplodia theobromae* Griffon & Maublanc, *Stemphyllium lycopersici* (Enjoji) W. Yamamoto, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. ex Fr.) Vuill. e *Fusarium* spp. (KIMATI, 1995; VENTURA et al., 2003). Os efeitos negativos ocasionados pelos fitopatógenos surgem com mais frequência durante a pós-colheita, na qual, surgem podridões em todo o fruto. (VIANA et al., 2014).

Os fungos do gênero *Alternaria* possuem conídios com comprimento e largura variável, comumente individuais e dificilmente ordenados em cadeias, retos e com poucas curvaturas, com o corpo em forma de elipsoide, tendendo a reduzir a espessura à medida

que se segue em direção ao ápice, formando um bico comprido, sinuoso e ocasionalmente ramificado (TÖFOLI et al., 2015). Ainda de acordo com o autor, com relação à coloração, os conídios são pardos ou dourados, com septos transversais e raramente longitudinais, conforme Figura 04.

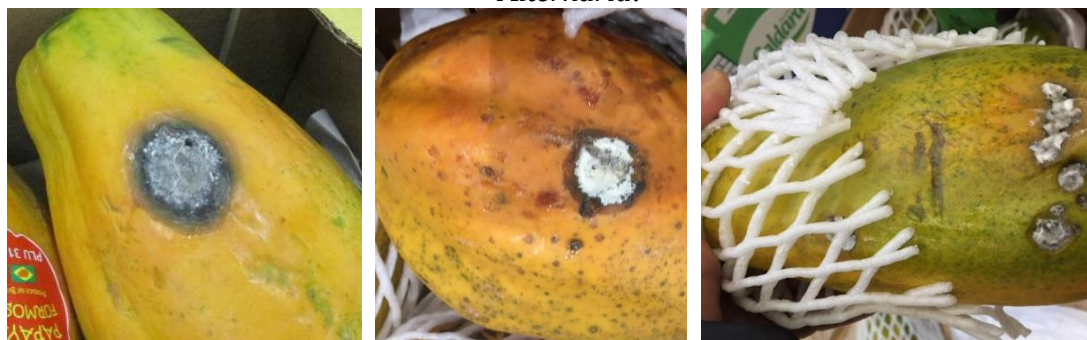
Figura 04 – (A) alta concentração de conídios de fungos do gênero *Alternaria* (B) imagem aproximada dos fungos do gênero *Alternaria*.



Fonte: Autoria própria.

Alternaria spp. causam doenças destrutivas em diversos tipos vegetais. Esses predominam em áreas tropicais e subtropicais, lesionam de 6 a 100% das cargas de produtos comercializados pelo mundo (caso não haja um manejo adequado). As alternarioses têm conseguido maior abrangência em virtude do surgimento de novas estirpes, essas trazem consigo, aumento da agressividade e resistência aos fungicidas já existentes, ocasionando desta maneira, maior dificuldade no controle das epidemias (TÖFOLI et al., 2015).

Figura 05 – lesões características de alternarioses, causadas pelos fungos do gênero *Alternaria*.



Fonte: Autoria própria.

Em frutos como o mamão, os fungos causam perdas de pós-colheita de até 80% na fase de distribuição para os consumidores. A maior parte das doenças que se manifestam durante a pós-colheita iniciam-se no campo e ficam latentes, expressando-se em condições ambientais adequadas. O fitopatógeno pode penetrar no hospedeiro pela cutícula intacta, por ferimentos ou por aberturas naturais, como as lenticelas (ECKERT, 1980; ZAMBOLIM et al., 2002).

3.3. Logística de exportação do mamão Formosa brasileiro

A partir da década de 1980 a exportação de mamão do Brasil começou a se expandir. Os principais centros importadores na Europa Ocidental receberam informações estratégicas veiculadas a partir de grandes feiras e salões de produtos alimentícios. A década de 90 destacou-se pelas degustações com consequente valorização sensorial de frutos em grandes redes dos países importadores, a partir deste momento, o mamão na Europa se popularizou e chegou até o mercado consumidor da França, Inglaterra e Alemanha (FAVERET FILHO et al., 1998).

A produção de mamão “Formosa” do Brasil é logisticamente escoada para o mercado externo, basicamente, por duas vias: a via aérea e a via marítima, predominando a primeira, que é a mais segura para a carga, uma vez que os produtos chegam aos clientes em poucos dias (3 a 5 dias), dependendo do destino. Os frutos chegam sem avanços bruscos na maturação, com poucos danos mecânicos e isentos de podridões fúngicas, em virtude do curto espaço de tempo para seu desenvolvimento, desde que garantido um processo asséptico adequado no *packing house*. Porém, como desvantagem, tem-se o elevado custo e a menor quantidade de fruta transportada, quando comparado com a via marítima. O modal marítimo pode ser um problema e/ou um grande salto à frente dos concorrentes, dependendo da qualidade do fruto e do processo ao qual ele foi submetido. Um fruto de alta qualidade, que foi produzido de forma bem manejada, com boa nutrição, pulverizações com defensivos agrícolas corretos, realizadas de forma periódica e nas concentrações adequadas, dificilmente será acometido por problemas de pós-colheita. Entretanto, caso o fruto não seja bem manejado, provavelmente será atacado por um complexo de fungo e sua pós-colheita estará comprometida (TOZI, 2005).

A vida pós-colheita dos frutos está diretamente relacionada com a quantidade de fungos que existem em sua superfície, diante disso, afirma-se que o processo asséptico adequado para limpeza superficial dos mamões garante a esses uma elevada vida pós-

colheita e consequentemente, maiores lucros em função da redução drástica de perdas por podridões fúngicas. Logo, a descontaminação fúngica é um parâmetro fundamental e determinante para se ter um aumento da vida de prateleira dos frutos exportados e máxima satisfação dos consumidores (CHITARRA E CHITARRA, 2005).

3.4. O plasma

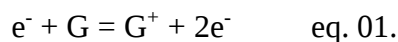
O desenvolvimento da física do plasma esteve sempre associado a aplicações em diversas áreas. Iniciou-se com fontes de iluminação, fusão termonuclear e aceleradores de plasma. Atualmente, aplicações específicas como processamento de materiais por plasma, propulsão espacial, nanotecnologia e projetos medicinais têm sido estudadas. Físicos proeminentes contribuíram para o desenvolvimento da tecnologia do plasma, Irving Langmuir (1881-1957) deu início ao estudo da tecnologia plasmática com um novo direcionamento científico, introduzindo o termo “plasma” em 1928. Irving esclareceu fenômenos que eram de conhecimento subjetivo de todos desde a antiguidade. A matéria no estado de plasma era conhecida como: aurora boreal, vento solar e ionosfera terrestre, esses são alguns exemplos de plasmas naturais (KEIDAR; BEILIS, 2013).

O termo “plasma” também indicado como “descarga elétrica”, “descarga gasosa” ou “descarga luminescente” se aplica a um fluido contendo espécies neutras e eletricamente carregadas como elétrons, íons positivos, íons negativos, átomos e moléculas (ALVES JR., 2001).

De acordo com Keidar e Beilis (2013), o processo de ionização é o fenômeno associado aos *striking* de elétrons e dos átomos, criando assim o par de partículas carregadas negativamente e positivamente. As propriedades elétricas de tal gás ionizado dependem da densidade das partículas carregadas. O estado físico de um gás ionizado em que as densidades de partículas carregadas positivamente e negativamente são aproximadamente iguais é um estado de quase-neutralidade. Diante disso, o plasma é definido como um gás ionizado, que satisfaz a condição de quase-neutralidade.

Artificialmente, o plasma é formado quando um fluido se encontra entre dois eletrodos (cátodo e ânodo) e entre eles há uma diferença de potencial (DDP). Essa última gerará um campo elétrico, o qual provocará a aceleração dos elétrons livres. Os elétrons irão adquirir elevada energia cinética e colidirão com partículas neutras que cruzam seu caminho, transferindo energia. Mais elétrons serão liberados através destes impactos, os quais serão novamente influenciados pelo campo elétrico existente. Esses novos elétrons

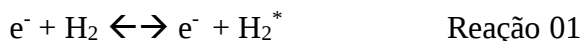
irão colidir novamente com outras partículas, fato que acarretará na ionização do gás. A equação abaixo evidencia o efeito supracitado.



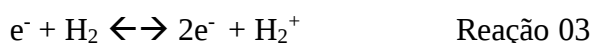
Sendo “G” a partícula neutra do gás, “G⁺” a partícula ionizada do gás, “e⁻” representa o elétron (ALVES JR., 2001).

Segundo Alves Jr., (2001) e Keidar e Beilis (2013), as partículas do plasma modificam seus estados de energia e excitação através de colisões entre partículas. Ocorrem dois tipos de colisões, as elásticas e as inelásticas. As primeiras consistem em eventos nos quais a energia cinética total das partículas é conservada e as partículas mantêm suas cargas originais. As colisões não elásticas são aquelas em que a energia cinética é redistribuída entre as partículas para a criação de partículas novas. Colisões não elásticas conduzem os sistemas a processos diretos e inversos, como excitação e “desexcitação” molecular, ionização e recombinação, troca de cargas, dissociação e neutralização de cargas.

Excitação (reação 01), ocorre quando a energia de colisão do elétron é inferior à necessária para ionizar. “Desexcitação”, relaxação ou emissão (reação 02), acontece imediatamente após a excitação das espécies, quando haverá o decaimento eletrônico para os níveis menos energéticos, liberando energia na forma de luz (fóton).

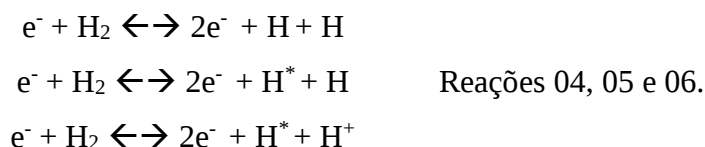


A ionização (reação 03) ocorre quando os elétrons de maior energia colidem com as moléculas do gás, ocasionando a remoção de um elétron do átomo, formando um íon e dois elétrons.



Também ocorre a dissociação molecular (reações 04, 05 e 06) em função da colisão de moléculas com elétrons altamente energéticos. A energia do elétron

proveniente do choque irá determinar a formação de átomos neutros, excitados ou ionizados.



A recombinação (reação 07) acontece quando espécies ionizadas chocam-se com uma superfície, elétrons desta superfície são liberados, neutralizando os íons.



3.5. Plasma frio atmosférico

A demanda crescente dos consumidores por uma melhor qualidade dos alimentos se concentra principalmente em usos cada vez menores de conservantes e aditivos químicos. A produção de frutas, legumes e saladas minimamente processadas também cresceu ligeiramente nos últimos anos. A prevenção de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) exige cautela em toda a cadeia produtiva alimentar. Vários métodos que limitam a contaminação microbiana são utilizados no processamento industrial, eles baseiam-se nas alterações de propriedades, como o teor de água e pH. Esses métodos mostram-se eficientes, contudo, geralmente são caros ou muito lentos, outros alteram negativamente as propriedades dos alimentos ou mesmo favorecem a formação de subprodutos tóxicos (SCHOLTZ et al, 2015).

Emerge a necessidade de trazer para o cotidiano estilos de vida cada vez mais saudáveis: com melhores dietas, produtos alimentares frescos ou minimamente processados. Esses, têm recebido atenção especial pela maior parte dos consumidores do mundo, em especial, os mais exigentes e comprometidos com sua qualidade de vida (MIR, SHAH; MIR, 2016). Contudo, os patógenos deteriorantes intrínsecos dos alimentos é o grande desafio da indústria, uma vez que eles possuem alta capacidade de desenvolvimento de doenças transmitidas por alimentos (DTA). Atualmente a maioria dos alimentos frescos são consumidos crus, sem processamento e sem cozimento e, logo, os índices de DTA's aumentam em função disso (ZIUZINA et al, 2015).

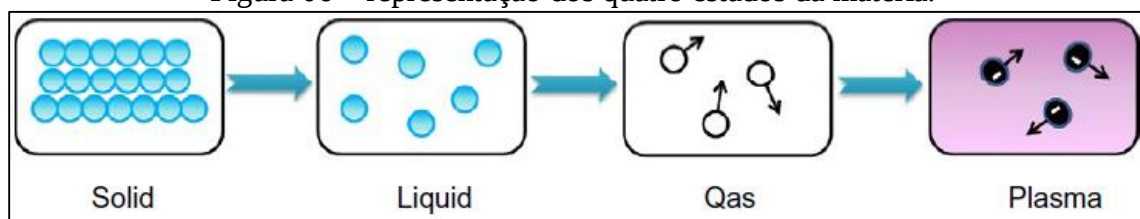
A satisfação dos consumidores é algo priorizado pelos beneficiadores de alimentos. Além da qualidade organoléptica (sensorial) e nutritiva terem que ser mantidas a todo custo, a segurança microbiológica também necessita ser assegurada (FERNANDEZ et al., 2013). Porém as ferramentas de esterilização térmicas convencionais podem causar efeitos indesejados sobre a qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (BERK, 2008). Diante disso, atualmente, várias inovações tecnológicas estão sendo buscadas, visando provocar danos mínimos aos alimentos e segurança alimentar em excelência.

O estudo das descargas elétricas em fluidos cita dois tipos de plasma, o plasma térmico e o não térmico. No primeiro, os elétrons estão na mesma temperatura que as partículas (íons, moléculas neutras e átomos), a descarga encontra-se em equilíbrio e sua temperatura atinge valores de milhares de Kelvins. Por outro lado, o plasma não-térmico (PNT) será gerado quando a maior parte da energia for transmitida para os elétrons e somente sua temperatura atingirá valores elevados. Nesse caso, as partículas e os íons neutros têm pouca quantidade de energia e permanecem em temperaturas normais. A baixa temperatura macroscópica é a principal característica do PNT e permite o tratamento de materiais termossensíveis. O PNT pode ser gerado por descargas elétricas em gases sob pressão baixa ou atmosférica (FRIDMAN; KENEDY, 2004).

O plasma não térmico (plasma frio atmosférico) possui grande potencial na preservação de alimentos, em virtude da elevada eficiência antimicrobiana e efeitos deletérios mínimos (JAYASENA et al., 2015).

O plasma frio atmosférico é classicamente definido como o quarto estado físico da matéria, o qual retrata o aumento do nível energético do estado sólido em direção ao líquido e, em seguida, para o gás, prosseguindo, finalmente, para um estado ionizado do gás, o plasma, o qual possui propriedades únicas (Figura 06). Qualquer fonte de energia que tenha capacidade e condições de ionizar um fluido, poderá gerar um plasma. O fluido ionizado, plasma, é constituído de várias espécies atômicas, moleculares, iônicas e radicais. Os elétrons e os íons livres fazem do plasma um condutor elétrico interativo e fortemente responsável pela geração de campos eletromagnéticos. A maioria das espécies químicas reativas no plasma são caracterizadas por eficientes ações antimicrobianas (FRIDMAN, 2008).

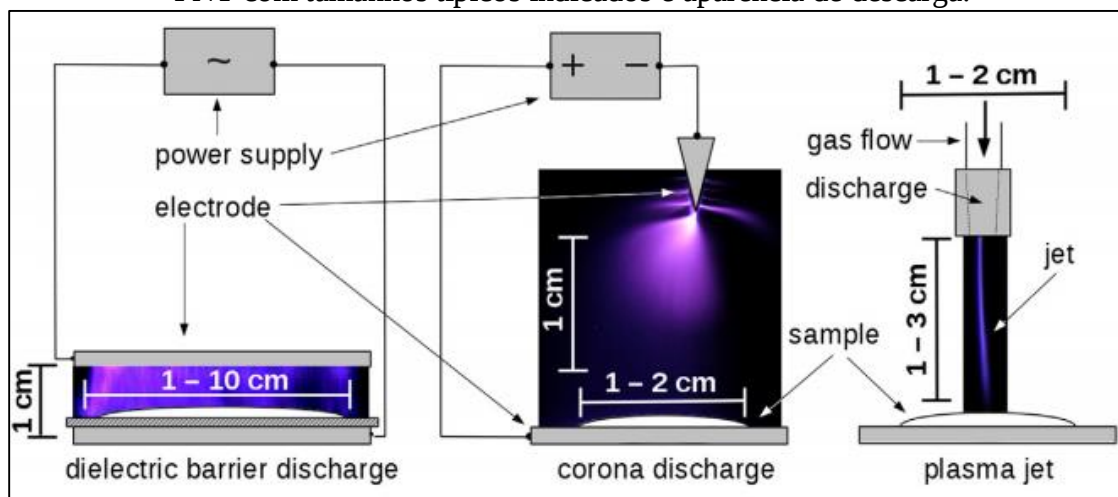
Figura 06 – representação dos quatro estados da matéria.



Fonte: Misra et al., 2016.

O plasma contém muitas partículas carregadas ($\text{OH}^\cdot$, H_2O^+ e elétrons), espécies reativas (espécies reativas de oxigênio - ROS, $\text{OH}^\cdot$, O_2 , $\text{O}_2^\cdot$, espécies de nitrogênio reativo - RNS, $\text{NO}^\cdot$, $\text{ONOO}^\cdot$), moléculas excitadas como O_2^* e N_2^* , fótons UV, UVC, UVB, levando a inativação microbiana (SCHOLTZ et al, 2015).

Figura 07 - representação esquemática de três descargas elétricas típicas para geração do PNT com tamanhos típicos indicados e aparência de descarga.



Fonte: SCHOLTZ et al, 2015.

O plasma frio atmosférico apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais de descontaminação, como: baixa temperatura, ausência de subprodutos tóxicos, danos mínimos em produtos alimentares e baixo custo, tornando-o uma alternativa às tecnologias convencionais de esterilização (ZIUZINA et al., 2015).

3.5. Plasma frio atmosférico em meio líquido

Os líquidos à base de água e a própria água destilada sofrem modificações em suas propriedades físico-químicas após interações com o plasma frio atmosférico. Potencial hidrogeniônico (pH), condutividade elétrica e potencial oxidativo (REDOX) são as principais propriedades alteradas. Após receberem tratamentos à base de plasma frio atmosférico, os líquidos (a água) passam a ser denominados de líquidos ativados por plasma ou água ativada por plasma (AAP) (VLAD et al., 2017).

Dependendo do gás utilizado na descarga (argônio, hélio, nitrogênio, ar atmosférico), espécies reativas de oxigênio (ROS, O_3 , H_2O_2 , $OH^\cdot$ e radicais) e espécies reativas de nitrogênio (RNS, peroxinitrito, nitratos, óxidos de nitrogênio e radicais) são gerados no núcleo do plasma ou na interface gás-líquido, passando para a dispersão em meio líquido (GORBANEV et al., 2016). Dentre as espécies reativas, algumas são de longa vida e outras de curta permanência no meio instabilizado pelo plasma frio atmosférico. Liu et al., (2016) ao estudar a interação de uma descarga elétrica em meio líquido (água deionizada), chegaram à conclusão de que as partículas de longa duração no após interação com o plasma eram os íons H^+ , nitrato, nitrito, H_2O_2 e ozônio.

De acordo com Misra et al., (2016), algumas diferenças importantes são apontadas quando se tratam de plasmas aplicados em meios líquidos e em meios sólidos, principalmente com relação às profundidades de penetração das espécies nos substratos. A aplicação em meios sólidos, comumente, limita-se ao tratamento superficial. A capacidade de penetração das espécies reativas dos plasmas em sólidos depende de alguns fatores, como: a composição do substrato, teor de água e porosidade. Alguns estudos mostram que espécies reativas de oxigênio (ROS), nitrogênio (RNS), ozônio e UV podem penetrar alguns micrômetros de profundidade em biofilmes, ou seja, substrato sólido.

Xiong et al., (2011) estudaram a profundidade de penetração de um jato de plasma em biofilmes no qual foram inoculadas bactérias *Porphyromonas gingivalis* usando um microscópio de varredura laser. O estudo mostrou que o plasma era capaz de inativar as células bacterianas até uma profundidade de 15 μm . Contudo, a profundidade de penetração limitada no substrato pode ser considerada uma vantagem, uma vez que a principal razão para a aplicação de plasma na superfície é uma descontaminação microbiana com efeitos deletérios mínimos.

Segundo Locke e Shih (2011), os substratos líquidos se comportam de forma diferente dos sólidos, já que cada elemento de volume entra em contato com o plasma

aplicado (ou, pelo menos, com produtos de reações subsequentes), de modo que a profundidade de penetração não seja de fundamental importância. Dessa forma, se o plasma é aplicado para descontaminar um líquido, não só os microrganismos serão afetados, mas também todos os outros componentes circundantes, até mesmo os alimentos. Portanto, a otimização em relação a uma boa eficácia antimicrobiana, a qual garanta a retenção dos constituintes essenciais dos alimentos representa um grande desafio.

3.6. Mecanismos de inativação de microrganismos pelo plasma frio atmosférico

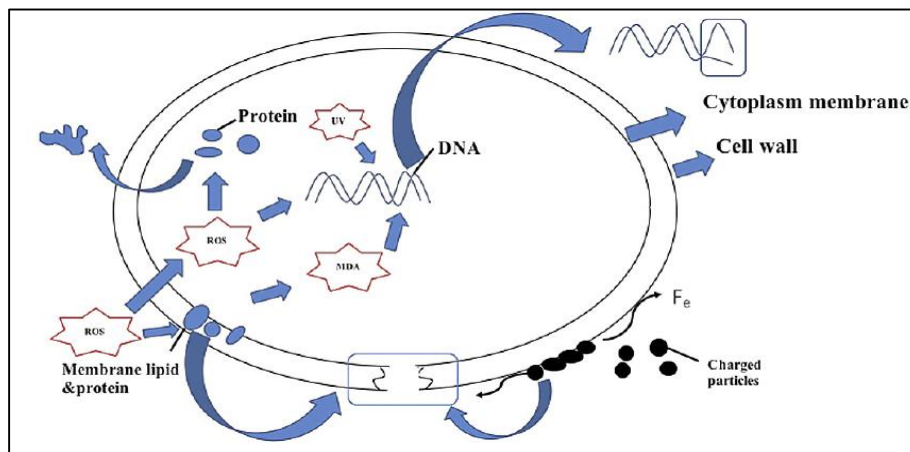
O êxito da tecnologia de plasma quando aplicado aos processos está diretamente ligado ao entendimento completo do efeito desta fonte de energia nos microrganismos alvo. Vários estudos obtiveram sucesso na inativação microbiana, contudo as explicações ainda não conclusivas devido aos complexos sistemas do plasma e dos microrganismos (BOUDAM et al., 2006). De acordo com a literatura, os principais mecanismos de inativação microbiológica podem ser divididos em biológicos e físicos.

Com relação aos mecanismos biológicos, danos ao DNA via radiação UV é um dos efeitos defendidos. Tem sido proposto que danos ao DNA são induzidos diretamente pela radiação UV produzida a partir do plasma e, esse mecanismo é atribuído como meio biológico de inativação microbiana (WINTER et al., 2011) (Figura 08). Beggs, (2002), mostrou que a radiação UV, especialmente a cerca de 260 nm, pode resultar em uma reação entre timina e citosina na mesma cadeia de DNA em um dímero e prejudicar gravemente a capacidade replicativa dos microrganismos.

Outro efeito biológico defendido é a oxidação das membranas ou componentes intracelulares (DNA, proteínas, lipídios e carboidratos). Desses componentes, os lipídios, em especial, os ácidos graxos polinsaturados são considerados os mais frágeis, em virtude de sua localização próxima à superfície celular e sua sensibilidade às espécies oxigenadas reativas (ALKAWAREEK et al., 2014) (Figura 08).

As ROS desempenham um papel fundamental nas vias metabólicas biológicas, essas espécies são capazes de induzir o estresse oxidativo intracelular e morte programada, induzindo apoptoses em células vivas (AHN et al., 2011).

Figura 08 - mecanismos de inativação por oxidação das membranas celulares. É possível ver lise da membrana, acúmulo de cargas e modificações na estrutura do DNA da célula.

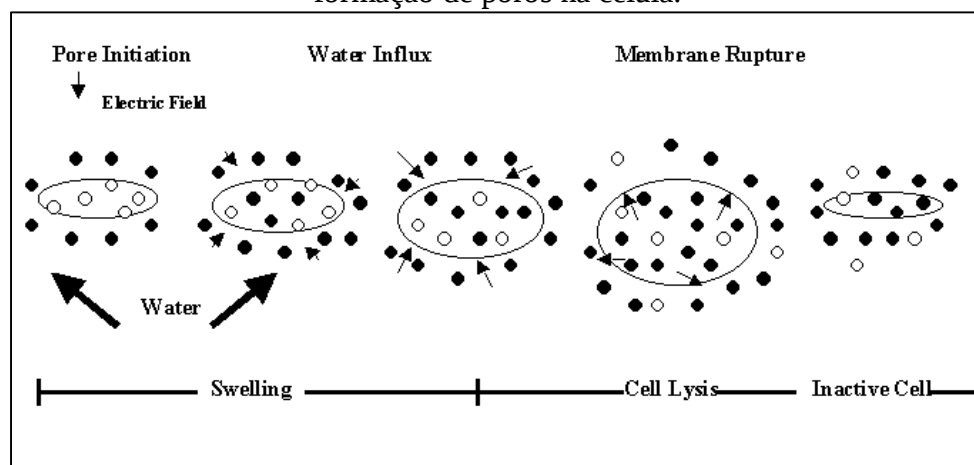


Fonte: LIAO, et al., 2017.

A modificação estrutural de proteínas também foi classificada como método de inativação microbiana (DENG et al., 2009). A degradação ou modificação estrutural proteica é atribuída aos radicais hidroxilos gerados pelo plasma frio atmosférico (Figura 08).

No tocante aos métodos físicos, a ruptura eletrostática por plasma frio atmosférico é um dos destaques de inativação mais estudados. De acordo com o mecanismo, as forças eletrostáticas produzidas pelo acúmulo de partículas instáveis geradas a partir do plasma promovem a ruptura das membranas celulares, seguida de morte celular (LUNOV et al., 2015). Outro método físico bastante estudado e aceito pela literatura é a eletroporação, um mecanismo que induz à formação de poros nas membranas celulares, fazendo com que haja o vazamento de constituintes essenciais da célula (citoplasma), ocasionando, inevitavelmente, a morte celular (SALE; HAMILTON, 1967; ZIMMERMA et al., 1974) (Figura 09).

Figura 09 – mecanismos de inativação por eletroporação celular. É possível verificar a formação de poros na célula.



Fonte: CSFAN, 2000.

O plasma frio atmosférico já consolidou a letalidade sobre bactérias (microrganismos procarióticos), contudo poucos estudos existem quanto aos efeitos da interação de plasma vs. fungo (microrganismos eucarióticos). Os fungos são agentes patogênicos que causam doenças em animais e plantas. A maioria das doenças fúngicas podem ser controladas através da ação de fungicidas, porém, a utilização inadequada pode levar ao desenvolvimento de cepas super-resistentes, poluição ambiental e problemas de saúde humana (PARK et al., 2012).

Soušková et al. (2011, 2012) estudaram o processo de inativação por plasma frio atmosférico em fungos (*Aspergillus oryzae*, *Cladosporium sphaerospermum* e *Penicillium crustosum*) e leveduras (*C. albicans*) comparando com o processo de inativação de bactérias (*E. Coli* e *Staphylococcus epidermidis*), os pesquisadores chegaram à conclusão de que o processo de inativação não apresentava diferença significativa entre as bactérias (a inativação total ocorreu entre 2 e 4 min de exposição ao plasma), contudo a susceptibilidade dos fungos dependeu da espécie, já que, *Cladosporium* e *Penicillium* foram inativados após 20-30 min de interação com o plasma quando a suspensão fúngica era de 10^4 UFC.mL⁻¹, já *Aspergillus* foi inativado após 30 min quando a concentração da suspensão era de 10^2 UFC.mL⁻¹.

Scholtz et al. (2015) afirma que diferenças nos intervalos de tempo para inativação entre bactérias e fungos podem ser causadas pelas diferenças na composição e estrutura procariótica e eucariótica. A estrutura celular dos fungos é mais complexa do que uma bactéria. Assim, diferentes condições de plasma devem ser adotadas para alcançar um efeito de inativação comparável.

Pesquisas têm mostrado que seres eucarióticos (fungos) são mais resistentes ao tratamento a plasma quando comparado com bactérias (microrganismos procarióticos), deste modo, existem diferenças nas respostas às interações com o plasma entre os microrganismos procarióticos e eucarióticos. Diferenças celulares estruturais originam diferentes respostas dos sistemas de defesa microbiano. Fazendo analogia com as bactérias, os fungos possuem uma estrutura de parece celular distinta e mecanismos de defesa sofisticados frente a diversos tipos de estresse (ALONSO-MONGE et al., 2009).

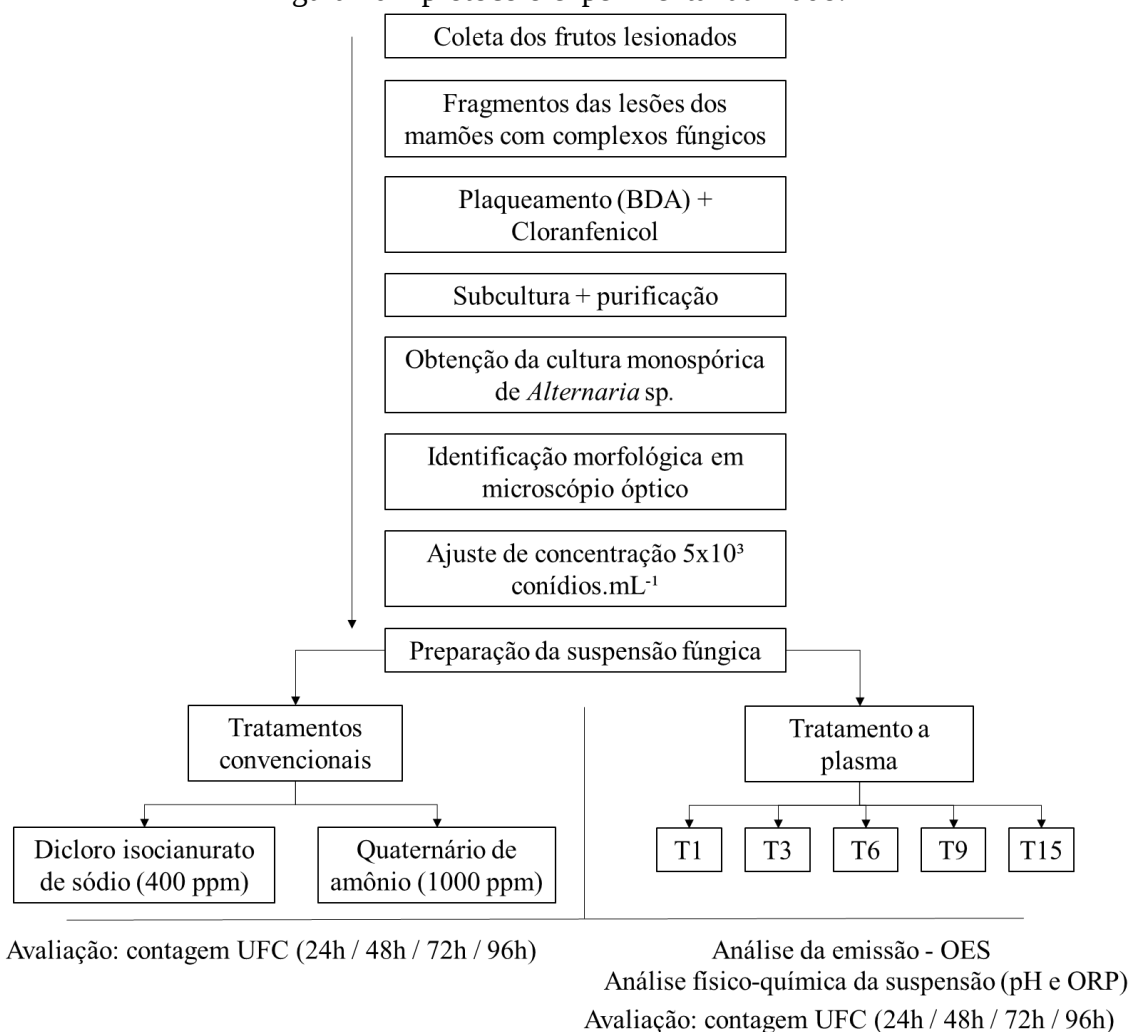
As respostas microbianas ao plasma devem ser esclarecidas para elucidar os mecanismos de como o plasma atua sobre microrganismos. A destruição celular e da membrana da célula, o dano ao DNA oxidativo e a oxidação dos lipídios da membrana, em resposta ao plasma, têm sido frequentemente observados em bactérias. No entanto, os relatórios sobre as respostas dos fungos ao plasma são raros (PARK et al., 2012). Park et. al. (2012), avaliaram o comportamento do fungo *Neurospora crassa* quando exposto ao plasma frio atmosférico em meio líquido, ele observou que os fungos, após interação plasmática, foram afetados significativamente, uma vez que alterações morfológicas na superfície dos fungos foram observadas, as quais podem ser atribuídas ao vazamento de fluidos e materiais intracelulares em virtude da destruição das estruturas citoesqueléticas após exposição ao plasma.

4. METODOLOGIA

Para a realização do experimento, foi utilizado um aparato experimental gerador de plasma atmosférico em meio líquido, com configuração do tipo descarga elétrica de alta tensão. Foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas das suspensões fúngicas tratadas. As atividades foram realizadas no laboratório de plasma aplicado a agricultura, saúde e ao meio ambiente – LABPLASMA, o qual pertence ao centro integrado de inovação tecnológica do semi-árido - CITED e no laboratório de biotecnologia de fungos – LABFUNGI, pertencente ao centro de ciências biológicas e saúde, ambos localizados na Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

4.1. Protocolo experimental

Figura 10 – protocolo experimental utilizado.



Fonte: próprio autor.

4.2. Isolamento do patógeno

Alternaria sp. foi obtido de lesões de mamão Formosa, após 28 dias de armazenamento sob refrigeração à temperatura $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 90%. Foram retirados fragmentos das extremidades das lesões, em seguida, imersos em álcool 70% durante 30 segundos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio a 2% por 1 minuto e posterior lavagem em água destilada esterilizada. Após secagem em papel filtro estéril, os fragmentos foram colocados em placas com meio de cultura BDA (batata-dextrose-água) com antibiótico cloranfenicol a 50 mg/L, conforme metodologia de Menezes; Silva (1997) e Carvalho et al. (2011). As placas contendo os fragmentos foram mantidas a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa tipo BOD, no escuro, durante cinco dias para o crescimento das colônias fúngicas. Posteriormente as colônias foram purificadas e em seguida as culturas puras foram preservadas em tubos de cultura contendo meio de cultura BDA com cloranfenicol e mantidas sob refrigeração a 5°C . As colônias puras foram submetidas à identificação quanto ao gênero, em microscópio óptico, com auxílio de chave dicotômica. Por fim, a suspensão fúngica de *Alternaria* sp. foi produzida para os tratamentos a plasma, dicloro isocianurato de sódio e quaternário de amônio.

4.3. Preparo da suspensão fúngica de *Alternaria* sp.

Foram realizadas subculturas em placas de pétri contendo meio de cultura BDA, foram repicadas com o fungo (armazenado em tubos) e mantidas por 7 dias em estufa BOD ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro) para seu desenvolvimento. Sobre as placas foram acrescidos 10 mL de água destilada esterilizada mais Tween 80 a 0,1% e, com auxílio de uma alça de Drigalski flambada, suas superfícies foram raspadas para retirada dos conídios. Em seguida a água com os fragmentos fúngicos foi coada em dupla camada de gaze esterilizada, para obtenção da suspensão de conídios.

A suspensão armazenada em tubos de ensaio foi homogeneizada em agitador de tubos, vortez, para promover a dispersão dos conídios e contados com o auxílio de câmara de Neubauer. A suspensão foi ajustada para 5×10^3 conídios.mL⁻¹.

4.4. Tratamento para inativação da *Alternaria* sp.

Tabela 01 - condições de tratamentos utilizadas para descontaminação fúngica.

Amostra	Agente Biocida	Voltagem (kV)	Duração (min)
Controle Negativo	-	-	-
TCl	Dicloro isocianurato de sódio, 400 ppm	-	-
Tfungi	Quaternário de amônio, 1000 ppm	-	-
10T1/20T1	Plasma	10/20	1
10T3/20T3	Plasma	10/20	3
20T6	Plasma	20	6
10T9/20T9	Plasma	10/20	9
10T15/20T15	Plasma	10/20	15

Fonte: próprio autor.

Os seguintes tratamentos foram realizados a fim de inativar a *Alternaria* sp., convencionais: T Cl (dicloro isocianurato de sódio, 400 ppm) e T fungi (quaternário de amônio, 1000 ppm). Plasma: T1, T3, T6, T9 e T15, sendo os números o tempo de tratamento em minutos (Tabela 01). Os tempos de exposição dos fungos ao plasma foram baseados nos tempos utilizados em packing houses durante a pré-higienização dos frutos.

Os tratamentos a plasma foram realizados na suspensão fúngica, contidas em tubos de ensaio, com posterior plaqueamento em condições assépticas, de 0,1 mL da suspensão à 5×10^3 conídios.mL⁻¹, em meio de cultura BDA e espalhada com alça de Drigalski flambada.

Nos tratamentos T Cl e T fungi os produtos foram incorporados ao meio de cultura BDA, fundente após a autoclavagem, de forma asséptica, quando resfriado à temperatura de $\pm 50^\circ\text{C}$ de acordo com a metodologia de Edgington et al. (1971), modificada por Menten et al. (1976). Após a solidificação do meio de cultura, as placas receberam a suspensão de conídios, na mesma quantidade e concentração utilizada nos tratamentos a plasma e espalhada com alça de Drigalski flambada.

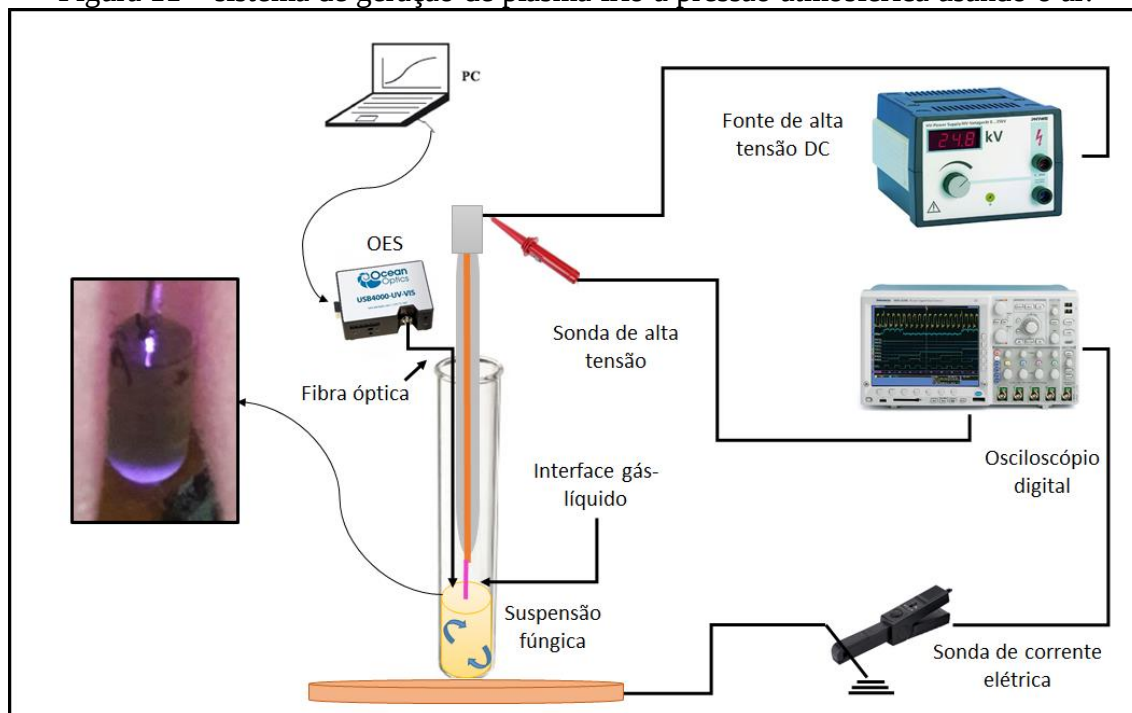
As testemunhas foram representadas por placas de pétri contendo meio de cultura BDA, inoculadas com a mesma quantidade de suspensão fúngica e na mesma concentração e espalhada com alça de Drigalski flambada.

As placas de todos os tratamentos e testemunhas foram mantidas em estufa BOD ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, no escuro) durante 5 dias, para proporcionar o crescimento fúngico.

4.5. Aparato de plasma

O aparato experimental para tratamento a plasma (Figura 11) é composto de uma fonte de alta tensão pulsada, eletrodo de cobre revestido com vidro e periféricos para análise espectral (espectrômetro de emissão óptica) e monitoramento de voltagem e corrente (osciloscópio acoplado a sonda de alta voltagem). O eletrodo de cobre, polarizado catodicamente, revestido com tubo de vidro de 3,5 mm de diâmetro e 100 mm de comprimento, foi inserido no interior de um tubo de ensaio de 20 mm de diâmetro. A solução contendo a suspensão fúngica ficava aterrada com auxílio de uma placa de cobre no fundo do tubo de ensaio. No interior do tubo de ensaio, na região da descarga, foi introduzida uma fibra óptica tipo SR, com diâmetro do núcleo de 600 μm , que estava conectada a um espectrômetro de emissão óptica marca Ocean Optics, modelo USB4000 para captura da radiação emitida pelo plasma e condução até o espectrômetro. No eletrodo de cobre (cátodo) foi aplicado pulsos de tensão de 10 kV ou 20 kV, repetidos na frequência de 15,5 kHz, tendo a solução fúngica como ânodo.

Figura 11 – sistema de geração de plasma frio à pressão atmosférica usando o ar.



Fonte: próprio autor.

Devido à diferença de potencial aplicada entre os eletrodos, dá-se início a descargas por barreira dielétrica sobre 4 mL de suspensão fúngica. A descarga concentrou-se no centro do tubo, estando a distância de 5 mm da interface gás-líquido. As descargas elétricas foram executadas durante os tempos 1, 3, 6, 9 e 15 minutos, baseando-se nos tempos em que os frutos permanecem durante a pré-lavagem nas *packing houses*. A tensão de descarga e a corrente foram medidas por um osciloscópio digital. O gás utilizado na descarga foi o ar atmosférico.

4.6. Análise estatística

O experimento foi realizado em duas etapas, na primeira, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com um controle negativo, seis tratamentos (T Cl, T fungi, T1, T3, T9 e T15), três repetições e quatro períodos de observação e contagem (24, 48, 72 e 96 horas). A segunda assemelhou-se a primeira, diferindo apenas no aumento da tensão elétrica, a qual passou a ser 20 kV, foi adicionado mais um tempo de tratamento, T6, e não se avaliou o efeito do fungicida comercial. Na segunda etapa, realizou-se o DIC, com um controle negativo, seis tratamentos (T Cl, T1, T3, T6, T9 e T15), três repetições e quatro períodos de observação e contagem, (24, 48, 72 e 96 horas). Em ambas as etapas, a análise dos dados utilizou análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.7. Análise físico-químico da suspensão de esporos tratados à plasma

A suspensão fúngica foi analisada quanto às suas propriedades físico-químicas. Foram avaliados os seguintes parâmetros: potencial hidrogeniônico – pH – no pHmetro Tecnal, modelo TEC-3MP e potencial redox (ORP) com o auxílio do ORP-169E TESTADOR REDOX ($0 \sim \pm 1999$ mv). Em todas as condições de tratamento, o pH do fluido foi medido antes e após a exposição ao plasma, bem como o potencial redox.

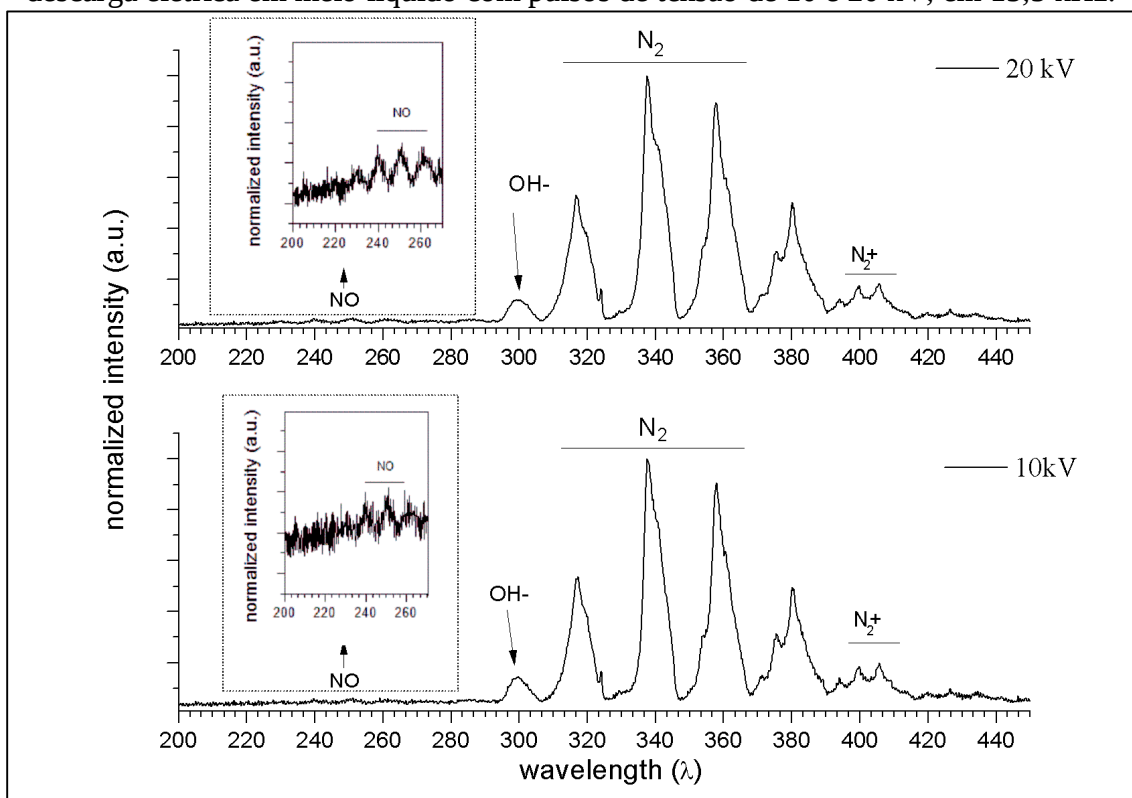
A caracterização química do plasma foi realizada através da técnica de Espectroscopia de Emissão Óptica (OES), utilizando o equipamento da marca Ocean Optics, modelo USB4000 e fibra óptica tipo SR com diâmetro do núcleo de 600 μ m e 1 metro de comprimento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Espectroscopia de Emissão Óptica (OES) do plasma na configuração de descarga elétrica de alta tensão em água

Os espectros de emissão ultravioleta e visível na faixa de comprimento de onda de 200 a 450 nm, são mostrados na figura 12. Eles são oriundos da região de contato plasma-água quando aplicados pulsos de tensão de 10 e 20 kV, repetidos em frequência de 15,5 kHz.

Figura 12 – espectroscopia de emissão óptica (OES) do plasma na configuração de descarga elétrica em meio líquido com pulsos de tensão de 10 e 20 kV, em 15,5 kHz.



Fonte: Autoria própria.

Em ambas as tensões, observam-se semelhanças nas espécies formadas no plasma. As diferenças surgem apenas com relação às intensidades, que antes da normalização realizada para a figura 12, o espectro para 20 kV foi em torno de 1,5 vezes mais intenso. Verificam-se também que as bandas de intensidade do nitrogênio N_2 são muito intensas, quando comparadas com as bandas da hidroxila. A elevada intensidade pode estar relacionada com a presença de nitrogênio molecular e nitrogênio molecular iônico. Através do OES foi possível identificar hidroxila OH^- ($\lambda = 304$ nm), picos típicos de N_2

($\lambda = 315 - 370$ nm), óxido nítrico NO ($\lambda = 240 - 260$ nm), e N_2^+ ($\lambda = 390 - 410$ nm), em ambas tensões de trabalho. As espécies reativas encontradas no presente trabalho, também foram observadas por Pasquali et. al. (2016), Vukusic et. al. (2016), Vlad and Anghel, (2017).

Pasquali et. al. (2016) e Laroussi e Leipold, (2004), afirmam que as RONS (H_2O_2 , O_3 , NO, OH e O_2^+) estão diretamente relacionadas com a eficiência da inativação microbiana. A maior eficácia da inativação de microrganismos é obtida por meio de espécies reativas de oxigênio, como O_3 , OH e NO.

As propriedades físico-químicas da água sofrem modificações após exposições ao plasma frio atmosférico, a existência de RONS na interface plasma-água é fundamental para isso. (Vlad And Anghel, 2017).

Jie et al. (2015), testaram a aplicação de plasma em água visando inativação microbiana. Os autores concluíram que partículas energéticas, como os elétrons, íons e RONS são os principais responsáveis pela inativação. À medida que as reações acontecem na interface plasma-líquido, as partículas energéticas são incorporadas pelas moléculas de água, dando início as reações químicas.

5.2.Tratamento a plasma com 15,5 kHz de frequência, 10 kV e 20 kV de tensão elétrica – avaliação microbiológica

A partir dos resultados obtidos com pulsos de tensão de 10 kV, observou-se que os tratamentos T1 e T3, mostraram-se ineficientes frente ao desenvolvimento dos fungos do gênero *Alternaria*, uma vez que após 24 horas de incubação já visualizava-se crescimento micelial nas placas. Os fungos foram totalmente inativados a partir de T9. A viabilidade fúngica foi determinada ao se observar o crescimento total no controle negativo (sem nenhum tipo de tratamento – 0,1 mL da suspensão à 5×10^3 conídios.mL⁻¹). O tratamento T Cl, mostrou-se eficiente frente ao fungo em estudo, não permitindo seu desenvolvimento; contudo o fungicida à base de quaternário de amônio, largamente utilizado nos *packing houses*, ainda permitiu o crescimento do fungo, mostrando-se ineficaz ao final dos dias de observações e contagens (Tabela 2).

Tabela 02 – Crescimento fúngico de *Alternaria* sp. após tratamento a plasma com 10 kV.

Tratamentos		24 horas UFC.mL ⁻¹	48 horas UFC.mL ⁻¹	72 horas UFC.mL ⁻¹	96 horas UFC.mL ⁻¹
1	Controle Negativo	37,66 ± 1,89 Bd	90,67 ± 4,53 Bc	158,00 ± 8,01 Ab	173,33 ± 8,65 Aa
2	T Cl	0,00 ± 0,00 Da	0,00 ± 0,00 Ea	0,00 ± 0,00 Da	0,00 ± 0,00 Da
3	T fungi	0,00 ± 0,00 Dd	9,67 ± 0,50 Dc	21,67 ± 1,10 Cb	34,33 ± 1,71 Ca
4	T1	52,00 ± 2,60 Ad	114,67 ± 5,73 Ac	155,67 ± 7,80 Ab	175,33 ± 8,67 Aa
5	T3	19,33 ± 0,95 Cd	42,67 ± 2,14 Cc	85,33 ± 4,26 Bb	150,33 ± 7,51 Ba
6	T9	0,00 ± 0,00 Da	0,00 ± 0,00 Ea	0,00 ± 0,00 Da	0,00 ± 0,00 Da
7	T15	0,00 ± 0,00 Da	0,00 ± 0,00 Ea	0,00 ± 0,00 Da	0,00 ± 0,00 Da

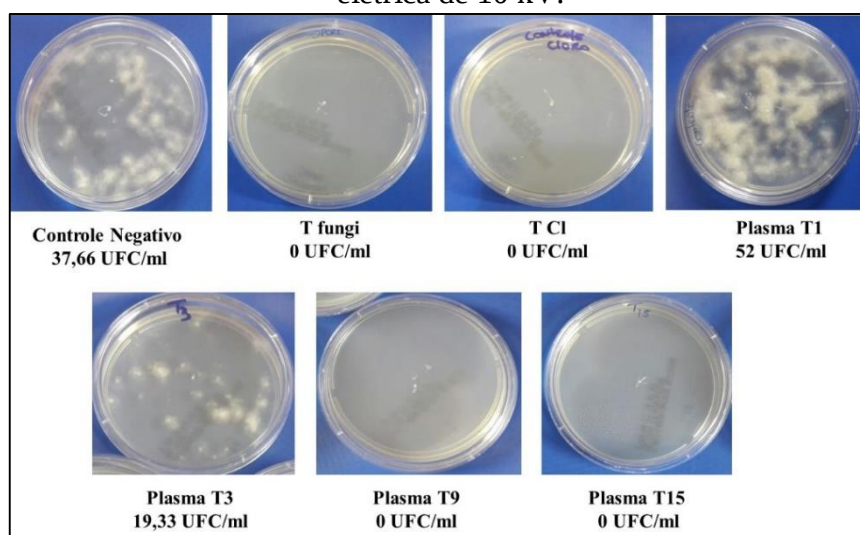
Médias das unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL⁻¹).

*Letras maiúsculas distintas nas colunas e minúsculas distintas nas linhas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: próprio autor.

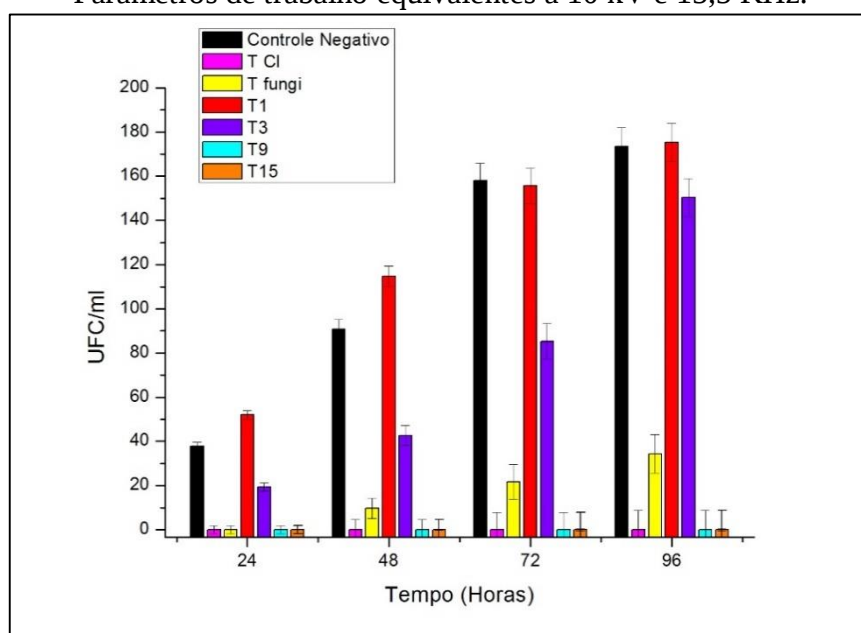
Durante os dias amostrais, foi observada uma tendência crescente nos resultados obtidos, havendo assim, diferenças estatísticas entre o controle negativo, T1 e T3. Com o passar dos dias amostrais, o crescimento fúngico seguiu aumentando nos tratamentos citados, demonstrando que estes não foram efetivos na inativação da *Alternaria* sp. Assim, pode-se indagar que, o tratamento a plasma sobre conídios de *Alternaria* sp. durante 9 e 15 minutos foi eficiente para descontaminação total até 96 horas de incubação.

Figura 13 – desenvolvimento *in vitro* do fungo *Alternaria* sp. após 24 horas de incubação, quantificadas as UFC's de acordo com os tratamentos a plasma com pulsos de tensão elétrica de 10 kV.



Fonte: próprio autor.

Figura 14 – crescimento fúngico observado durante os 5 dias de incubação em estufa BOD à $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em função do tempo de incubação e tratamentos realizados. Parâmetros de trabalho equivalentes a 10 kV e 15,5 KHz.



Fonte: autoria própria.

Após dobrar o pulso de tensão elétrica, de 10 para 20 kV, verificou-se que o plasma frio atmosférico, ao final dos dias de observação e contagem, foi capaz de inativar completamente os fungos do gênero *Alternaria* (*in vitro*) quando a exposição foi equivalente ou superior a 3 minutos (T3, T6, T9 e T15), ou seja, o aumento da densidade energética reduziu o tempo necessário para descontaminação.

T1 mostrou-se ineficiente frente ao desenvolvimento fúngico, uma vez que após 24 horas de incubação já foi possível visualizar crescimento micelial nas placas. A viabilidade fúngica foi determinada ao observar-se o crescimento fúngico no controle negativo (sem tratamento). O tratamento T Cl, mostrou-se eficiente frente aos fungos em estudo, não permitindo seu desenvolvimento ao final dos cinco dias de incubação a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa BOD (Tabela 3).

Tabela 03 – Crescimento fúngico de *Alternaria* sp. após tratamento a plasma com 20 kV.

Tratamentos	24 horas UFC.mL ⁻¹	48 horas UFC.mL ⁻¹	72 horas UFC.mL ⁻¹	96 horas UFC.mL ⁻¹
1 Controle Negativo	45,67 ± 2,29 Ad	95,33 ± 4,76 Ac	161,00 ± 8,05 Ab	176,67 ± 8,83Aa
2 T Cl	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca
3 T1	29,33 ± 1,46 Bd	61,67 ± 3,09 Bc	107,67 ± 5,38 Bb	152,67 ± 7,63 Ba
4 T3	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca
5 T6	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca
6 T9	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca
7 T15	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca	0,00 ± 0,00 Ca

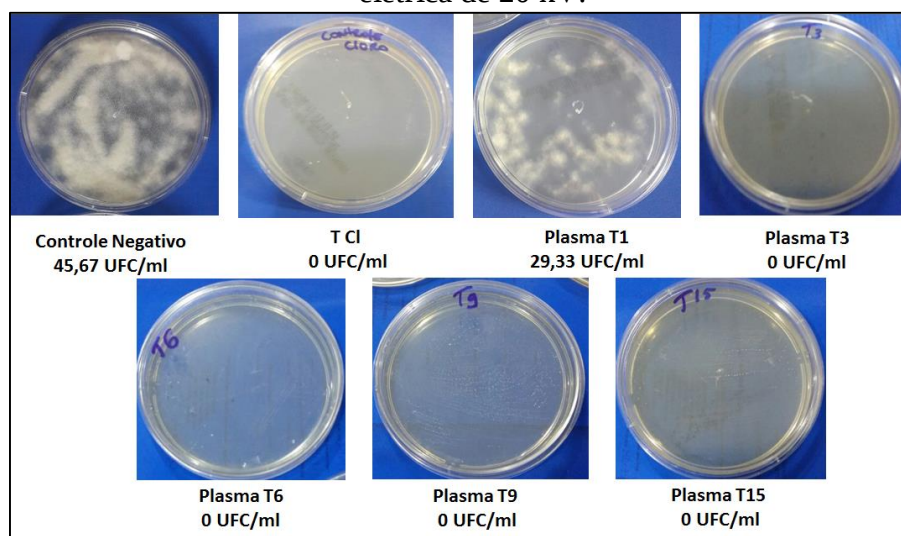
Médias das unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL⁻¹).

*Letras maiúsculas distintas nas colunas e minúsculas distintas nas linhas indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: autoria própria.

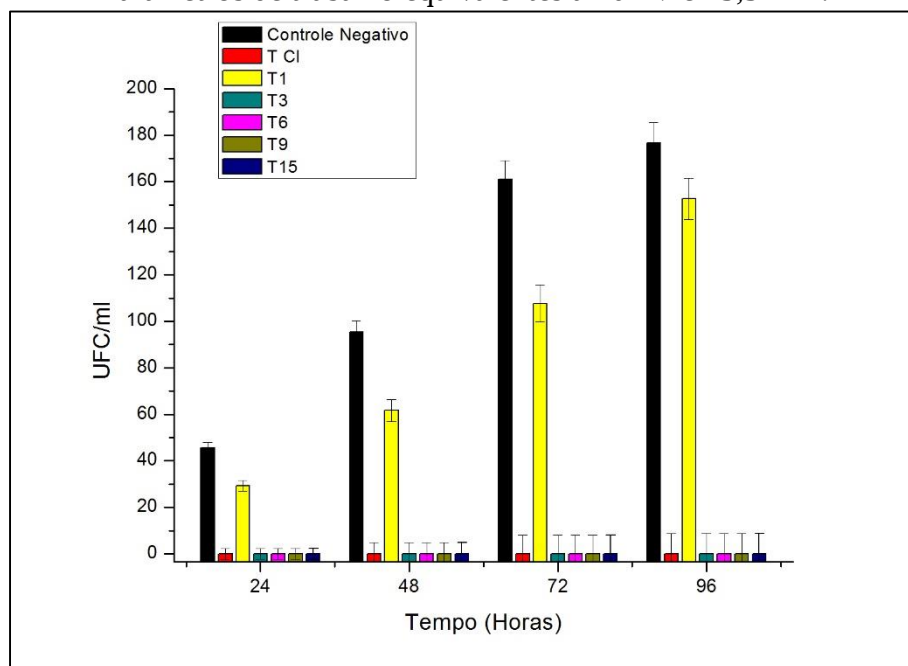
Quando avaliado o efeito antifúngico do plasma com pulsos elétricos de 20 kV, verificou-se uma tendência crescente nos resultados obtidos, havendo assim, diferenças estatísticas entre o controle negativo e T1, os quais mostram-se ineficientes frente ao desenvolvimento do fungo *Alternaria* sp.

Figura 15 – desenvolvimento *in vitro* do fungo *Alternaria* sp. após 24 horas de incubação, quantificadas as UFC's de acordo com os tratamentos a plasma com pulsos de tensão elétrica de 20 kV.



Fonte: autoria própria.

Figura 16 – crescimento fúngico observado durante os 5 dias de incubação em estufa BOD à $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em função do tempo de incubação e tratamentos realizados. Parâmetros de trabalho equivalentes a 20 kV e 15,5 kHz.

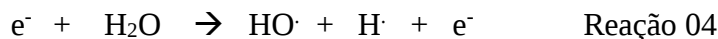
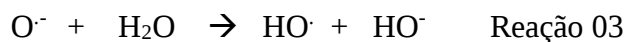
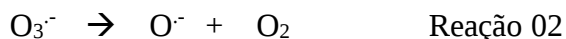
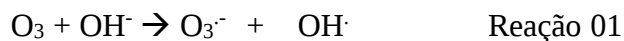


Fonte: autoria própria.

Alguns fatores são determinantes na inativação microbiana a plasma, tais como, tensão aplicada, modo de exposição à descarga, tipo de gás e tempo de tratamento (STOFFELS et al., 2008). Locke e Shih, (2011), afirmam que o plasma frio atmosférico em meio líquido proporciona uma homogeneização completa entre as espécies reativas e os microrganismos, fazendo com que todas as partículas e seres vivos interajam entre si. O autor defende que a química existente entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) tem várias consequências, sendo a mais importante, a reação de dissociação da água com os elétrons. As principais espécies instáveis oxidantes geradas em líquidos são a hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$) e o ozônio (O_3), de acordo com a reação 01.

No estudo utilizou-se plasma com configuração de descarga elétrica em alta voltagem em uma suspensão fúngica (meio líquido) o que pode ter intensificado as reações intra e intermoleculares entre o substrato (fungos) e as espécies reativas, proporcionando inibição do crescimento microbiano.

O plasma não-térmico atuando em meio líquido tem efeitos químicos no fluido, como formação de ozônio dissolvido na água, formação de radicais hidroxilas a partir do ozônio dissolvido na água, formação de hidroxilas a partir do impacto eletrônico no vapor d'água na interface e formação de hidroxilas via reação com radicais de oxigênio atômicos e excitados, de acordo com as reações 01, 02, 03 e 04 (DORS et al., 2006).

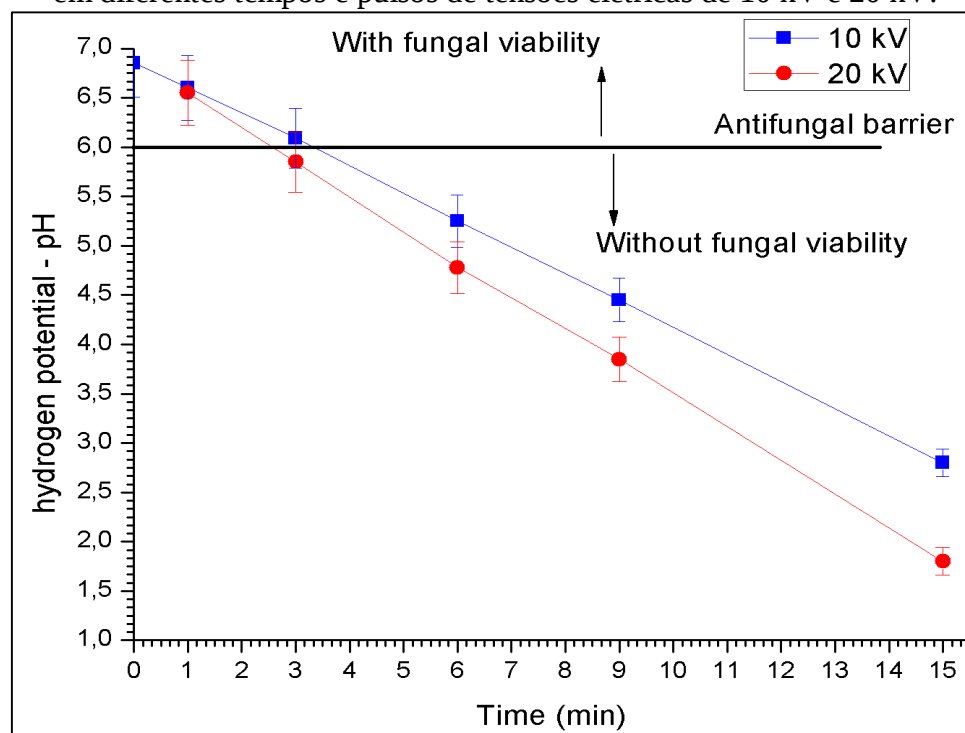


Jie et al., (2015), testou a aplicação de plasma em água visando inativação microbiana, os quais concluíram que partículas energéticas, como os elétrons, íons e as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são os principais responsáveis pela inativação. À medida que as reações acontecem na interface gás-líquido, as partículas energéticas são incorporadas pelas moléculas de água, dando início as reações químicas e formação das hidroxilas ($\text{OH}^\cdot$) e demais ROS e RNS.

Deste modo, atribui-se o efeito antifúngico do plasma frio à pressão atmosférica sob os fungos do gênero *Alternaria* às espécies reativas de oxigênio (ROS) e às espécies reativas de nitrogênio (RNS), mais especificamente, às hidroxilas ($\text{OH}^\cdot$), ao ozônio (O_3) e aos radicais de nitrogênio e oxigênio. Vale ressaltar que, juntamente com as hidroxilas e demais elementos reativos, conta-se também como relevante para inativação fúngica, a contribuição do peróxido de hidrogênio gerado, identificado através da espectroscopia de emissão óptica (OES), o elevado campo elétrico e radiação ultravioleta (UV), ou seja, os efeitos sinérgicos e não residuais da tecnologia de plasma.

No que tange ao pH da suspensão após exposição ao plasma, (10 kV e 15,5 kHz), percebe-se que há redução em função do tempo (Figura 17). Inicialmente a suspensão apresentava pH = 6,85 e ao final de T15, alcançou pH = 2,80. Contudo, aliado ao abaixamento do pH, verificou-se que a suspensão tratada a plasma, T15, aumentou o potencial de oxirredução, de 217 mV para 596 mV (Figura 18), indicando um ambiente oxidativo e inapropriado para a viabilidade fúngica, de acordo com Chyer et al. (2000). Tais efeitos podem estar associados ao fato do plasma promover as reações de dissociação das moléculas de água, liberando íons H^+ , justificando a redução do pH e produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), elevando o potencial oxidativo da suspensão fúngica. A hidroxila, o ozônio e os radicais de nitrogênio são apontados como os principais responsáveis pela inativação fúngica no tratamento a plasma frio atmosférico em meio líquido, uma vez que eles possuem elevados potenciais de oxidação (JIE et al., 2015).

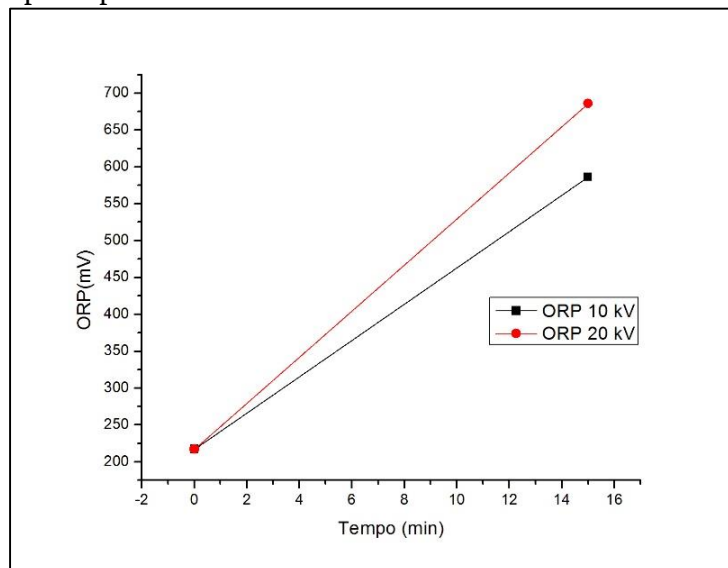
Figura 17 – comparação entre as reduções de pH ocasionadas pelo tratamento à plasma em diferentes tempos e pulsos de tensões elétricas de 10 kV e 20 kV.



Fonte: próprio autor.

Quando o pulso de tensão elétrica foi de 20 kV, verificou-se que houve uma redução intensa do pH. A suspensão possuía pH = 6,85 e finalizou o T15 apresentando pH = 1,83, a maior redução dos tratamentos (Figura 17). Esse rebaixamento brusco, é justificado pela maior densidade energética encontrada nos plasmas gerados com maiores tensões elétricas, os quais reagirão de modo mais intenso com o meio, gerando mais espécies reativas e oxidantes, justificando o maior efeito antifúngico para a maior tensão aplicada (DASAN, MUTLU; BOYACI, 2016). O potencial redox da suspensão sofreu elevação após interagir com o plasma de 20 kV. Inicialmente a solução apresentava 217 mV e ao final do T15, apresentou 686 mV, indicando um ambiente oxidativo para manutenção fúngica (Figura 18).

Figura 18 – potenciais redox ocasionados pelo tratamento à plasma em diferentes tempos e pulsos de tensões elétricas de 10 kV e 20 kV.



Fonte: próprio autor.

Muitos fungos são capazes de crescer em uma ampla faixa de pH, eles adaptam a expressão gênica ao pH de seu ambiente de crescimento e desenvolvem-se. Avaliar conídios de *Alternaria* sp. quanto a sensibilidade a pH's extremos é de grande interesse, principalmente quando as variações são oriundas de exposições ao plasma frio atmosférico. Os tratamentos evidenciaram que, para pH's abaixo de 6, não houve crescimento fúngico. Todos os tratamentos a plasma que reduziram o pH da suspensão abaixo de 6 obtiveram êxito total na descontaminação fúngica (Figura 17). Sánchez et al. (2001), também avaliaram o efeito do pH em fungos e concluíram que as menores taxas de crescimento são alcançadas em pH's entre 2,5 e 5,5. Enquanto taxas ótimas de crescimento variam de 6,5 a 8,5. Os fungos do gênero *Alternaria* no presente estudo foram sensíveis a pH's iguais ou equivalentes a 6, não apresentando taxas de crescimento fúngico. A redução do pH deu-se através do contato plasma-água, mostrando que a tecnologia tem alto potencial de transformação das propriedades físico-químicas de diversos fluidos e consequentemente, diversas aplicabilidades, em várias áreas.

Com a redução intensificada do potencial hidrogeniônico, pode-se afirmar que houve mais reações dissociativas das moléculas de água, gerando deste modo, uma maior quantidade de íons H^+ , espécies reativas de oxigênio (ROS – $OH^\cdot$, OH^- , $O^\cdot$, O^-) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Sendo as ROS consideradas as mais potentes oxidantes e

responsáveis pela inativação fúngica, em associação ao elevado campo elétrico gerado e radiação UV (SCHOLTZ et. al., 2015).

Deste modo, pode-se afirmar que o aumento da tensão elétrica foi responsável por maior efeito antifúngico e, conseqüentemente, maior inativação. Neste caso, a tensão elétrica foi dobrada e observou-se que a inativação foi mais efetiva, isto é, o plasma frio atmosférico com parâmetros de 20 kV e 15,5 kHz apresentou maior potencial de inativação para o fungo *Alternaria* sp.

A letalidade da tecnologia do plasma frio atmosférico depende de várias variáveis operacionais, entre as quais destaca-se a potência de entrada (tensão e frequência). Quanto maior a frequência e tensão de entrada, maior a inativação (DASAN, MUTLU; BOYACI, 2016).

Deng et al., (2009), testaram plasma não-térmico frente a microrganismos oriundos de amêndoas e utilizaram 20 kV e 25 kV, tendo reduções de 2,43 log e 4,12 log, respectivamente, enquanto que plasmas utilizando 16 kV levaram a reduções de apenas 1 log. Defende-se a ideia de que, maiores tensões elétricas produzem maior densidade energética e mais espécies reativas, proporcionando efeitos antimicrobianos mais intensos, corroborando com os resultados obtidos neste estudo.

Park et al., (2012), citam que os compostos clorados (cloro e organoclorados) são os meios mais utilizados na atualidade para a gestão e redução de microrganismos na água. Do experimento, percebeu-se que o tratamento T Cl foi capaz de inativar o fungo *Alternaria* sp. durante os dias de observação e contagem. Verificou-se que o tratamento T fungi não foi eficiente frente à inativação da *Alternaria* sp., ainda permitindo seu desenvolvimento ao final dos dias de observação. Deste modo, o sanitizante a base de cloro (dicloro isocianurato de sódio) mostrou-se eficiente para tal aplicação. Contudo, os compostos clorados possuem como grande desvantagem a alta potencialidade de poluir e deixar resíduos, onerando o meio ambiente no qual encontra-se inserido, bem como todos os seres envolvidos em sua manipulação.

Os métodos de desinfecção mais utilizados na atualidade para frutas e vegetais frescos são as soluções de cloro e sanitizantes químicos sintéticos, entretanto essas soluções podem deixar alguns resíduos nos alimentos e/ou não serem totalmente eficientes (PARK et al., 2008).

Os fungicidas utilizados nos *packings houses* são, predominantemente, à base de quaternários de amônio. Esses compostos são eficientes em situações bastante específicas, como em sistemas com pH's bem controlados. Cita-se como desvantagem, a

perda de eficiência antifúngica em meio ácido e o alto custo (NASCIMENTO et al., 2010).

Paralelamente aos métodos de esterilização convencionais, surge o plasma frio atmosférico ou não-térmico, o qual possui um grande potencial a ser desenvolvido na ciência dos alimentos, devido as suas características de alta eficiência e efeitos deletérios mínimos. A descontaminação por plasma frio atmosférico goza de vantagens como, baixas temperaturas operacionais, não produção de resíduos tóxicos, danos mínimos aos alimentos e baixo custo. Sua eficiência contra microrganismos é incontestável (HERTWIG et al., 2015).

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no estudo, pode-se afirmar que o plasma frio atmosférico, em meio líquido, inibe o crescimento do fungo *Alternaria* sp. nas condições elétricas experimentais de 10 kV e 15,5 kHz a partir de 9 minutos e, quando 20 kV e 15,5 KHz, a partir 3 minutos. O aumento dos pulsos de tensão elétrica de 10 para 20 kV reduziu o tempo necessário para descontaminar o fluido totalmente e inativar a *Alternaria* sp. portanto, o aumento da tensão elétrica intensificou o efeito antifúngico do plasma.

Observou-se que o cloro (dicloro isocianurato de sódio) na concentração de 400 ppm foi eficiente frente a cepa testada, contudo sua utilização oferece riscos.

Os resultados mostraram que o plasma frio atmosférico é capaz de modificar as propriedades físico-químicas da água, ao reduzir o potencial hidrogeniônico e elevar o potencial redox das suspensões.

A espectroscopia de emissão óptica (OES) apontou as principais espécies reativas presentes no plasma em estudo, foram identificadas RONS, as quais são apontadas como principais responsáveis pela inativação da *Alternaria* sp. e descontaminação da água. Junto das espécies em alto grau de instabilidade, o elevado campo elétrico gerado pelo CAP e radiação ultravioleta emitida (UV) também podem ter contribuído, sinergicamente, para os efeitos antifúngicos.

Assim, o plasma frio a pressão atmosférica em meio líquido, na configuração de descarga elétrica, poderá vir a ser uma alternativa de desinfestação em relação aos onerosos e insalubres sanitizantes químicos sintéticos, uma vez que o tratamento a plasma mostrou-se eficiente frente a fungos em estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, H. J., KIM, K. I., KIM, G., MOON, E., YANG, S. S., LEE, J. Atmospheric pressure plasma jet induces apoptosis involving mitochondria via generation of free radicals. **Plos One**. 6(11). 2011.
- ALKAWAREEK, M. Y., GORMAN, S. P., GRAHAM, W. G., GILMORE, B. F. Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 43(2), p 154-160. 2014.
- ALONSO-MONGE, R., ROMAN E., ARANA D. M., PLA J., NOMBELA C. Fungi sensing environmental stress. **Microbiol. Infect.** 15(1). 2009.
- ALVES JR, C. Nitretação a plasma – Fundamentos e aplicações. 1ª edição, Editora UFRN, Natal, RN. 2001.
- ARMITAGE, A.D., BARBARA, D.J., HARRISON, R.J., LANE, C.R., SREENIVASAPRASAD, S., WOODHALL, J.W., CLARKSON, J.P. Discrete lineages within *Alternaria alternata* species group: identification using new highly variable loci and support from morphological characters. **Fungal Biol.** 119, p 994 – 1006. 2015.
- BAIER, M., GEORGEN, M., EHLBECK, J., KNORR, D., HERPPICH, W.B., SCHLEUTER, O. Non-thermal atmospheric plasma: screening for gentle process conditions and antibacterial efficiency on perishable fresh produce. **Innovative Food Sci. Emerg. Technol.** 22, p 147 – 157. 2014.
- BEGGS, C. B. A quantitative method for evaluating the photoreactivation of ultraviolet damaged microorganisms. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 1(6), p 431-437. 2002.
- BERK, Z.. Thermal processing. In Z. Berk (Ed.), Food process engineering and technology. Academic Press. **Biophysical Journal**, 14(11), p 881 - 899. 2008.
- BOUDAM, M. K., MOISAN, M., SAOUDI, B., POPOVICI, C., GHERARDI, N., MASSINES, F. Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture. **Journal of Physics D-Applied Physics**, 39(16), p 3494 - 3507. 2006.
- CARVALHO, D.D.C., ALVES, E., CAMARGOS, R.B., OLIVEIRA, F.O., SCOLFORO, J.R.S., CARVALHO, D.A. BATISTA, T.R.S. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. **J. Iberoam. Micol.** 28, p 173 – 178. 2011.
- CASTENMILLER, J., FENWICK, R., LINDSAY, D., MAAT, J. European Technology Platform on Food for Life - Implementation Action Plan. **Confederation of the food and drink industry of UE (CIAA)**, 5 - 61. 2008.
- CHEN, N.J., MANENOI, A., PAULL, R.E., Papaya postharvest physiology and handling problems and solutions. **Acta Hort.** 740, p 285–293. 2007.

CHITARRA M.I.F; CHITARRA AB. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: UFLA. 785. 2005.

CHYER K., YEN-CON H., ROBERT E.B., Roles of Oxidation–Reduction Potential in Electrolyzed Oxidizing and Chemically Modified Water for the Inactivation of Food Related Pathogens. **Journal of Food Protection**. 63, p 19 – 24. 2000.

CSFAN. CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION (Usa). U. S. Food And Drug Administration. **Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies: Pulsed Electric Fields**. 2000. Disponível em: <<http://altered-states.net/barry/rife/pulsedelectricflds.htm>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

DANTAS, J. L. L.; OLIVEIRA, E. J.; PEREIRA, M. G.; CATTANEO, L. F. Melhoramento genético do mamoeiro no Brasil. In: SIMPÓSIO DO PAPAYA BRASILEIRO, 5., 2011, Porto Seguro. Inovação e sustentabilidade: anais. Porto Seguro: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 1 CD-ROM. PDF. P_2_3.

DASAN, B.G., MUTLU, M., BOYACI, I.H. Decontamination of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* spores on hazelnuts via atmospheric pressure fluidized bed plasma reactor. **Int. J. Food Microbiol.** 216, p 50 – 59. 2016.

DELIZA, R., ROSENTHAL, A., SILVA, A.L.S., Consumer attitude towards information on non conventional technology. **Trends in Food Science & Technology** 14(1-2), p 43-49. 2003.

DENG, S., RUAN, R., MOK, C. K., HUANG, G., LIN, X., & CHEN, P. DOBRYNIN, D., FRIDMAN, G., FRIEDMAN, G., & FRIDMAN, A. Inactivation of Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. **New Journal of Physics**, 11(11), p 115 - 120. 2009.

DORS, J.M., MIZERACZYK, Y.S. MOK, Phenol Oxidation in Aqueous Solution by Gas Phase Corona Discharge, **Journal of Advanced Oxidation Technologies**, 9, p 139-143, 2006.

ECKERT, J.W. Postharvest disease of fresh fruits and vegetables – etiology and control. In: Haard, N.F. & Salunkhe, D.K. (Eds.) **Postharvest biology and handling of fruits and vegetables**. Westport. The Avi. p 81 - 117. 1980.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds, *Phytopathology*, Saint Paul. 61, p 42 – 44. 1971.

EMBRAPA. **Polos de Produção de Mamão**. Cruz das Almas, BA. 47p. il.; 21 cm. – (Documentos/ Embrapa Mandioca e Fruticultura, 217). 2016.

FAVERET FILHO, P.; ORMOND, J.G.P.; PAULA S.R.L. Fruticultura brasileira: a busca de um modelo exportador. Brasília, DF: Banco Nacional de Desenvolvimento Social, 1998.

FERNANDEZ, A., NORIEGA, E., & THOMPSON, A. Inactivation of Salmonella entérica serovar Typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. **Food Microbiology**, 33(1), p 24 e 29. 2013.

FOLEGATTI, M.I.S.; MATSUURA, F.C.A.U. Mamão: Pós-colheita. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, (FAO). Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 10 de novembro de 2017.

FRIDMAN A, KENNEDY L. Plasma physics and engineering. New York: Taylor & Francis; 2004.

FRIDMAN, A. Plasma Chemistry. Cambridge University Press, New York. 2008.

FUENTES, G., SANTAMARÍA, J.M.. Papaya (*Carica papaya* L.): origin, domestication, and production. In: Ming, R., Moore, P.H. (Eds.), **Genetics and Genomics of Papaya**. Springer, New York, New York, NY, p 3 – 15. 2014.

GORBANEV, Y., O'CONNELL, D., CHECHIK, V. Non-Thermal plasma in contact with water: the origin of species, **Chem. Eur.** 22, p 3496 – 3505. 2016.

HERTWIG., C., REINEKE., K., EHLBECK., J., KNORR., D., SCHLUTER., O. Decontamination of whole black pepper using different cold atmospheric pressure plasma applications. **Food Control** 55, p 221 – 229. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, (IBGE). Produção Brasileira de Mamão, 2013. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 de novembro de 2017.

INSTITUTO CENTRO DE ENSINO TECNOLÓGICO (CENTEC). **Produtos de mamão**. 2 ed. Fortaleza: Edições Demócrito Rocha. p 72. 2004.

JAYASENA, D.D., KIM, H.J., YONG, H.I., PARK, S., KIM, K., CHOE, W., Jo, C. Flexible thin-layer dielectric barrier discharge plasma treatment of pork butt and beef loin: effects on pathogen inactivation and meat-quality attributes. **Food Microbiol.** 46, p 51 – 57. 2015.

JIE S., QIANG S., ZELONG Z., CHENG C., YAN L., HAO Z., ZIMU X., YING Z., WEIDONG X., PAUL K. C. Characteristics of DC Gas-Liquid Phase Atmospheric-Pressure Plasma and Bacteria Inactivation Mechanism. **Plasma Processes and Polymers**. 12. p 252 – 259, 2015.

KALGHATGI, S., KELLY, C.M., CERCHAR, E., TORABI, B., ALEKSEEV, O., et al. Effects of Non-Thermal Plasma on Mammalian Cells. *PLoS One*. 6, p 162 - 170. 2011.

KEIDAR, M., BEILIS, I.I.. Plasma Engineering: Applications from Aerospace to Bio- and Nanotechnology. New York: **Elsevier**, p 429. 2013.

KIM, B., YUN, H., JUNG, S., JUNG, Y., JUNG, H., CHOE, W., Jo, C. Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. **Food Microbiol.** 28, p 9 – 13. 2011.

KIM, H.J., YONG, H.I., PARK, S., KIM, K., CHOE, W., JO, C. Microbial safety and quality attributes of milk following treatment with atmospheric pressure encapsulated dielectric barrier discharge plasma. **Food Control.** 47, p 451 – 456. 2015.

KIM, J.-S., LEE, E.-J., CHOI, E.H., KIM, Y.-J. Inactivation of Staphylococcus aureus on the beef jerky by radio-frequency atmospheric pressure plasma discharge treatment. **Innovative Food Sci. Emerg. Technol.** 22, p 124 – 130. 2014.

KIMATI, H. Controle químico. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. & Amorim, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos.** Vol. 1. 3 ed. São Paulo, Editora Agrônômica Ceres. p 761 - 785. 1995.

LACOMBE, A., NIEMIRA, B.A., GURTNER, J.B., FAN, X., SITES, J., BOYD, G., CHEN, H., Atmospheric cold plasma inactivation of aerobic microorganisms on blueberries and effects on quality attributes. **Food Microbiol.** 46, p 479 – 484. 2015.

LIAO, X., LIU, D., XIANG, Q., AHN, J., CHEN, S., XINGQIAN Y., DING, T. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. **Food Control.** 75, p 83 - 91. 2017.

LIMA, R.C.A., LIMA, J.A.A., SOUZA JR, M.T., PIO-RIBEIRO, G.V., ANDRADE, G.P. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. **Fitopatologia.** 4. 2001.

LIU, D.X., LIU, Z.C., CHEN, C., YANG, A.J., LI, D., RONG, M.Z., CHEN H.L., KONG M.G. Aqueous reactive species induced by a surface air discharge: heterogeneous mass transfer and liquid chemistry pathways. 6. 2016.

LOCKE, B.R., SHIH, K.Y. Review of the methods to form hydrogen peroxide in electrical discharge plasma with liquid water. **Plasma Sources Sci. Technol.** 20 (3). 2011.

LUNA, J. V. U. Variedades de mamoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 12(134), p 14-18, 1986.

LUNOV, O., CHURPITA, O., ZABLOTSKII, V., DEYNEKA, I. G., MESHKOVSKII, I. K., JAEGER, A. Non-thermal plasma kills bacteria: Scanning electron microscopy observations. **Applied Physics Letters**, 106(5), 2015.

MENEZES, M. SILVA, D.M.W. **Guia prático para fungos fitopatogênicos.** Recife-PE: UFRPE, p 120. 1997.

MENTEN, J. O. M. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial da *Macrophomina phaseolina* in vitro. **Fitopatologia Brasileira, Brasília.** p 57 - 66, 1976.

- MIN, C. S., ROH, S. H., NIEMIRA, A.B., SITE, J. E., BOYD, G., LACOMBE, A. Dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma inhibits *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and Tulane virus in Romaine lettuce. **International Journal of Food Microbiology**. 237. p 114 - 120. 2016.
- MIR, S. A., SHAH, M. A., MIR, M. M. Understanding the role of plasma technology in food industry. **Food and Bioprocess Technology**, 9(5), p 734 - 750. 2016.
- MISRA, N., BOURKE, P., CULLEN, P. In-Package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. **School of Food Science and Environmental Health**. 125, p.131 – 138. 2014.
- MISRA, N.N., KADAM, S.U., PANKAJ, S.K. An overview of nonthermal technologies in food processing. **Indian Food Industry** 30 (5-6), p 45 - 52. 2011.
- MISRA, N.N, SCHLÜTER, O., CULLEN, P. J.. **Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications**. New York: Elsevier, 368. 2016.
- NASCIMENTO. H.M., DELGADO. D.A., BARBARIC. I.F. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. **Revista Ceciliana**. p 11 – 13. 2010.
- NOSENKO, T., SHIMIZU, T., MORFILL, G.E. Designing plasmas for chronic wound disinfection. **New J Phys** 11. 2009.
- OEHMIGEN, K., HÄHNEL, M., BRANDENBURG, R., WILKE, C., WELTMANN, K.D., et al. The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids. **Plasma Process Polym** 7. p 250 – 257. 2010.
- OLIVEIRA, J. R.; VIANNI, R. Efeito da aplicação do 1- MCP na pós-colheita do mamão “Golden”. In: Reunião de Pesquisa do Frutimamão, 2004, **Anais**. Campos de Goytacazes: UENF. p 317 - 323. 2004.
- OSTRY, V. Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. **World Mycotoxin J**.1, p 175 – 188. 2008.
- PARK, E. J., ALEXANDER, E., TAYLOR, G. A., COSTA, R., & KANG, D. H. Fate of food borne pathogens on green onions and tomatoes by electrolysed water. **Letters in Applied Microbiology**. 46, p 519 - 525. 2008.
- PASQUALI, F., STRATAKOS, A.C., KOIDIS, A., BERARDINELLI, A., CEVOLI, C., RAGNI, L., MANCUSI, R., MANFREDA, G., TREVISANI, M. 2016. Atmospheric cold plasma process for vegetable leaf decontamination: A feasibility study on radicchio (red chicory, *Cichorium intybus* L.). **Food Control**. 60, 552 – 559.
- REUTER, S., TRESP, H., WENDE, K., HAMMER, M.U., WINTER, J., et al. From RONS to ROS: Tailoring Plasma Jet Treatment of Skin Cells. **IEEE Trans Plasma Sci**. 40, p 2986 – 2993. 2012.

REZENDE, J. A. M., MARTINS, M.C. Doenças do Mamoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIN, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIM FILHO, A., CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia Doenças das Plantas Cultivadas**. 2. 2005.

SALE, A., & HAMILTON, W. A. Effects of high electric fields on microorganisms. I. Killing of Bacteria and Yeasts. **Biochimica ET Biophysica ACTA**, 148(3), p 781. 1967.

SALOMÃO, L. C.C., SIQUEIRA, D. L.; SANTOS, D., BORBA, A. N. **Cultivo do mamoeiro**. Viçosa ED UFV. p 73. 2007.

SÁNCHEZ, F., HONRUBIA, M., TORRES, P. Effects of pH, water stress and temperature on in vitro cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. **Mycol.** 22(4). p 243 – 258. 2001.

SCHOLTZ, V., PAZLAROVA, J., SOUSKOVA, H., KHUN, J., & JULAK, J.. Nonthermal plasma: A tool for decontamination and disinfection. **Biotechnology Advances**, 33(6), p 1108 - 1119. 2015.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F., ATANIWAKI, M. H., SANTOS, R.F.S., GOMES R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ª edição. São Paulo: Livraria Varela. 2007.

Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior (ALICE WEB). **Destinos das exportações brasileiras de mamão em 2016**. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br/menu/index/id/3>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

SONG, H.P., KIM, B., CHOE, J.H., JUNG, S., MOON, S.Y., CHOE, W., Jo, C. Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiol.** 26, p 432–436. 2009.

STOFFELS, E., SAKIYAMA, Y., GRAVES, D.B, Cold atmospheric plasma: charged species and their interactions with cells and tissues. **IEEE Trans. Plasma Sci.** 36 (4), p 1441 – 1457. 2008.

SUÁREZ-QUIROZ, M. L. Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos fitopatógenos de Papaya cv. Maradol (*Carica papaya* L.). **Revista Iberoamericana de Tecnología Post-cosecha, Hermosillo**, 14(2), p 115 – 124. 2013.

ŠVARCOVÁ, M., JULÁK, J., HUBKA, V., SOUŠKOVÁ, H., SCHOLTZ, V. **Treatment of a superficial mycosis by low-temperature plasma: a case report**. Prague Med Rep 2014.

TÖFOLI, J. G., DOMINGUES, R. J., FERRARI, J.T. *Alternaria* spp. em oleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas. **Biológico**, São Paulo. 77 (1), p 21 - 34. 2015.

TOZI, L.A. Análise do transporte aéreo como modal exportador de produtos perecíveis termicamente sensíveis: aplicação ao caso do mamão papaya brasileiro. 144f. **Doutorado**. Instituto Tecnológico de Aeronáutica, São José dos Campos. 2005.

TRONCOSO-ROJAS, R., TIZNADO-HERNÁNDEZ, M.E.. *Alternaria alternata* (Block rot, Black spot). In: Bautista-Banos, S. (Ed.), Postharvest Decay. **Academic Press**, p147 – 187. 2014.

VENTURA, J. A.; COSTA, H., TATAGIBA, J. S. Manejo das doenças no mamoeiro. In: Martins, D. dos S.; Costa, A. de F. S. (eds.) **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória, ES: Incaper, p 497. 2003.

VIANA, F. M. P. Queima-de-alternaria: nova doença foliar do mamoeiro no Brasil. **Summa Phytopathol.** 40(4), p 381 - 382. 2014.

VIVAS, M., SILVEIRA, S. F., PEREIRA, M. G., CARDOSO, D. L., FERREGUETTI, G. A. Análise dialética em mamoeiro para resistência a mancha-de-phoma. **Ciência Rural**, Santa Maria, 43(6), p 945 - 950. 2013.

VLAD, J.E., ANGHEL, S.D. Time stability of water activated by different on-liquid atmospheric pressure plasmas. **Journal of Electrostatics.** 87, p 284 – 292. 2017.

VUKUSIC, T., SHI, M., HERCEG, Z., ROGERS, S., ESIFAEI, P., SELMA, P., THAGARD, M. Liquid-phase electrical discharge plasmas with a silver electrode for inactivation of a pure culture of *Escherichia coli* in water. **Innovative Food Science and Emerging Technologies.** 2016.

WINTER, T., WINTER, J., POLAK, M., KUSCH, K., MAEDER, U., SIETMANN, R. Characterization of the global impact of low temperature gas plasma on vegetative microorganisms. **Proteomics**, 11(17), p 3518 - 3530. 2011.

XIONG, Z., DU, T., LU, X., CAO, Y., PAN, Y.. How deep can plasma penetrate into a biofilm. **Appl. Phys. Lett.** 98 (22). 2011.

YONG, H.I., KIM, H.J., PARK, S., ALAHAKOON, A.U., KIM, K., CHOE, W., Jo, C. Evaluation of pathogen inactivation on sliced cheese induced by encapsulated atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. **Food Microbiol.** 46, p 46 – 50. 2015a.

YONG, H.I., KIM, H.J., PARK, S., KIM, K., CHOE, W., YOO, S.J., Jo, C. Pathogen inactivation and quality changes in sliced cheddar cheese treated using flexible thin-layer dielectric barrier discharge plasma. **Food Res. Int.** 69, p 57 – 63. 2015b.

ZAMBOLIM, L., COSTA, H., VENTURA, J.A., VALE, F.X.R. Controle de doenças em pós-colheita de frutas tropicais. In: Zambolim, L. (Ed.) **Manejo integrado: fruteiras tropicais – doenças e pragas**. Viçosa. UFV. p 443 - 511. 2002.

ZERPA-CATANHO, D., ESQUIVEL, P., MORA-NEWCOMER, E., SÁENZ, M. V., HERRERA, R., JIMÉNEZA, V. M. Transcription analysis of softening-related genes during postharvest of papaya fruit (*Carica papaya* L. ‘Pococi’ hybrid). **Postharvest Biology and Technology.** 125. p 42 - 51. 2017.

ZIMMERMAN, U., PILWAT, G., RIEMANN, F. Dielectric-breakdown of cellmembranes. **Biophysical Journal**, 14(11), p 881 - 899. 1974.

ZIUZINA, D., HAN, L., CULLEN, P. J., BOURKE, P. Cold plasma inactivation of internalised bacteria and biofilms for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. **International of Food Microbiology**, 210, p 53 - 61. 2015.