



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

MAGDA JORDANA FERNANDES

**APLICAÇÃO DE PLASMA ATMOSFÉRICO EM DESCARGA POR BARREIRA
DIELÉTRICA PARA DESCONTAMINAÇÃO DE ÁGUA DE COCO**

MOSSORÓ

2020

MAGDA JORDANA FERNANDES

**APLICAÇÃO DE PLASMA ATMOSFÉRICO EM DESCARGA POR BARREIRA
DIELÉTRICA PARA DESCONTAMINAÇÃO DE ÁGUA DE COCO**

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

Linha de Pesquisa: Aplicações tecnológicas de
materiais regionais

Orientador: Clodomiro Alves Junior, Prof. Dr.

Co-orientador: Francisco Marlon Carneiro
Feijó, Prof. Dr.

MOSSORÓ

2020

© 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.

F363a Fernandes, Magda Jordana.

Aplicação de plasma atmosférico em descarga por barreira dielétrica para descontaminação de água de coco / Magda Jordana Fernandes. - 2020.
52 f. : il.

Orientador: Clodomiro Alves Junior.
Coorientador: Francisco Marlon Carneiro Feijó.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, 2020.

1. Plasma frio. 2. Descontaminação de alimentos. 3. Cocos nucifera L.. 4. Inativação microbiana. I. Alves Junior, Clodomiro, orient.
II. Feijó, Francisco Marlon Carneiro, co-orient.
III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

MAGDA JORDANA FERNANDES

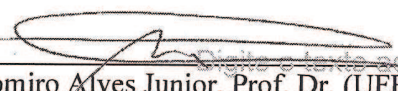
**APLICAÇÃO DE PLASMA ATMOSFÉRICO EM DESCARGA POR BARREIRA
DIELÉTRICA PARA DESCONTAMINAÇÃO DE ÁGUA DE COCO**

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

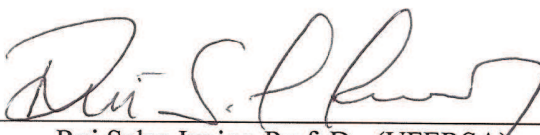
Linha de Pesquisa: Aplicações tecnológicas de
materiais regionais

Defendida em: 26 / 03 / 2020.

BANCA EXAMINADORA



Clodomiro Alves Junior, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente



Rui Sales Junior, Prof. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador



Francisco Marlon Carneiro Feijó, Prof. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amar de um modo que não posso compreender, e por me dar muito além do que mereço! Pelas bênçãos e sofrimentos ao longo dessa jornada. Por me permitir a realização de um sonho. Sem o Senhor, nada disso seria possível.

A meus pais, **Maria Lúcia e Júnior**, pela dedicação incansável de todos os dias, em dar sempre o melhor de vocês a mim. Sou grata por todo o amor expresso em cuidado. Espero um dia retribuir um pouco de tudo que sonharam e dedicaram a mim. E a minha irmã **Larissa**, por compartilhar da vida diária comigo. Amo vocês!!

Ao meu amor, **Vidal Neto**, pela compreensão e paciência diante dos meus estresses com a rotina sufocante. Obrigada por todo amor e cuidado. Pelos conselhos e incentivo em tudo que faço. Por cada momento alegre e descontraído, que me ajudaram a esquecer os problemas e me deram ânimo para continuar até o fim. Você é demais! Te amo.

Ao meu orientador, Prof. **Clodomiro Alves Júnior**, pela persistência em tudo que faz. Por ser um pesquisador exemplar. Pela forma de conduzir sua equipe de laboratório, estimulando o vínculo e ajuda mútua. Aprendi valores e reafirmei outros um pouco esquecidos. Obrigada pela ajuda e orientação no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu co-orientador, Prof. **Marlon Feijó**, pela paciência e prontidão em ajudar em tudo que se fez necessário. Pelo exemplo de dedicação e comprometimento com a pesquisa.

Ao amigo **Áleft Verlanger**, pelo incentivo para participar da seleção deste mestrado.

Aos colegas e amigos de mestrado, pelos momentos partilhados juntos, tanto com trabalhos e pesquisas, como momentos descontraídos de conversas nos corredores.

À equipe do **LabPlasma**, que foi uma família para mim durante esses dois anos. Mesmo tão diferentes, trabalhamos juntos e compartilhamos momentos descontraídos, que foram fundamentais para aguentar a jornada até o fim. A **Jussier**, que me acompanhou em todos os experimentos, ensinando sobre o plasma e dando ideias para o trabalho. A **Kristy**, pelo bom humor de sempre e pelas risadas que nos causava mesmo nos dias mais desesperadores. A **Rodrigo e Anne**, também sempre presentes nas manhãs ou tardes de trabalho e de lanches caprichados.

Em especial, às amigas **Liliane e Richelly**, que fizeram os dias pesados se tornarem mais leves, que ouviram meus desabafos, compartilharam do meu choro e desespero em dias de desânimo. E que me aconselharam a seguir, a sorrir. Obrigada por tudo. Amo vocês!

À equipe do **LAMIV**, em especial ao professor **Marlon Feijó** e ao técnico **Caio Sérgio**, pelos ensinamentos na área de microbiologia, que foi um mundo novo descoberto ao lado de

vocês. Obrigada pela paciência e ajuda em todos os experimentos desenvolvidos. Os momentos que estive no LAMIV foram muito especiais. Conheci pessoas incríveis e cresci também.

A **Leonardo**, técnico do Lab. de Processos Químicos, pela prontidão no auxílio a tantos detalhes que foram exigidos ao longo da pesquisa, e pelo esclarecimento de muitas dúvidas.

Ao técnico **Gustavo**, do Laboratório de alimentos, que pacientemente me ensinou a respeito de algumas técnicas e me ajudou no desenvolvimento de algumas análises.

A **Chagas**, técnico responsável pela administração da Fazenda Experimental da UFERSA na comunidade Alagoinha. Meu muito obrigada pelo acesso permitido às plantações, enquanto foi necessário.

Ao prof. **Rui Sales**, membro da banca examinadora, pelo convite aceito, e pela disposição em participar e dar contribuições para a presente pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram e comigo conviveram durante estes anos. A todos vocês, o meu muito obrigado!

Existem coisas melhores adiante do que
qualquer outra que deixamos para trás.

C. S. Lewis

RESUMO

Devido ao consumo crescente de água de coco em embalagens plásticas, e o risco de contaminação microbiana que isso traz, há a preocupação de utilizar etapas de descontaminação desta água durante o processo de envase. Sabendo-se das limitações e desvantagens dos processos térmicos convencionais, a tecnologia de plasma atmosférico vem sendo amplamente estudado como processo alternativo para descontaminação de alimentos, tanto sólidos como líquidos. Assim, no presente trabalho foi estudada a eficiência do plasma atmosférico na descontaminação da água de coco, em configuração de descarga por barreira dielétrica de superfície, usando ar atmosférico como gás de trabalho, a uma tensão de 10,3 kV e frequência de 4 kHz. Foram usadas cepas padrão de *Escherichia coli* e *Candida albicans* para testar a inativação das mesmas, inoculadas em água de coco e tratadas com tempos de 7,5 min, 15 min e 22,5 min. Também foram analisadas as concentrações de nitrito e nitrato, sódio e potássio, variações no pH, condutividade elétrica, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sólidos solúveis totais. Foi observado que, para o tempo de 22,5 min, *E. coli* sofreu inativação de 100%, e *C. albicans* de 90,3%. A espectroscopia de emissão óptica indicou forte presença de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio na faixa UV (300 a 400 nm), o que contribui para a inativação dos microrganismos. Variações físico-químicas mínimas foram observadas nas amostras tratadas a plasma, o que é positivo para o consumo da bebida. Esses resultados demonstram um caminho potencial para o desenvolvimento de tratamentos a plasma frio extremamente eficazes para preservar alimentos líquidos em geral, sendo necessária logística para aplicação em larga escala.

Palavras-chave: Plasma frio. Descontaminação de alimentos. *Cocos nucifera* L. Inativação microbiana.

ABSTRACT

Due to the increasing consumption of coconut water in plastic packaging, and the risk of microbial contamination, there is a concern to use decontamination steps of the coconut water during the industrial process. Knowing the limitations and disadvantages of conventional thermal processes, atmospheric plasma technology has been widely studied as an alternative process for solid or liquid food decontamination. Thus, in the present work, the efficiency of atmospheric plasma in coconut water decontamination was studied, in a surface dielectric barrier discharge configuration, using atmospheric air as the working gas, at a voltage of 10.3 kV and frequency of 4 kHz. Standard strains of *Escherichia coli* and *Candida albicans* were inoculated in coconut water and treated with times of 7.5 min, 15 min and 22.5 min, to test their inactivation. The concentrations of nitrite and nitrate, sodium and potassium, variations in pH, electrical conductivity, total soluble sugars, reducing sugars and total soluble solids were also analyzed. It was observed that, for the time of 22.5 min, *E. coli* had inactivation of 100%, and *C. albicans* of 90.3%. Optical emission spectroscopy indicated a strong presence of reactive nitrogen and oxygen species in the UV range (300 to 400 nm), which contributes to the inactivation of microorganisms. Minimal physical-chemical variations were observed in the plasma treated samples, which is positive for the consumption of the drink. These results demonstrate a potential path for the development of extremely effective cold plasma treatments to preserve liquid food in general, requiring logistics for large-scale application.

Keywords: Cold plasma. Food decontamination. *Cocos nucifera* L. Microbial inactivation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de processos de interação entre plasma e líquido, e compostos formados	17
Figura 2. Arranjos típicos de eletrodos para descarga por barreira dielétrica. (a) Planar com dielétrico em ambos eletrodos; (b) Planar com dielétrico em um eletrodo; (c) Planar com dielétrico no espaço de descarga; (d) Coplanar, com ambos eletrodos embutidos no dielétrico; (e) Descarga superficial, com um eletrodo no dielétrico.....	19
Figura 3. Principais compostos gerados pelo plasma e seus efeitos para a inativação de microrganismos	22
Figura 4. Esquema representativo do sistema de tratamento de água de coco por plasma DBD de superfície.....	31
Figura 5. Luminescência do plasma formado por DBD de superfície	31
Figura 6. Esquema representativo da diluição em série da água de coco para posterior contagem de microrganismos em placa	32
Figura 7. Espectro de emissão óptica do plasma DBD aplicado em água de coco, com fibra óptica uma distância de 0,5 cm do eletrodo de formação do plasma	36
Figura 8. Contagem de <i>E. coli</i> inoculada na água de coco, para diferentes tempos de tratamento por plasma DBD	37
Figura 9. Contagem de <i>C. albicans</i> inoculada na água de coco, para diferentes tempos de tratamento por plasma DBD	38
Figura 10. Concentrações de nitrito e nitrato na água de coco, para diferentes tempos de tratamento por plasma DBD	40
Figura 11. Variações de (a) condutividade elétrica e (b) pH na água de coco, para diferentes tempos de tratamento por plasma DBD.....	41
Figura 12. Concentração de íons (a) Sódio e (b) Potássio na água de coco, para diferentes tempos de tratamento por plasma DBD.....	42
Figura 13. Variações de AST, AR e SST na água de coco para diferentes tempos de tratamento por plasma	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos para água de coco em sua concentração natural, sem adição de água ou açúcares.....	26
Tabela 2. Parâmetros microbiológicos para água de coco in natura, sem adição de água ou açúcares	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 Plasma	15
3.1.1 Definição e fundamentos	15
3.1.2 Interação plasma - líquido	16
3.1.3 Plasma em descarga por barreira dielétrica (DBD).....	18
3.2 Técnicas de conservação de alimentos	19
3.2.1 Técnicas convencionais de conservação de alimentos	19
3.2.2 Plasma frio atmosférico como alternativa para tratamento de alimentos.....	20
3.3 Inativação de microrganismos por plasma frio atmosférico	21
3.3.1 Fotodesorção.....	23
3.3.2 Ataque químico	23
3.3.3 Disrupção eletrostática	23
3.3.4 Oxidação de macromoléculas.....	23
3.3.5 Difusão de espécies reativas	24
3.3.6 Danos ao DNA	24
3.4 Problemas de contaminação de água de coco por microrganismos	25
3.4.1 Água de coco	25
3.4.2 Contaminação de água de coco	26
4. METODOLOGIA	29
4.1 Extração e preparação das amostras	29
4.2 Preparação dos microrganismos	29
4.3 Aparato de aplicação de plasma	30

4.4	Análises microbiológicas	32
4.5	Espectroscopia de emissão óptica (OES)	33
4.6	Análises físico-químicas.....	33
4.6.1	Nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-)	33
4.6.2	pH e condutividade elétrica (CE)	33
4.6.3	Sódio (Na^+) e Potássio (K^+).....	34
4.6.4	Açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e sólidos solúveis totais (SST).....	34
4.7	Tratamento dos resultados e análise estatística	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Espectroscopia de emissão óptica (OES)	36
5.2	Análises microbiológicas	37
5.2.1	Inativação de <i>Escherichia coli</i>	37
5.2.2	Inativação de <i>Candida albicans</i>	38
5.3	Análises físico-químicas.....	39
5.3.1	Nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-)	39
5.3.2	pH e condutividade elétrica (CE)	40
5.3.3	Sódio (Na^+) e Potássio (K^+).....	42
5.3.4	Açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e sólidos solúveis totais (SST).....	43
6.	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

O plasma é formado através da aplicação de energia a um gás, para reorganizar a estrutura eletrônica das espécies (átomos, moléculas) e produzir espécies e íons excitados. Existem várias formas de energia para esta formação, incluindo calor, corrente elétrica ou radiação eletromagnética. Dentre os agentes formados durante a aplicação do plasma, tem-se por exemplo, ozônio (O₃), hidroxila (OH), espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), radiação UV, partículas carregadas. Vários tipos de fontes de plasma têm sido desenvolvidos para uma variedade de aplicações (CONRAD; SCHMIDT, 2000; EHLBECK *et al.*, 2011).

A descarga por barreira dielétrica (DBD) é uma das configurações de aplicação de plasma mais utilizadas. É gerada a partir de uma descarga de corrente elétrica entre dois eletrodos, separados por um material dielétrico sólido (plástico, vidro, etc) (SCHOLTZ *et al.*, 2015).

Está sendo cada vez mais difundida a aplicação de plasma atmosférico na área de alimentos, motivado pela sua eficácia recentemente comprovada sobre a inativação de microrganismos presentes nos mesmos. A combinação de vários agentes formados pelo plasma pode criar fatores de estresse para as células dos microrganismos, levando à morte celular e esterilizando os alimentos contaminados. Há três mecanismos básicos desencadeados pelo plasma que contribuem para a inativação microbiana: (a) interação química entre a superfície celular e os radicais, espécies reativas ou partículas carregadas; (b) dano à membrana celular e componentes internos, por UV; e (c) destruição de material genético através do UV formado durante a recombinação de espécies (MOISAN *et al.*, 2002; COUTINHO *et al.*, 2018).

Devido as interações comprovadas entre plasma e líquidos, e plasma com microrganismos, há estudos recentes com a aplicação de plasma em alimentos líquidos, como por exemplo: suco de maçã, suco de laranja, leite. Entre estes, se enquadra a água de coco, que é uma bebida tropical, comercializada *in natura* como também industrializada (KIM *et al.*, 2015; LIAO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018).

Apesar do consumo da água de coco diretamente no fruto ainda ser muito frequente, está sendo cada vez mais difundido o envasamento desta em recipientes plásticos, para que possa ser transportada e/ou armazenada refrigerada por várias horas antes do consumo. Durante o envasamento a água fica exposta no meio ambiente, com uma grande possibilidade de contaminação com bactérias patogênicas (AWUA; DOE; AGYARE, 2012).

O processo industrial pelo qual a água de coco passa para ser embalada, em algumas empresas conta com uma etapa de descontaminação, seja por esterilização, pasteurização ou outros, que são métodos baseados principalmente no aquecimento. Porém, algumas vezes, estes métodos causam efeitos negativos para os valores nutricionais, propriedades sensoriais ou físico-químicas do alimento (DAMAR; BALABAN; SIMS, 2009; SCHOLTZ *et al.*, 2015).

Diante desse cenário, tratamentos não-térmicos têm sido explorados como alternativas para garantir a qualidade de alimentos sem modificar as suas propriedades físico-químicas, nutricionais e sensoriais desejadas. Assim, o plasma frio atmosférico pode ser uma opção no processamento de alimentos, já que tem a garantia de manter a temperatura ambiente que a maioria dos produtos precisa, para evitar que algumas propriedades físico-químicas importantes sejam degradadas (SCHOLTZ *et al.*, 2015; BERISTAÍN-BAUZA *et al.*, 2018).

Deste modo, o objetivo da presente pesquisa foi investigar a eficiência do plasma atmosférico na descontaminação da água de coco, em configuração de DBD, analisando os efeitos causados em microrganismos (*Escherichia coli* e *Candida albicans*) inseridos na água de coco, e as possíveis variações nas propriedades físico-químicas da água de coco.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos do plasma frio atmosférico em configuração de DBD em agentes microbiológicos e nas propriedades físico-químicas da água de coco.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial de descontaminação da água de coco através do plasma, fazendo testes microbiológicos com *E. coli* e *C. albicans*;
- Investigar variações em propriedades físico-químicas da água de coco, com a aplicação do plasma DBD.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Plasma

3.1.1 Definição e fundamentos

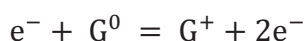
O termo ‘plasma’ foi usado pela primeira vez por Langmuir (1928) para designar oscilações observadas no gás ionizado, que ele considerou como uma região contendo cargas balanceadas de íons e elétrons. A grande maioria da matéria no universo se encontra em estado de plasma, como por exemplo os relâmpagos, a aurora boreal, e o interior de estrelas como o Sol (D’AGOSTINO *et al.*, 2005).

O plasma é gerado através da ionização de um gás puro ou mistura de gases, quando uma energia é aplicada a estes. A energia necessária para ionizar um determinado gás pode ser alimentada de qualquer fonte, como por exemplo, por aquecimento ou sujeito a campo eletromagnético (NIEMIRA, 2012; MISRA *et al.*, 2018; BERMUDEZ-AGUIRRE, 2020a).

Quando é aplicada uma diferença de potencial em um gás neutro entre dois eletrodos (cátodo e ânodo), é gerado um campo elétrico, que causa a aceleração de elétrons livres e íons carregados, os quais ganham energia cinética e colidem com outras moléculas, o que resulta em compartilhamento de energia, reações de deslocamento e trocas de carga, provocando assim a liberação de mais íons e elétrons, que mais uma vez são afetados pelo campo elétrico, colidindo com novas partículas, levando à ionização do gás (ALVES JR., 2001; GAVAHIAN *et al.*, 2018).

Isto causa a formação de várias espécies radicais. Estas criam o que é chamado de brilho no plasma. Entre estas espécies ativas estão: radiação UV, elétrons, prótons, nêutrons, radicais livres ativos e outros compostos, dependendo do gás de trabalho (NIEMIRA, 2012; PANKAJ; KEENER, 2017; MISRA *et al.*, 2018; BERMUDEZ-AGUIRRE, 2020a).

Esse efeito de ionização do gás é representado pela equação (HOWATSON, 1965):



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

G^{+} representa um íon deste gás;

e^{-} representa o elétron.

O plasma pode ser classificado em térmico e não-térmico com base no equilíbrio termodinâmico (FRIDMAN, 2008; SCHOLTZ *et al.*, 2015). No plasma térmico, a energia é suficientemente alta para que todas as partículas estejam em equilíbrio local e não transfiram energia entre si. Assim, a temperatura dos elétrons (T_e) é quase a mesma das partículas neutras pesadas (T_n) e a mesma do gás (T_g), onde a temperatura pode chegar a milhares de Kelvin. Como exemplos de plasmas térmicos, pode-se citar uma tocha de corte a plasma e o sol. No plasma não-térmico, há um desequilíbrio termodinâmico, onde os elétrons têm temperatura muito mais alta que as partículas mais pesadas ($T_e \gg T_n$) e que o gás total ($T_e \gg T_g$), onde as colisões não são tão frequentes (BÁRDOS; BARÁNKOVÁ, 2010; NIEMIRA, 2012; SCHLÜTER; FRÖHLING, 2014; SCHOLTZ *et al.*, 2015; LIAO *et al.*, 2017). Assim, a temperatura do plasma é relativamente baixa, gerando o que é chamado plasma frio; por isso, é considerada uma tecnologia não-térmica (BERMUDEZ-AGUIRRE, 2020a).

O plasma pode ser gerado em diferentes níveis de pressão, sendo estas em pressão superior à pressão atmosférica, à pressão atmosférica e a baixa pressão e vácuo. O plasma de pressão atmosférica é caracterizado como prático e barato por não necessitar de um sistema a vácuo, e é mais frequentemente gerado por descarga de corona, descarga por barreira dielétrica e jato de plasma (SCHLÜTER; FRÖHLING, 2014).

Os parâmetros de aplicação do plasma, como por exemplo: densidade de partículas carregadas (elétrons e íons) e sua distribuição de energia, temperaturas, potência, composição química, tipo de energia (corrente alternada, corrente contínua, pulsada, frequência, etc.), tipo de gás, duração do tratamento, níveis de umidade, devem ser projetados especificamente para uma determinada aplicação. A escolha da fonte de plasma e seu design específico dependem dos requisitos específicos de cada aplicação. As propriedades do plasma, como as espécies reativas formadas e sua concentração, variam de acordo com estes fatores a serem definidos previamente (CONRADTS; SCHMIDT, 2000; MISRA; JO, 2017; MISRA *et al.*, 2018).

No caso de aplicação de plasma em líquidos é preciso entender os processos básicos de interações das espécies reativas formadas no plasma com as partículas contidas no líquido.

3.1.2 Interação plasma - líquido

O plasma à pressão atmosférica, que produz gases parcialmente ionizados, contém variedades de radicais e espécies químicas ativas, como óxidos nítricos (NO_x e N_xO_y), O_3 , radicais OH, ROS, RNS, radiação UV e partículas carregadas, o que seria uma técnica de

descontaminação eficiente e alternativa para meios aquosos, como a água (THIYAGARAJAN; SARANI; GONZALES, 2013).

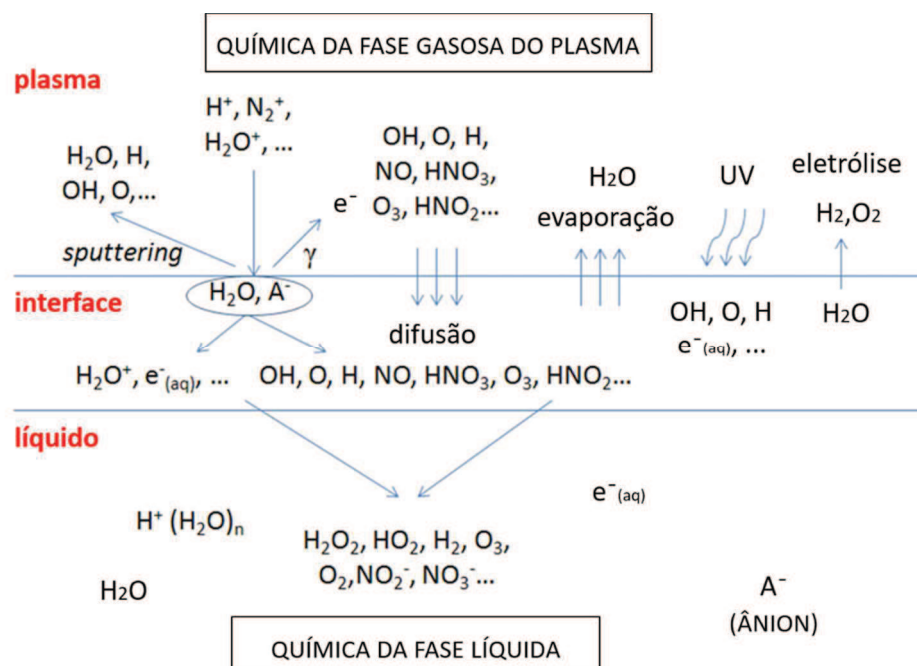
Devido à natureza dinâmica altamente complexa da interface plasma-líquido, a compreensão da interação plasma-líquido e a física associada são limitadas (BRUGGEMAN; LEYS, 2009).

De acordo com Samukawa *et al.* (2012), alguns processos de interação plasma-líquido dependem da polaridade (líquido atuando como cátodo ou como ânodo).

Conforme estudos de Bruggeman *et al.* (2016), radicais diferentes terão profundidades de penetração diferentes de acordo com a vida útil e, portanto, a espessura da camada interfacial pode variar para diferentes processos e espécies.

Assim, a Figura 1 mostra uma visão geral dos processos de interação principais entre o líquido e as espécies formadas pelo plasma, segundo descobertas de Samukawa *et al.* (2012).

Figura 1. Esquema representativo de processos de interação entre plasma e líquido, e compostos formados



Fonte: Adaptado de Samukawa *et al.* (2012).

Diante da aplicação de plasma em superfícies líquidas é importante ressaltar que existem diversas configurações de descargas elétricas para geração de plasma não-térmico, sendo as mais comuns: a descarga corona, a DBD, a descarga de micro-ondas e jato de plasma. Dentre estas, tem-se o DBD como uma das mais utilizadas (SCHOLTZ *et al.*, 2015).

3.1.3 Plasma em descarga por barreira dielétrica

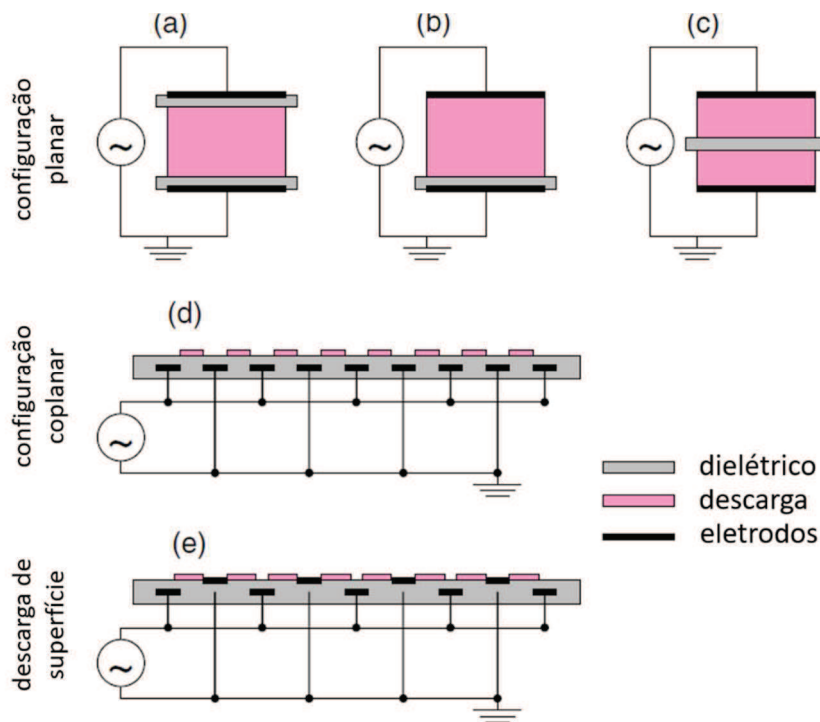
O plasma DBD, também conhecido como “descarga silenciosa”, normalmente é composto por dois eletrodos, um conectado a uma fonte de alta tensão e o outro aterrado (ARJUNAN; SHARMA; PTASINSKA, 2015). Um ou dois dos eletrodos são cobertos por algum material dielétrico, pelo qual praticamente não passa corrente elétrica, impedindo assim um arco elétrico (jato direto de elétrons), e facilitando a ionização do gás no espaço entre eletrodos. Micro-descargas conectam os eletrodos por um curto período de tempo e distribuem a carga elétrica na superfície do dielétrico (KUCHENBECKER *et al.*, 2009; MISRA *et al.*, 2019).

Os eletrodos do sistema DBD podem ser arranjados em uma configuração horizontal ou cilíndrica, e são separados por um pequeno espaço que é preenchido com um gás a pressão atmosférica. Uma alta voltagem é aplicada aos eletrodos e quando esta ultrapassa a energia de ionização do gás, o gás entre eletrodos é ionizado. São formados elétrons durante este processo, os quais reagem com as moléculas do gás, formando íons, espécies químicas ativas, radiação UV e calor (SCHLÜTER; FRÖHLING, 2014).

De acordo com as configurações de eletrodos e barreiras, pode-se fazer uma DBD ou uma descarga por barreira dielétrica de superfície (SDBD). As geometrias transformam um DBD em um modelo volumétrico de descarga, já o SDBD é limitado a uma superfície. Cada uma dessas configurações tem seu próprio design e méritos operacionais (MISRA *et al.*, 2019).

A Figura 2 apresenta alguns arranjos mais comuns para sistemas DBD horizontais, conforme Ehlbeck *et al.* (2011). O sistema DBD pode ser aplicado a materiais biológicos sem causar nenhum dano (KUCHENBECKER *et al.*, 2009), e já vem sendo amplamente utilizado na área de alimentos (KIM *et al.*, 2015; LIAO *et al.*, 2018).

Figura 2. Arranjos típicos de eletrodos para descarga por barreira dielétrica. (a) Planar com dielétrico em ambos eletrodos; (b) Planar com dielétrico em um eletrodo; (c) Planar com dielétrico no espaço de descarga; (d) Coplanar, com ambos eletrodos embutidos no dielétrico; (e) Descarga superficial, com um eletrodo no dielétrico



Fonte: Adaptado de Ehlbeck *et al.* (2011).

3.2 Técnicas de conservação de alimentos

3.2.1 Técnicas convencionais de conservação de alimentos

Surtos de infecção bacteriana patogênica e doenças relacionadas, como cólera e gastroenterite bacteriana são transmitidos através de alimentos e água ingeridos. Na maioria dos países, o maior risco de infecções bacterianas são provenientes de alimentos comercializados em beira de estrada e da manipulação incorreta de alimentos (AWUA; DOE; AGYARE, 2012).

As tecnologias de conservação de alimentos podem ser classificadas como térmicas e não térmicas, dependendo do uso ou não de calor. Alguns exemplos de tratamentos térmicos são aquecimento ôhmico, micro-ondas, radiofrequência, infravermelho e aquecimento indutivo (ALVES FILHO; DE BRITO; RODRIGUES, 2020).

Dependendo da intensidade, os processos térmicos são divididos em duas categorias: pasteurização e esterilização. A pasteurização ocorre a uma temperatura relativamente amena,

geralmente na faixa de 70 a 100 °C. Essa técnica consegue destruir células vegetativas dos microrganismos, mas tem pouco efeito nos esporos. A esterilização se dá em alta temperatura (acima de 100 °C), e com isso tem a finalidade de destruir todas as formas de microrganismos, incluindo esporos (BERK, 2018).

Esses tratamentos convencionais térmicos podem causar sérios efeitos colaterais no valor nutricional e nas qualidades sensoriais, como textura, dos alimentos (FRÍAS *et al.*, 2020), fazendo-se necessária a busca por processos alternativos. Várias tecnologias emergentes no processamento de alimentos inativam microrganismos por tratamentos físicos sem calor (RITTER *et al.*, 2018). Alguns exemplos de tratamentos não-térmicos são: alta pressão hidrostática, campos eletrificados pulsados, luz de alta intensidade, raios X pulsados, tecnologia de membrana, campos magnéticos oscilantes, ultrassom, ozônio e plasma (ALVES FILHO; DE BRITO; RODRIGUES, 2020).

A aplicação bem-sucedida de uma técnica não-térmica deve alcançar inativação microbiana eficaz e perda mínima de qualidade dos alimentos (LIAO *et al.*, 2018).

Dentre todas as tecnologias não-térmicas emergentes, o plasma frio atmosférico é uma intervenção relativamente nova para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos, eficaz em relação às tecnologias térmicas convencionais, para a inativação de microrganismos patogênicos e deteriorantes encontrados nos produtos alimentícios, devido a várias vantagens, como sua eficácia de inativação antimicrobiana, subprodutos não tóxicos, etc. (LIAO *et al.*, 2017, 2018; NIEMIRA, 2012; PANKAJ; KEENER, 2017).

3.2.2 Plasma frio atmosférico como alternativa para tratamento de alimentos

O plasma, enquanto tecnologia alternativa, apresenta muitas vantagens para a indústria de alimentos: não gasta água no processo, com resíduo mínimo ou nenhum; é acessível se comparado a outras tecnologias de descontaminação; não são necessários produtos químicos quando o ar atmosférico é usado como gás de trabalho; é fácil de operar; é não-térmico e não entra em contato com o alimento; e é considerada uma tecnologia verde (BERMUDEZ-AGUIRRE, 2020a).

O plasma frio, por ser gerado próximo à temperatura ambiente, não causa danos térmicos aos alimentos ou bactérias associadas (NIEMIRA, 2012). Além disso, os compostos formados pelo plasma desaparecem após o tratamento e possuem múltiplos mecanismos de inativação de células de microrganismos (FERNÁNDEZ; THOMPSON, 2012).

Estudos anteriores com o uso de plasma frio foram focados na descontaminação de alimentos sólidos, onde alguns autores sugerem que a inativação de microrganismos é mais fácil quando as células são depositadas em superfície sólida, e não dentro de um meio líquido, devido ao contato direto do microrganismo com as espécies ativas do plasma. No entanto, nos últimos anos, houve vários relatos de plasma frio usado para inativar microrganismos em alimentos líquidos (BERMUDEZ-AGUIRRE, 2020b).

Diversos alimentos líquidos, como sucos de uva, maçã, laranja, caju, romã ou tomate, leite e água de coco já foram tratados a plasma em diferentes configurações para verificação de variações em compostos físico-químicos e/ou inativação de alguns microrganismos patógenos específicos (BERMUDEZ-AGUIRRE, 2020b; DASAN; BOYACI, 2018; LIAO *et al.*, 2018; PANKAJ *et al.*, 2017).

Portanto, é importante entender como se desdobram alguns mecanismos do plasma atmosférico capazes de levar à inativação de microrganismos contaminantes de alimentos.

3.3 Inativação de microrganismos por plasma frio atmosférico

A inativação de bactérias por plasma em superfícies sólidas já é amplamente pesquisada, usando uma variedade de gases operacionais, principalmente Hélio ou Argônio; porém, ainda são limitadas as pesquisas sobre a inativação de bactérias em ambientes líquidos, usando plasma à pressão atmosférica, e particularmente usando ar atmosférico como gás de trabalho (THIYAGARAJAN; SARANI; GONZALES, 2013).

É difícil evitar a interação do plasma com líquidos em muitas aplicações de plasma a pressão atmosférica relacionadas à inativação de bactérias (TSCHANG; THOMA, 2020), pois os meios líquidos são parte fundamental do meio biológico, onde as duas principais aplicações de plasma em pesquisas biomédicas são: o pré-tratamento de meios líquidos aplicados a tecidos ou bactérias; e a exposição direta de amostras biológicas a jatos de plasma (GORBANEV; O'CONNELL; CHECHIK, 2016).

É válido ressaltar que, embora a maioria das espécies formadas por plasma possa interagir com os alimentos, uma grande parte delas também se recombina ou se difunde em fase líquida (GAVAHIAN *et al.*, 2018).

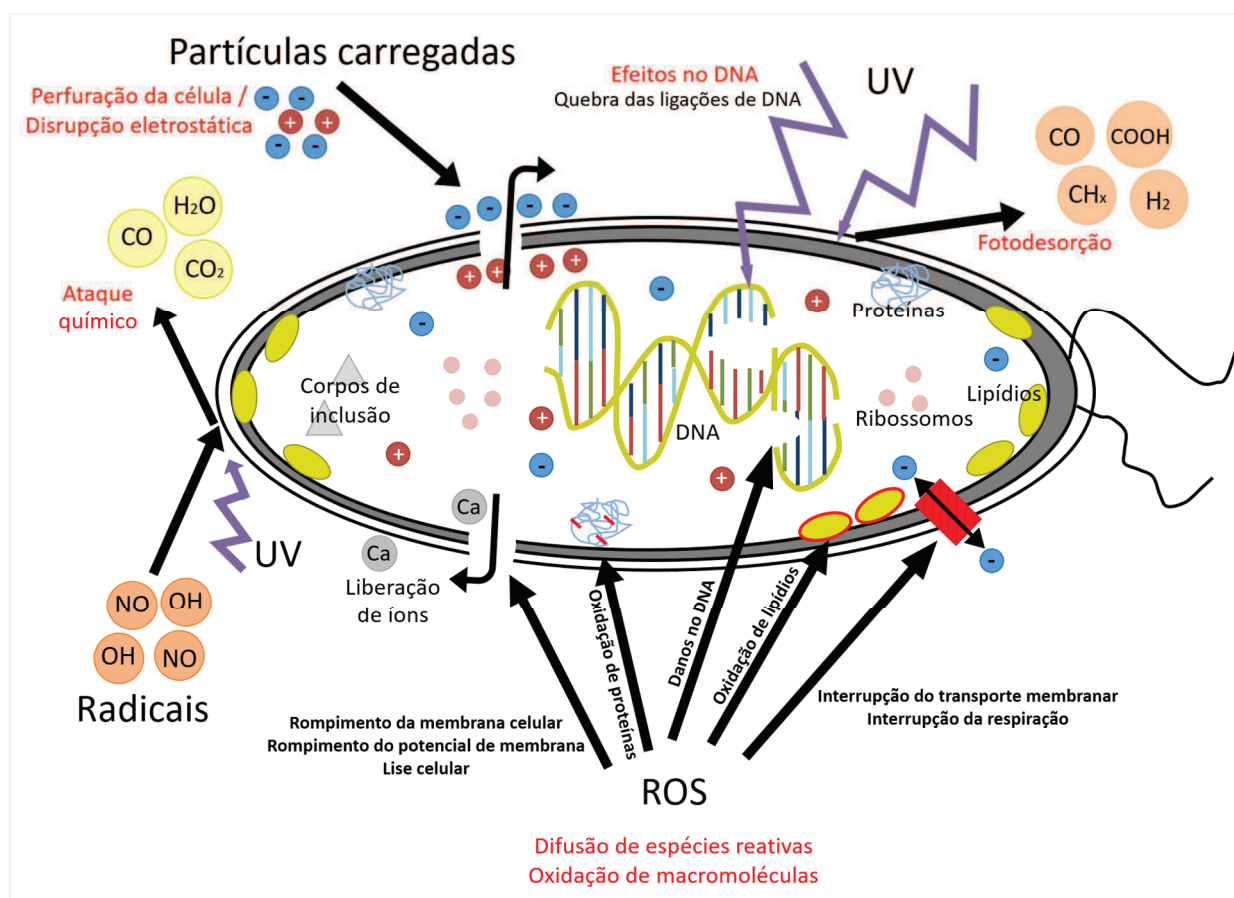
O principal efeito do plasma frio nas células bacterianas, fúngicas ou de esporos está relacionado à interação das espécies reativas do plasma com os componentes celulares, como membranas celulares ou revestimento de esporos (BERMUDEZ-AGUIRRE, 2020a). Entre as vantagens do plasma atmosférico estão a geração de espécies reativas à pressão atmosférica

sem equipamentos caros de vácuo, geração seletiva de espécies reativas a depender da escolha do gás de trabalho, geração eficiente de espécies reativas em ambientes líquidos e alta eficiência de inativação por parte dos radicais (LEE *et al.*, 2015).

A eficiência do plasma na inativação de microrganismos depende de vários fatores, como o tipo de fonte, mecanismo de geração do plasma, potência, densidade, gás utilizado, tipo de microrganismo a ser inativado, e o tipo de meio em que estão contidos (THIYAGARAJAN; SARANI; GONZALES, 2013).

Liao *et al.* (2017) mostraram que, conforme estudos anteriores, os mecanismos de inativação microbiana por plasma não-térmico têm efeitos biológicos e físicos (Figura 3). Embora o mecanismo não tenha sido totalmente compreendido até o momento, sabe-se que seus principais efeitos são devidos a: fotodesorção, erosão, ataque químico, perfuração da membrana, disrupção eletrostática, oxidação de macromoléculas, difusão de espécies reativas e efeitos danosos ao DNA (SCHLÜTER; FRÖHLING, 2014).

Figura 3. Principais compostos gerados pelo plasma e seus efeitos para a inativação de microrganismos



Fonte: Adaptado de Schlüter; Fröhling (2014).

Entender um pouco do princípio básico por trás dos principais aspectos se faz importante, para justificar a inativação de microrganismos que o plasma causa quando aplicado nos alimentos.

3.3.1 Fotodesorção

A fotodesorção intrínseca é uma desorção (retirada de compostos) induzida por fótons da irradiação UV, e leva à quebra de ligações químicas nos microrganismos e, em seguida, à formação de compostos voláteis, como CO e CH_x, a partir de átomos intrínsecos dos microrganismos. O que ocorre é uma espécie de erosão do microrganismo, átomo a átomo (MOISAN *et al.*, 2002; SCHLÜTER; FRÖHLING, 2014).

3.3.2 Ataque químico

Este processo se dá pelo bombardeio da membrana celular por radicais (OH ou NO), os quais sofrem reações químicas na superfície bacteriana. A erosão dos microrganismos átomo a átomo, através do ataque químico, forma compostos voláteis como resultado da combustão lenta usando átomos de oxigênio ou radicais que emanam do plasma. Os produtos voláteis formados incluem, por exemplo, CO₂ e H₂O. A taxa de inativação de microrganismos aumenta em alguns casos se o ataque for ativado por fótons UV, com estes agindo sinergicamente com as espécies reativas (MOISAN *et al.*, 2002; SCHLÜTER; FRÖHLING, 2014).

3.3.3 Disrupção eletrostática

Há um acúmulo de partículas carregadas geradas pelo plasma na superfície externa da membrana celular, quando algumas irregularidades produzem regiões com maior curvatura local, o que gera forças eletrostáticas. E estas, excedendo a resistência à tração da membrana, resultam em sua ruptura (SCHLÜTER; FRÖHLING, 2014; LIAO *et al.*, 2017; HERTWIG; MENESES; MATHYS, 2018).

3.3.4 Oxidação de macromoléculas

As ROS geradas por plasma reagem com macromoléculas celulares, como lipídios da membrana (no caso de bactérias gram-negativas), proteínas e DNA. Elas reagem com os

lipídios, talvez por serem as macromoléculas mais vulneráveis nas células, devido sua localização mais próxima da superfície celular. Esse dano oxidativo aos lipídios afeta sua capacidade de regular o transporte de massa para dentro e fora da célula, o que leva ao vazamento de macromoléculas internas para fora da célula. As ROS também causam oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos (SCHLÜTER; FRÖHLING, 2014; HERTWIG; MENESES; MATHYS, 2018; MISRA *et al.*, 2018).

3.3.5 Difusão de espécies reativas

Sugere-se que a camada espessa de polissacarídeos na superfície externa das células de bactérias Gram-positivas seja resistente a alterações físicas e químicas, mas é possível uma difusão de ROS na membrana. Chegando ao interior das células, as ROS podem reagir com materiais intracelulares, resultando em células comprometidas, levando à perda de cultivabilidade (células viáveis, mas não cultiváveis) ou morte celular (SCHLÜTER; FRÖHLING, 2014).

3.3.6 Danos ao DNA

A radiação UV, com fótons emitidos pelo plasma, é capaz de destruir o material genético dos microrganismos, quebrando as bases das fitas do DNA e impedindo assim a capacidade das células se replicarem. Porém, o efeito mais comprovado da emissão UV foi através de plasma a baixa pressão, enquanto o UV do plasma atmosférico tem efeitos mais reduzidos (MOISAN *et al.*, 2002; SCHLÜTER; FRÖHLING, 2014; HERTWIG; MENESES; MATHYS, 2018).

Conhecidos os processos fundamentais de inativação microbiana por plasma, segue-se na busca da aplicação cada vez mais segura do plasma frio atmosférico em alimentos, de forma a tê-los livres de contaminação, ideais para o consumo humano, sem compostos químicos indesejados, nem perda de qualidade físico-química ou sensorial. Nesse contexto, um dos alimentos líquidos mais ingeridos e que sofre com problemas de contaminação microbiana é a água de coco.

3.4 Problemas de contaminação de água de coco por microrganismos

3.4.1 Água de coco

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma das plantas mais utilizadas no mundo (OCHOA-VELASCO *et al.*, 2018). Em 2018, a quantidade produzida de coco no Brasil foi de 1.564.500 toneladas, das quais a região Nordeste é responsável por 1.114.359 toneladas, que corresponde a 71,23% (IBGE, 2018).

A água de coco é o endosperma líquido do coco-verde (ADUBOFUOR; AMOAH; OSEI-BONSU, 2016), sendo uma bebida nutritiva consumida por seu sabor e pela busca de inclusão de hábitos saudáveis por parte da população brasileira (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2011). É uma bebida rica em nutrientes, sendo composta de 93% de água, 5% de açúcares, além de pequenas frações de proteínas, vitaminas e sais minerais (JESUS *et al.*, 2018), sendo tratada como uma bebida isotônica natural, devido a seus eletrólitos, como sódio e potássio (DAMAR; BALABAN; SIMS, 2009).

Os constituintes nutricionais da água de coco presentes em maiores quantidades são os açúcares redutores (glicose e frutose), não-redutor (sacarose) e minerais. Em quantidades menores, estão as vitaminas hidrossolúveis, como ácido nicotínico, biotina, riboflavina, ácido fólico e ácido ascórbico (ou vitamina C) (AROUCHA; VIANNI, 2002). Entre os minerais, podem estar presentes o potássio, sódio, cálcio, fósforo, ferro, cobre, enxofre e cloreto, entre outros (KANNANGARA; CHANDRAJITH; RANAWEERA, 2018). Os teores de cada composto na água de coco variam muito, a depender do solo onde o coqueiro esteja plantado, estágio de maturação, entre outros fatores.

A Instrução Normativa nº 9, de 30 de janeiro de 2020 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estabelece características mínimas de qualidade para a água de coco, a qual deve ser submetida a processo tecnológico adequado que assegure sua apresentação e conservação até o momento do consumo (BRASIL, 2020), possuindo as características físico-químicas expressas na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos para água de coco em sua concentração natural, sem adição de água ou açúcares

Parâmetros	Mínimo	Máximo
Graduação alcoólica, em %, em v/v a 20 °C	-	0,5
pH	4,0	6,5
Sólidos solúveis, em Brix	4,0	29
Potássio, em mg/100 mL	140	230
Sódio, em mg/100 mL	2	30

Fonte: Brasil (2020).

É considerada um produto perecível, que deve ser processado adequadamente para ser direcionado com segurança aos consumidores, o que faz necessário a busca de novas alternativas para o seu processamento, no lugar dos tratamentos térmicos convencionais, para proporcionar ao consumidor um produto com prazo de validade estável, sem afetar suas propriedades sensoriais e nutricionais (OCHOA-VELASCO *et al.*, 2018).

Os cocos verdes, após colhidos, podem ser mantidos por um período de 15 dias sem deterioração, em condições ambiente, e estando o fruto não danificado, a água de coco permanece estéril e estável. Depois disso, a fermentação ocorre e a água de coco se torna imprópria para o consumo. Mas se a água é extraída do fruto, pode se tornar instável e se estragar em alguns dias, por causa da contaminação externa por microrganismos (REDDY; DAS; DAS, 2005; AWUA; DOE; AGYARE, 2011).

3.4.2 Contaminação de água de coco

A demanda por processamento de água de coco está aumentando, devido às suas propriedades naturais de reidratação, composição nutritiva, sabor único e crescente conscientização dos consumidores quanto aos efeitos deletérios à saúde de bebidas artificiais, como refrigerantes. A composição nutritiva da água de coco apresenta uma elevada sensibilidade ao crescimento microbiano e, portanto, um prazo de validade (de prateleira) muito curto (MAHNOT *et al.*, 2019).

A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em vigor até dezembro de 2020, dispõe sobre os padrões microbiológicos para alimentos. No caso da água de coco, são estabelecidos valores de

referência para coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. (BRASIL, 2001), conforme expresso na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros microbiológicos para água de coco *in natura*, sem adição de água ou açúcares

Microrganismos	Mínimo	Máximo
Coliformes a 45 °C	-	10 ² UFC/mL
<i>Salmonella</i> sp.	Ausente em 25 mL	

Fonte: Brasil (2001).

Estudo realizado por Silva *et al.* (2017a) em amostras de água de coco envasadas, provenientes do município de Aracaju - SE, mostrou a presença de microrganismos contaminantes. Silva *et al.* (2018) avaliaram a qualidade microbiológica da água de coco comercializada na cidade de Juazeiro do Norte - CE. Os resultados obtidos neste estudo indicaram que tanto em amostras industrializadas como em amostras não industrializadas foram detectadas a presença de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e *E. coli*, em aproximadamente 30% das amostras analisadas.

Posteriormente, Jesus *et al.* (2018) avaliaram amostras de água de coco comercializadas por ambulantes no município de Ouro Preto do Oeste - RO, através da análise de coliformes totais e termotolerantes, *Salmonella* sp. e bolores e levedura. Foi evidenciado que 75% das amostras analisadas estavam contaminadas com teores acima do permitido, sendo consideradas impróprias para o consumo humano.

Diante desse cenário, pode-se perceber a facilidade de contaminação da água de coco em diferentes ocasiões, sendo importante e necessário uma solução para reduzir ou eliminar esses contaminantes

A utilização do processamento térmico, método mais adotado atualmente pela indústria, é eficaz para matar microrganismos, mas altera as características nutritivas e de sabor da água de coco (MAHNOT *et al.*, 2019). Assim, pesquisadores vêm buscando estratégias não-térmicas para processar água de coco (DAMAR; BALABAN; SIMS, 2009; GAUTAM *et al.*, 2017; BERISTAÍN-BAUZA *et al.*, 2018; DONSINGHA; ASSATARAKUL, 2018; GABRIEL *et al.*, 2018). Dentre as tecnologias não-térmicas, se destaca o plasma frio atmosférico, como já descrito anteriormente.

No trabalho desenvolvido por Gabriel *et al.* (2016), com tratamento de água de coco por jato de plasma atmosférico gerado por micro-ondas, os resultados expressaram que o tratamento por plasma atmosférico pode ser usado como um método não-térmico alternativo para

descontaminar a água de coco, inativando as bactérias causadoras de deterioração e doenças. Recentemente, Mahnot *et al.* (2019) pesquisaram a respeito da aplicação de plasma atmosférico de alta voltagem por configuração DBD em água de coco, com foco na inativação de *Salmonella* sp. Os resultados permitiram concluir que a tecnologia de plasma atmosférico seria uma intervenção eficaz no processamento não térmico para a inativação microbiana na água de coco.

Mesmo com diversas pesquisas sobre aplicação de plasma frio atmosférico em microrganismos, seus mecanismos de ação ainda não são claros, impedindo seu maior desenvolvimento e aplicação mais intensa, o que faz necessário o desenvolvimento de estudos mais completos. Além disso, a tecnologia do plasma não-térmico também possui suas próprias limitações, como a distância de trabalho relativamente curta, baixa penetração de espécies reativas no alimento, etc. É importante a otimização dos dispositivos, condições e parâmetros operacionais. Quando esta interação do plasma com microrganismos e alimentos for mais esclarecida, essa tecnologia alcançará maior desenvolvimento e aplicação mais segura na indústria de alimentos (LIAO *et al.*, 2017).

4. METODOLOGIA

4.1 Extração e preparação das amostras

Foram coletados 6 cocos verdes com tempo de maturação na faixa de 6 a 8 meses, em plantação existente na Fazenda Experimental Rafael Fernandes, localizada na comunidade Alagoinha, Mossoró-RN.

Os frutos foram lavados com detergente neutro e água corrente, e sua superfície foi esterilizada com álcool 70 %. Depois, foram abertos com furador esterilizado de alumínio, sendo a água de coco extraída com ponteiros estéreis, e transferida para um béquer esterilizado, segundo metodologia adaptada de Awua; Doe; Agyare (2011); Silva *et al.* (2018).

Amostras de 80 mL da água de coco foram acondicionadas em potes plásticos estéreis e refrigeradas a 4 °C, para análises posteriores, as quais foram realizadas em triplicata. As amostras ficaram armazenadas em refrigeração durante cerca de 1 hora, antes das análises.

4.2 Preparação dos microrganismos

Foram realizadas análises microbiológicas, sendo as amostras contaminadas com *E. coli* e *C. albicans*, para verificar o efeito do tratamento por plasma em cada microrganismo separadamente, inoculado em água de coco. Além destas, foram separadas amostras controle de cada microrganismo, as quais não sofreram nenhum tipo de intervenção por tratamento a plasma ou outro tratamento.

A escolha dos microrganismos se deu devido *E. coli* ser um dos microrganismos patógenos mais representativos entre as bactérias. *C. albicans*, por sua vez, é uma levedura encontrada no microbioma humano normal, porém um sistema imunológico deficiente pode levar a quadros de infecção pela mesma, sendo assim patógena (LAURITA *et al.*, 2015). Tanto *E. coli* como bolores e levedura são análises comumente realizadas em alimentos para se detectar contaminação.

A preparação dos microrganismos utilizados, bem como as análises microbiológicas, foram executadas no Laboratório de Microbiologia Veterinária (LAMIV) da UFERSA-Mossoró, utilizando metodologia adaptada de Silva *et al.* (2017b), sendo realizadas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , em série, das amostras.

A esterilidade de cada amostra de água de coco extraída foi testada para verificação de presença de (i) coliformes totais, sendo aplicada a técnica do Número Mais Provável (NMP); e

de (ii) bolores e levedura, inoculando as diluições em ágar batata dextrose (BDA) + cloranfenicol.

Foram usadas as cepas padrão *E. coli* ATCC 25922 e *C. albicans* ATCC 10231, sendo estas reativadas a partir das culturas originais e postas em 3 mL de caldo infusão cérebro-coração (BHI) em tubos de ensaio com capacidade de 10 mL, a uma temperatura de 37 °C em estufa bacteriológica por 24h.

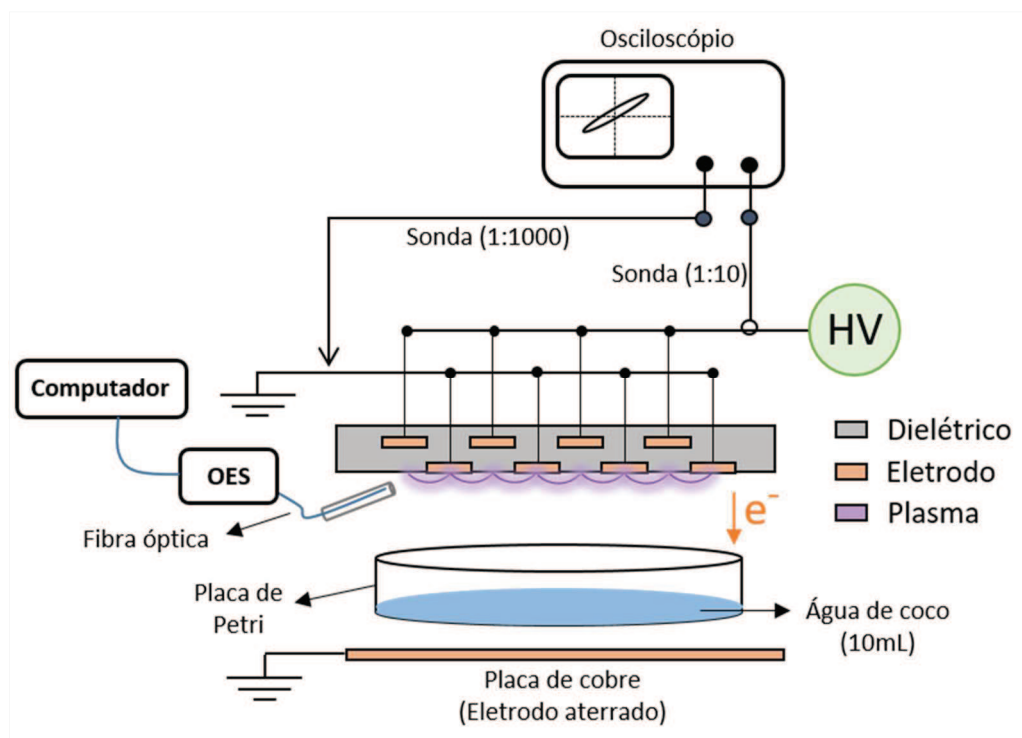
O inóculo padrão da bactéria e da levedura foram obtidos por segunda semeadura em caldo BHI na fase log (crescimento exponencial). Para a padronização da densidade inicial de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) utilizou-se a turbidez correspondente a 0,5 da escala de MacFarland, a qual está associada a uma faixa de absorbância de 0,08 a 0,1 u.a. (unidades de absorbância), em um comprimento de onda de 625 nm, adaptado de Machala *et al.* (2009). A absorbância foi verificada em um espectrofotômetro Biospectro SP-22, com o comprimento de onda citado.

4.3 Aparato de aplicação de plasma

O tratamento das amostras por plasma foi realizado no Laboratório de Plasma Aplicado (LabPlasma), UFERSA-Mossoró. O aparato experimental utilizado para geração do plasma atmosférico foi um sistema DBD. Este sistema foi projetado em configuração de descarga de superfície, com eletrodos incorporados no material dielétrico, conforme mostra a Figura 4.

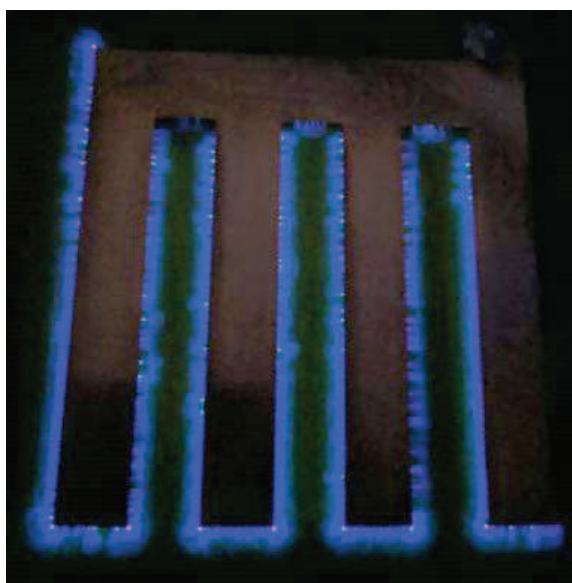
Um dos eletrodos é conectado a uma fonte de alta tensão DC pulsada, que para os tratamentos foi configurada com voltagem de 10,3 kV e frequência de 4 kHz; e o outro eletrodo é aterrado. Utilizou-se para isso um material dielétrico (fenolite) revestido com cobre (eletrodos). As amostras de água de coco, em volume de 10 mL, foram colocadas em uma placa de Petri com dimensões de 80 mm de diâmetro por 15 mm de altura (Figura 4).

Figura 4. Esquema representativo do sistema de tratamento de água de coco por plasma DBD de superfície



A Figura 5 mostra uma foto da luminescência emitida pelo plasma DBD gerado na superfície dos eletrodos.

Figura 5. Luminescência do plasma formado por DBD de superfície



As medidas elétricas de voltagem e frequência foram realizadas com uma sonda de alta voltagem (Agilent N2771B 1000:1), e todos os sinais foram exibidos e gravados por um osciloscópio digital Keysight DSO-X 2022-A.

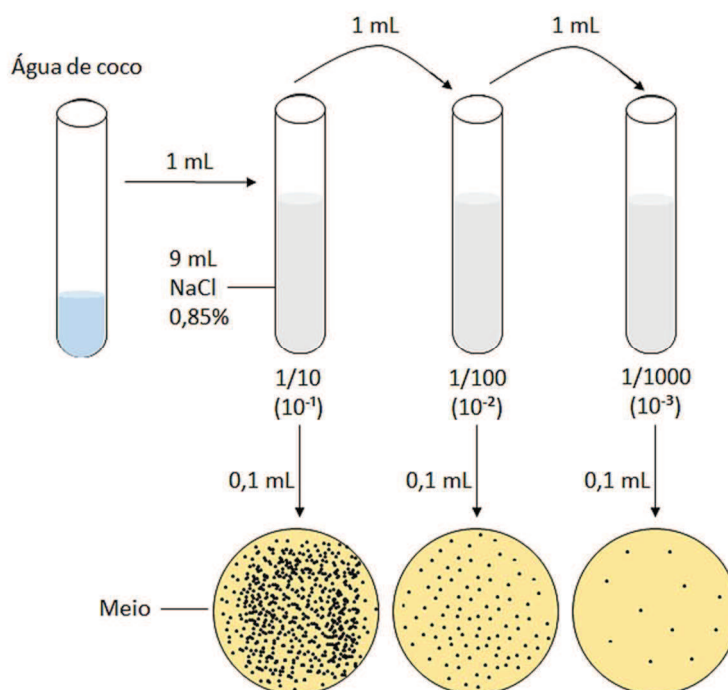
Foram feitos tratamentos nos tempos de 7,5 min, 15 min e 22,5 min, e ao término de cada um, as amostras foram recolocadas em potes plásticos estéreis e refrigeradas novamente a 4 °C, para análises posteriores.

4.4 Análises microbiológicas

As amostras contaminadas com os microrganismos (12 amostras por microrganismo, sendo 3 de cada tempo de tratamento e 3 de controle), após serem tratadas por plasma, seguiram para a análise para contagem das unidades formadoras de colônia (Figura 6).

Foram utilizadas as diluições em série feitas em 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , das amostras controle e tratadas, em tubos contendo 9 mL de solução salina (0,85% NaCl). De cada amostra diluída foram plaqueados 0,1 mL em placas de Petri contendo o meio de cultura apropriado ao crescimento de cada microrganismo.

Figura 6. Esquema representativo da diluição em série da água de coco para posterior contagem de microrganismos em placa



Os meios de cultura usados foram: (i) ágar EMB (Eosina Azul de Metileno) para *E. coli*; e (ii) ágar dextrose Saboraud para *C. albicans*. A contagem de microrganismos em placa foi feita em triplicata, de forma manual, após 24h de incubação para *E. coli* e 48h para *C. albicans*.

4.5 Espectroscopia de emissão óptica (OES)

Para verificação de espécies químicas formadas na superfície do eletrodo com a geração de plasma, foi realizado um diagnóstico do plasma por espectroscopia de emissão óptica (OES), utilizando um espectrômetro de emissão óptica Ocean Optics USB 4000 UV-VIS, de resolução óptica de 0,1 a 10 nm, ao qual foi acoplado um cabo de fibra óptica de sílica, 0,6 mm de diâmetro, e um detector Toshiba TCD1304AP com resposta óptica de 200 a 1100 nm. O cabo de fibra óptica foi aproximado do eletrodo de formação do plasma a uma distância de 0,5 cm.

4.6 Análises físico-químicas

No caso das análises físico-químicas, foram tratadas por plasma amostras não contaminadas, para se perceber apenas o efeito do tratamento na modificação das propriedades, sem interferência dos microrganismos.

4.6.1 Nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-)

A faixa de concentração de íons nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) presentes nas amostras foi identificada por tiras de teste semi-quantitativas Quantofix® Nitrato/Nitrito, Macherey-Nagel, que expressam um resultado rápido em 1 minuto, mergulhando-as diretamente na amostra, e comparando com uma faixa de cores contida na embalagem. O resultado é dado em mg/L.

4.6.2 pH e condutividade elétrica (CE)

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, mediante a utilização de um pHmetro de bancada Bel Engineering PHS3BW, conectado a um eletrodo de vidro Kasvi K38-1465, devidamente calibrado.

As medições de condutividade elétrica foram feitas através de um medidor portátil impermeável de CE/Resistividade/TDS/NaCl, Hanna HI98192, com resultados expressos em mS/cm.

4.6.3 Sódio (Na^+) e Potássio (K^+)

As leituras das concentrações de íons sódio (Na) e potássio (K) presentes nas amostras foram feitas através de fotometria de chama, por um fotômetro de chama Digimed DM-62, o qual faz as análises de ambos os elementos de forma simultânea, com gasto aproximado de volume de 2 mL da amostra. Foram usadas soluções padrões de concentração de 2, 4, 6, 8 e 10 ppm para curva de calibração.

4.6.4 Açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e sólidos solúveis totais (SST)

Os açúcares solúveis totais foram determinados pelo método da Antrona, conforme Yemm e Willis (1954). Utilizou-se 1g de amostra diluída em água destilada até 100mL, em seguida retirou-se uma alíquota de 100 μL , que foi colocada em um tubo de ensaio com 900 μL de água destilada. Após isso, os tubos foram postos em um banho de gelo, onde permaneceram enquanto se colocava 2 mL do reagente de antrona nos mesmos. Os tubos foram agitados, sempre voltando ao banho de gelo. Depois, foram levados para aquecimento em banho maria fervente, por 8 minutos. Por último, foram resfriados em banho de água gelada e foram feitas as leituras de absorbância em espectrofotômetro a 620 nm, sendo o resultado expresso em porcentagem (%).

A determinação dos açúcares redutores foi realizada com base no método Somogyi-Nelson (MALDONADE et al., 2013), onde uma alíquota de 1g de amostra foi diluída em água destilada até completar 100mL, depois foram inseridos em tubos de ensaio 100 μL da amostra diluída, 900 μL de água destilada e 500 μL de reagente cúprico. Os tubos foram postos em banho maria em ebulição por 20 minutos, sendo posteriormente resfriados em gelo. Em seguida, aos mesmos tubos foram adicionados 500 μL de reagente arseno-molibdico, e por último, 3,5 mL de água destilada. Depois, foram feitas as leituras de absorbância destas soluções em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 540 nm, sendo o resultado das análises expresso em porcentagem (%). A análise foi realizada em triplicata.

O teor de sólidos solúveis totais, que inclui os ácidos e os açúcares contidos na água de coco, teve as medidas determinadas pelo método refratométrico, em triplicata, usando um refratômetro digital de bolso, Atago PAL-1, com faixa de leitura de 0 a 53 %, volume de amostra gasto de 0,3 mL e tempo de leitura de 3 segundos. Os resultados são expressos em porcentagem (%) de grau Brix.

4.7 Tratamento dos resultados e análise estatística

Para o tratamento dos dados e a apresentação dos resultados através da geração de gráficos, utilizou-se o *software* OriginPro, versão 8.5.

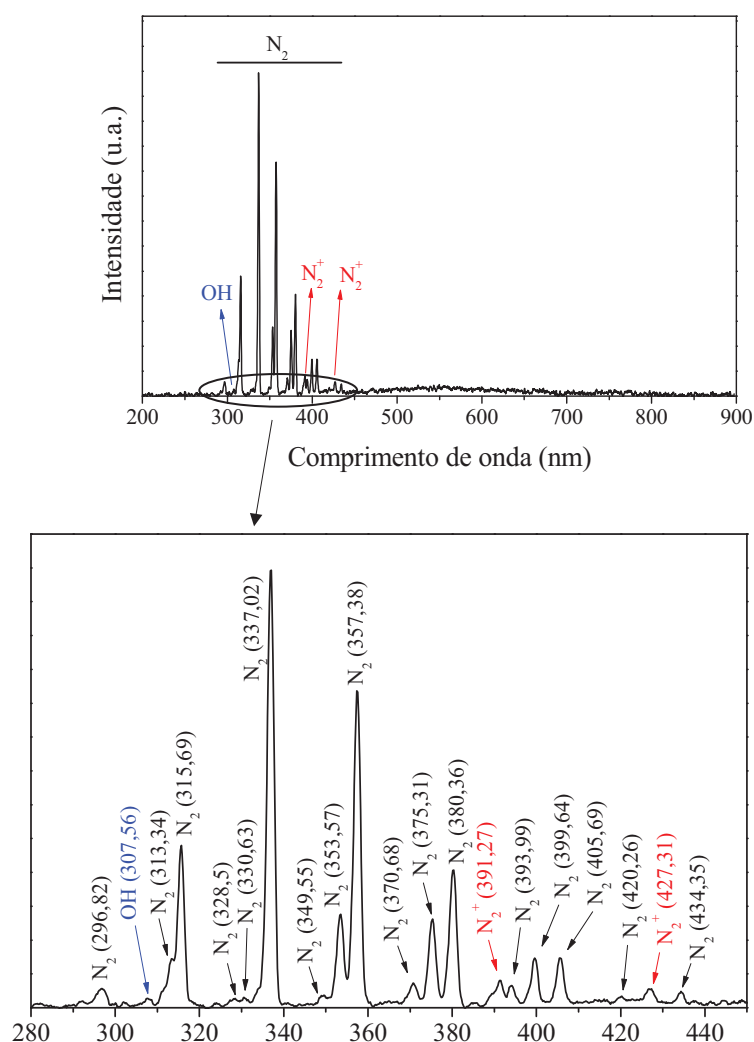
Com respeito à análise estatística, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de um fator. A comparação de médias se deu através do teste de Tukey, a um nível de significância de 5%, usando o *software* Statistica, versão 12. Foram considerados com diferença significativa os dados em que $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Espectroscopia de emissão óptica (OES)

O espectro de emissão óptica gerado pelo plasma atmosférico em sistema DBD é mostrado na Figura 7. Os picos de maior intensidade foram identificados próximo à região UV (300 – 400 nm), e representam algumas RNS (N_2 e N_2^+) e ROS (OH).

Figura 7. Espectro de emissão óptica do plasma DBD aplicado em água de coco, com fibra óptica uma distância de 0,5 cm do eletrodo de formação do plasma



Os estudos desenvolvidos por Qiu *et al.* (2007), Moutiq *et al.* (2020) e Ziuzina *et al.* (2020), com plasma DBD, gerado em ar atmosférico, obtiveram espectros de emissão óptica com picos de predominância de RNS, similares aos resultados encontrados no presente trabalho, as quais são conhecidas por oxidar membranas celulares, moléculas de proteínas e DNA, sendo

consideradas fundamentais para inativar microrganismos. E o OH também tem efeitos de descontaminação consideráveis (SOHBATZADEH *et al.*, 2016).

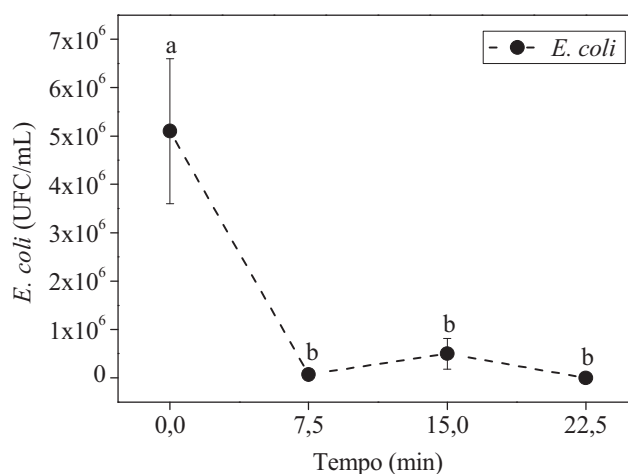
5.2 Análises microbiológicas

O teste realizado para verificação de presença de coliformes totais e de bolores e levedura nas amostras de água de coco extraídas dos frutos em laboratório, obteve resultado negativo para ambos, garantindo assim que a única contaminação nas amostras fosse a densidade de microrganismos inserida para os tratamentos, de *E. coli* e *C. albicans* separadamente.

5.2.1 Inativação de *Escherichia coli*

Após 24 horas de incubação, foi realizada a contagem de *E. coli* em placa, cujos resultados estão expressos na Figura 8, onde pode-se perceber uma redução do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL, entre cada tempo de tratamento comparado com o controle. Já os três tempos entre si não apresentaram diferença significativa. Do controle para o tempo de 7,5 min, a redução foi de 98,6 %, e de 100 % para o tempo de 22,5 min em relação ao controle.

Figura 8. Contagem de *E. coli* inoculada na água de coco, para diferentes tempos de tratamento por plasma DBD



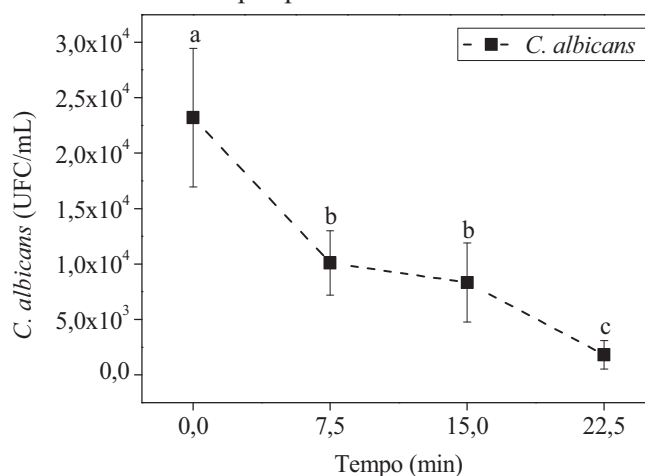
Nota: Letras diferentes representam valores que possuem diferença significativa ($p < 0,05$). Média para 3 repetições.

Diversos estudos já foram realizados utilizando plasma DBD para inativação de *E. coli* em alimentos líquidos. No estudo desenvolvido por Liao *et al.* (2018) com tratamento por plasma DBD em *E. coli* inoculada em suco de maçã, os resultados indicaram que durante o tratamento, a membrana celular da *E. coli* foi severamente danificada por espécies ativas produzidas pelo plasma, como peróxido de hidrogênio, ozônio e nitrato. Neste mesmo ano, pesquisas realizadas por Yannam *et al.* (2018), com aplicação de plasma DBD em suco de tangerina inoculado com *E. coli*, variando tensões, frequências de descarga e temperaturas das amostras. Nos parâmetros ideais encontrados pelos autores, de 30kV, 40Hz e 25 °C, *E. coli* obteve redução máxima dentro de 3 minutos. Os resultados também indicaram, através da microscopia eletrônica de varredura, alterações na morfologia celular após o tratamento, sugerindo que *E. coli* pode ser inativada por danos na parede celular causados por ondas de choque produzidas pelo plasma.

5.2.2 Inativação de *Candida albicans*

Os resultados da contagem de *C. albicans* em placa são mostrados na Figura 9. Os tempos de 7,5 min e 15 min não apresentaram diferença significativa entre si. Do controle para o tempo de 7,5 min, a inativação de *C. albicans* foi de 56,5%, enquanto, para o tempo de 22,5 min, foi de 90,3%.

Figura 9. Contagem de *C. albicans* inoculada na água de coco, para diferentes tempos de tratamento por plasma DBD



Nota: Letras diferentes representam valores que possuem diferença significativa ($p < 0,05$). Média para 3 repetições.

No trabalho desenvolvido por Kostov *et al.* (2015), foram testadas sete cepas diferentes de *C. albicans*, inoculadas em ágar e submetidas a diferentes tempos de aplicação de jato de plasma com gás Hélio. Foi comprovada a eficácia das espécies reativas geradas no plasma, para a inativação deste fungo, através de zonas de inibição medidas em placas de Petri.

A diferença entre o aparato de plasma adotado por Kostov *et al.* (2015) e o plasma DBD do presente trabalho é que o jato de plasma, induzido por um fluxo de gás inerte, além de ser mais pontual e alcançar uma área muito restrita de amostra, tem um gasto maior, devido ao custo de uso do gás utilizado. Já o plasma DBD abrange uma superfície maior de tratamento, e economiza, utilizando o próprio ar atmosférico para gerar o plasma.

Com a extensão do tempo de tratamento, a taxa de diminuição do número de *E. coli* viáveis foi maior e, em seguida, de *C. albicans*. O motivo pode ser explicado pelas diferentes estruturas da parede celular. *C. albicans* é um fungo unicelular cuja parede celular é composta por uma estrutura de quatro estratos, com microfibras de quitina como estrato interno, depois proteína, glicoproteína e aminoglicosídeo como estrato externo. Sua parede celular é mais compacta comparada com *E. coli*, que é uma bactéria gram-negativa, e possui parede celular com uma camada de peptidoglicano, lipoproteínas, lipopolissacarídeos, e uma membrana externa. Portanto, *E. coli* é o microrganismo mais suscetível deste trabalho ao tratamento com plasma atmosférico, enquanto *C. albicans* é o menos suscetível (SHI *et al.*, 2011).

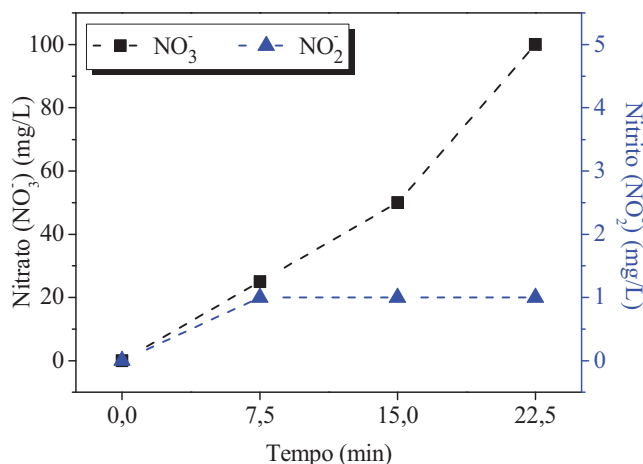
Os alvos potenciais nas células fúngicas incluem a parede celular, a membrana plasmática, ribossomos, RNA, DNA e proteínas estruturais e funcionais. A destruição celular pelo plasma ocorre se os níveis de exposição excederem a capacidade dos sistemas de defesa celular, afetando as muitas macromoléculas dentro da célula, incluindo DNA, proteínas e lipídios. Um dos mecanismos mais importantes são as lesões de DNA por indução de quebras no DNA. Outro mecanismo é a peroxidação lipídica (SOHBATZADEH *et al.*, 2016).

5.3 Análises físico-químicas

5.3.1 Nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-)

Os resultados das concentrações de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) para os diferentes tempos de tratamento por plasma estão expressos na Figura 10. Nas amostras não tratadas, pode-se perceber a ausência de ambos os íons, confirmando que estes são formados após a aplicação do plasma. Os teores de NO_3^- na água de coco se intensificam conforme o tempo de tratamento aumenta, enquanto o teor de NO_2^- permanece inalterado com o aumento dos tempos.

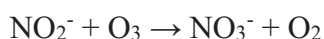
Figura 10. Concentrações de nitrito e nitrato na água de coco, para diferentes tempos de tratamento por plasma DBD



As medições semi-quantitativas de espécies reativas representam uma ferramenta de medição rápida e menos sofisticada, com baixa precisão, mas em todos os casos considerados no trabalho desenvolvido por Laurita *et al.* (2015), as concentrações medidas com métodos quantitativos se enquadraram dentro da faixa medida pelas tiras.

Estudos mostram que o nitrito age sinergicamente com o peróxido de hidrogênio também gerado pelo plasma, induzindo a morte celular de alguns fungos e bactérias (NAÏTALI *et al.*, 2010; LAURITA *et al.*, 2015).

A concentração relativamente alta de nitrato em comparação com o nitrito pode ser explicada pela decomposição moderadamente rápida do ozônio em contato com o nitrito (TSCHANG; THOMA, 2020):



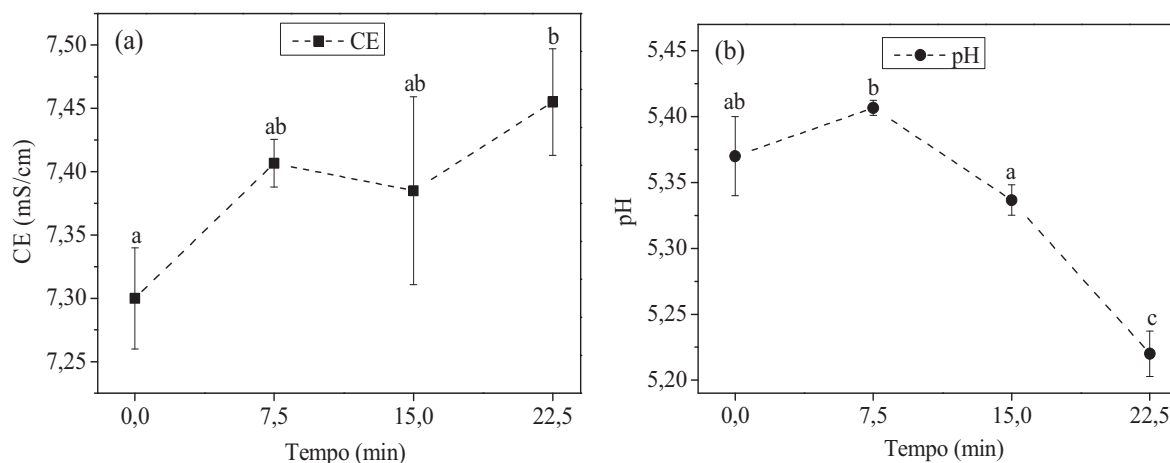
A produção de nitrito e nitrato na água de coco deve ser controlada para se evitar o risco potencial à saúde. Nesse caso, os níveis mais altos produzidos na água de coco neste trabalho foram: 100 mg/L de nitrato e 1 mg/L de nitrito. O consumo diário aceitável para nitrato é o máximo de 3,7 mg/kg do indivíduo, enquanto de nitrito o máximo é de 0,07 mg/kg (FAO; WHO, 2002).

5.3.2 pH e condutividade elétrica (CE)

As variações de pH e condutividade elétrica induzidas pelo tratamento a plasma em diferentes tempos estão expressas na Figura 11. Uma leve acidificação (redução de pH) e

aumento da condutividade foram causados pelo tratamento por plasma, e intensificados à medida que o tempo de tratamento era maior.

Figura 11. Variações de (a) condutividade elétrica e (b) pH na água de coco, para diferentes tempos de tratamento por plasma DBD



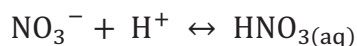
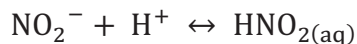
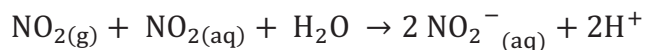
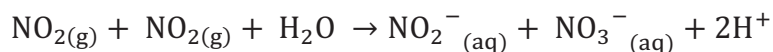
Nota: Letras diferentes representam valores que possuem diferença significativa ($p < 0,05$). Média para 3 repetições.

O valor de pH da água de coco após o processamento por plasma reduziu, após 22,5 min de tratamento, de 5,37 para 5,22, o que representa uma redução de 2,8% em relação ao controle. Os valores de pH das amostras tratadas a 7,5 min e a 15 min não foram estatisticamente diferentes da amostra não tratada. As médias de pH estão dentro da faixa esperada para água de coco processada industrialmente para consumo (4,0 a 6,5) (BRASIL, 2020).

A condutividade elétrica aumentou, após 22,5 min de tratamento, de 7,30 mS/cm para 7,46 mS/cm, o que representa um acréscimo de 2,1% em relação ao controle. As amostras tratadas a 7,5 min e a 15 min não foram estatisticamente diferentes da amostra não tratada.

No trabalho desenvolvido por Pankaj *et al.* (2017), com plasma DBD aplicado em suco de uva branca, o aumento da condutividade elétrica observado para o tratamento a 80 kV por 4 min, pode ser explicado pela solubilização das espécies reativas geradas durante a descarga de formação do plasma. Já a amostra tratada pelos autores por pasteurização não teve variação significativa em relação ao controle.

Na interface plasma-líquido, as espécies neutras do plasma reagem com o líquido e levam à formação de concentrações baixas de ácidos, como ácido nitroso (HNO_2) e ácido nítrico (HNO_3), diminuindo assim o pH do meio líquido (PERINBAN; ORSAT; RAGHAVAN, 2019; WAN *et al.*, 2019). A formação dos ácidos ocorre a partir da dissolução em água de espécies N_xO_y formadas na fase gasosa (MOUTIQ *et al.*, 2020):



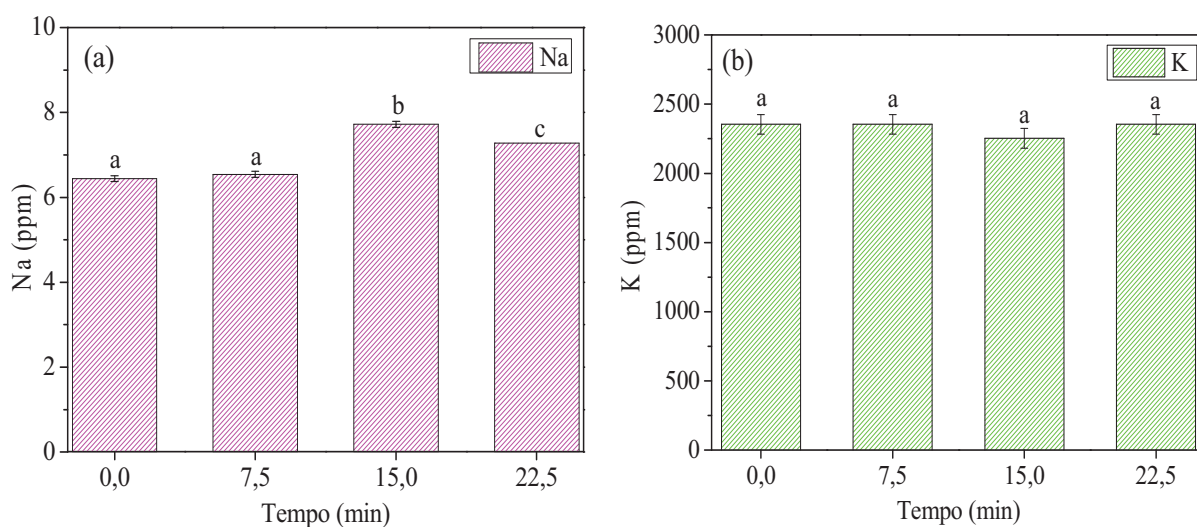
Existem vários estudos nos quais foram relatadas reduções dos valores de pH em amostras líquidas tratadas com plasma (IKAWA; KITANO; HAMAGUCHI, 2010), o que reforça os resultados obtidos na presente pesquisa, onde houve redução leve, porém significativa, do pH na água de coco após a aplicação de diferentes tempos de tratamento.

Conforme estudo realizado por Dasan e Boyaci (2018), com jato de plasma aplicado em alguns tipos de sucos diferentes, os valores de pH no suco de laranja apresentaram redução significativa, de 3,95 a 3,93, para um tratamento de 120s de aplicação de plasma.

5.3.3 Sódio (Na^+) e Potássio (K^+)

Os teores de Na^+ e K^+ presentes na água de coco estão expressos na Figura 12. A concentração de íons Na^+ teve um leve aumento nas amostras tratadas em relação ao controle, e nos tempos de 15 min e 22,5 min, essa diferença foi considerada significativa.

Figura 12. Concentração de íons (a) Sódio e (b) Potássio na água de coco, para diferentes tempos de tratamento por plasma DBD



Nota: Letras diferentes representam valores que possuem diferença significativa ($p < 0,05$). Média para 3 repetições.

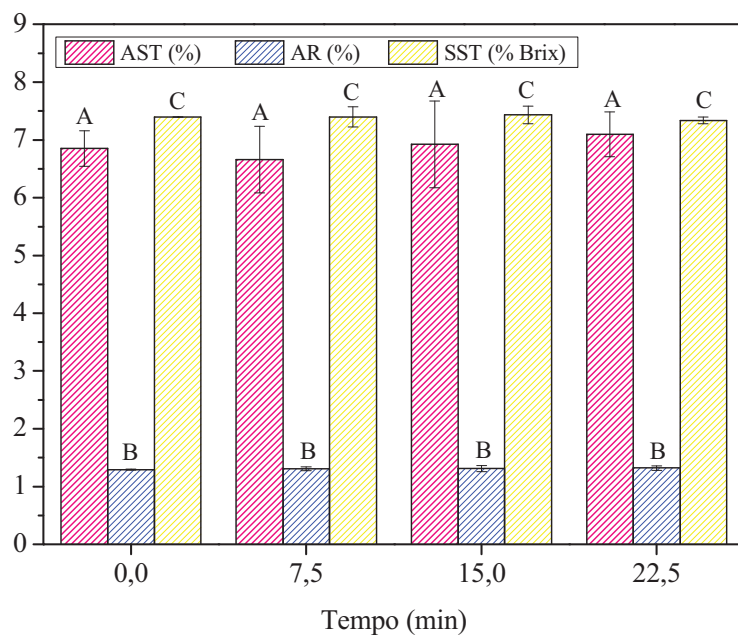
O controle estava com 6,44 ppm, enquanto os tratamentos obtiveram 7,72 ppm e 7,28 ppm, a 15 min e 22,5 min, respectivamente. Já o teor de K^+ não teve nenhuma diferença após o tratamento por plasma. Este leve aumento, porém, significativo, na concentração de sódio nos tempos de 15 min e 22,5 min de tratamento, deve estar associado a uma possível evaporação da amostra nesses intervalos de tempo.

Essa composição única da água de coco, rica em sódio e potássio, é importante, por exemplo, no tratamento de diarreia humana em regiões pobres do planeta, hidratando a população e protegendo o trato gastrointestinal contra várias infecções (PRADO *et al.*, 2015). Saber que o tratamento a plasma afeta muito pouco ou praticamente nada dessas substâncias na água de coco é um fator extremamente positivo.

5.3.4 Açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e sólidos solúveis totais (SST)

Os teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sólidos solúveis totais em função do tratamento por plasma estão expressos na Figura 13.

Figura 13. Variações de AST, AR e SST na água de coco para diferentes tempos de tratamento por plasma



Nota: Valores representados com letras iguais por tipo de análise não possuem diferença significativa ($p > 0,05$).
Média para 3 repetições.

Nenhum dos três teores expressaram diferença significativa entre os controles e as amostras tratadas por plasma. Desta forma, o tratamento por plasma não modificou as características de açúcares presentes na água de coco, o que é um resultado relevante para a indústria diante da busca por tecnologias que afetem somente os microrganismos, para descontaminação do produto, sem perda de suas propriedades originais. Assim, a aceitabilidade por parte dos consumidores é maior.

Na pesquisa realizada por Adubofuor, Amoah e Osei-Bonsu (2016), foram analisadas amostras de água de coco de duas variedades de coqueiros, pasteurizadas a três modos distintos: 90 °C por 5 minutos, 80 °C por 15 minutos e a 70 °C por 25 minutos, além das amostras controle (não pasteurizadas). Em análise sensorial, diante dos parâmetros de clareza, aroma, sensação na boca, sabor residual e aceitabilidade geral das amostras, a que obteve melhor aceitação geral foi uma amostra não-pasteurizada. Eles puderam concluir que a pasteurização reduziu a carga microbiana, mas também teve um efeito redutor nas propriedades sensoriais e no conteúdo nutricional da água de coco. Foi observada uma redução nos açúcares solúveis totais, vitamina C, fenóis totais e acidez titulável (AT) após a pasteurização.

Foi observado no trabalho de Yannam *et al.* (2018), que as características físico-químicas do suco de tangerina não foram alteradas após o tratamento com plasma DBD, quando comparado ao suco não tratado. Por outro lado, houve alterações significativas observadas na acidez total, ácido ascórbico e teor total de fenol no suco de tangerina pasteurizado. Diante disso, entende-se que o plasma é capaz de manter algumas propriedades nutricionais de alimentos líquidos, que geralmente são afetadas pelo processo de pasteurização.

Os resultados para SST estão coerentes com o observado por Shi *et al.* (2011), que descobriram que o tratamento por plasma DBD não teve efeito significativo sobre o °Brix de suco de laranja. No trabalho desenvolvido por Mahnot *et al.* (2019) com plasma aplicado em água de coco, não houve variação significativa do teor de SST após o tratamento.

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir, com a execução do trabalho, que:

- O plasma frio atmosférico, em configuração DBD, foi eficaz na inativação de *E. coli* em 100%, ao tempo de 22,5 min;
- *C. albicans* sofreu redução máxima de 90,3%, ao tempo de 22,5 min;
- As espécies reativas geradas pelo plasma causaram leve redução de pH na água de coco, mas não ultrapassou o limite aceitável;
- Os teores de açúcares da água de coco não foram alterados após exposição ao plasma DBD nos diferentes tempos de tratamento;
- A utilização de plasma frio atmosférico tem potencial na aplicação para descontaminação de água de coco.

REFERÊNCIAS

- ADUBOFUOR, J.; AMOAH, I.; OSEI-BONSU, I. Sensory and physicochemical properties of pasteurized coconut water from two varieties of coconut. **Food Science and Quality Management**, v. 54, p. 26–32, 2016.
- ALVES FILHO, E. G.; DE BRITO, E. S.; RODRIGUES, S. Effects of cold plasma processing in food components. In: **Advances in Cold Plasma Applications for Food Safety and Preservation**. Elsevier Inc., 2020. p. 253–268.
- ALVES JR., C. **Nitretação a plasma: Fundamentos e Aplicações**. Natal, Brasil: EDUFRN, 2001. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nitreta??o+a+Plasma:+Fundamentos+e+Aplica??es#0>>.
- ARJUNAN, K. P.; SHARMA, V. K.; PTASINSKA, S. Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA—a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, p. 2971–3016, 2015.
- AROUCHA, E. M.; VIANNI, R. Água de coco por cromatografia líquida e pelo método titulométrico. **Revista Ceres**, v. 49, n. 283, p. 245–251, 2002.
- AWUA, A. K.; DOE, E. D.; AGYARE, R. Exploring the influence of sterilisation and storage on some physicochemical properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2011. Disponível em: <<https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-4-451>>.
- AWUA, A. K.; DOE, E. D.; AGYARE, R. Potential Bacterial Health Risk Posed to Consumers of Fresh Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. **Food and Nutrition Sciences**, v. 03, n. 08, p. 1136–1143, 2012.
- BÁRDOS, L.; BARÁNKOVÁ, H. Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 23, p. 6705–6713, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2010.07.044>>.
- BERISTAÍN-BAUZA, S. et al. Inhibition of *Salmonella Typhimurium* growth in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by hurdle technology. **Food Control**, v. 92, p. 312–318, 2018.
- BERK, Z. Thermal processing. In: BERK, Z. (Ed.). **Food Process Engineering and Technology**. 3. ed. Academic Press, 2018. p. 399–420.
- BERMUDEZ-AGUIRRE, D. Advances in the inactivation of microorganisms and viruses in food and model systems using cold plasma. In: **Advances in Cold Plasma Applications for Food Safety and Preservation**. Elsevier, 2020a. p. 49–91.
- BERMUDEZ-AGUIRRE, D. Disinfection of high-moisture food using cold plasma. In: **Advances in Cold Plasma Applications for Food Safety and Preservation**. Elsevier Inc., 2020b. p. 147–183.
- BRASIL. **RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**, Diário Oficial da União, 2001. Disponível

em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC_12_2001_COMP.pdf/b3cb6241-6d1b-49fc-8a88-b0781a147980>.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 9, de 30 de janeiro de 2020**, Diário Oficial da União, 2020. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-9-de-30-de-janeiro-de-2020-240823537>>.

BRUGGEMAN, P. J. et al. Plasma-liquid interactions: A review and roadmap. **Plasma Sources Science and Technology**, v. 25, n. 5, 2016.

BRUGGEMAN, P.; LEYS, C. Non-thermal plasmas in and in contact with liquids. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 42, n. 5, 2009.

CONRADT, H.; SCHMIDT, M. Plasma generation and plasma sources. **Plasma Sources Science and Technology**, v. 9, n. 4, p. 441–454, 2000.

COUTINHO, N. M. et al. Cold plasma processing of milk and dairy products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 74, n. October 2017, p. 56–68, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.008>>.

D'AGOSTINO, R. et al. Low-temperature plasma processing of materials: Past, present, and future. **Plasma Processes and Polymers**, v. 2, n. 1, p. 7–15, 2005.

DAMAR, S.; BALABAN, M. O.; SIMS, C. A. Continuous dense-phase CO₂ processing of a coconut water beverage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 666–673, 2009.

DASAN, B. G.; BOYACI, I. H. Effect of Cold Atmospheric Plasma on Inactivation of *Escherichia coli* and Physicochemical Properties of Apple, Orange, Tomato Juices, and Sour Cherry Nectar. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 2, p. 334–343, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11947-017-2014-0>>.

DONSINGHA, S.; ASSATARAKUL, K. Kinetics model of microbial degradation by UV radiation and shelf life of coconut water. **Food Control**, v. 92, p. 162–168, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.030>>.

EHLBECK, J. et al. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 44, n. 1, 2011.

FAO; WHO. **Evaluation of certain food additives: fifty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Geneva, Switzerland: WHO, 2002.

FERNÁNDEZ, A.; THOMPSON, A. The inactivation of *Salmonella* by cold atmospheric plasma treatment. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 678–684, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.009>>.

FRÍAS, E. et al. Evaluation of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAPP) and plasma-activated water (PAW) as alternative non-thermal decontamination technologies for tofu: Impact on microbiological, sensorial and functional quality attributes. **Food Research**

International, v. 129, p. 1–11, 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919307458>>.

FRIDMAN, A. **Plasma Chemistry**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

Disponível em: <<http://www.cambridge.org/9780521847353>>.

GABRIEL, A. A. et al. Reference organism selection for microwave atmospheric pressure plasma jet treatment of young coconut liquid endosperm. **Food Control**, v. 69, p. 74–82, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.034>>.

GABRIEL, A. A. et al. Individual and combined efficacies of mild heat and ultraviolet-c radiation against Escherichia coli O157:H7, Salmonella enterica, and Listeria monocytogenes in coconut liquid endosperm. **International Journal of Food Microbiology**, v. 277, p. 64–73, 2018.

GAUTAM, D. et al. Nonthermal pasteurization of tender coconut water using a continuous flow coiled UV reactor. **LWT - Food Science and Technology**, v. 83, p. 127–131, 2017.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.008>>.

GAVAHIAN, M. et al. A critical analysis of the cold plasma induced lipid oxidation in foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 77, p. 32–41, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.009>>.

GORBANEV, Y.; O'CONNELL, D.; CHECHIK, V. Non-Thermal Plasma in Contact with Water: The Origin of Species. **Chemistry - A European Journal**, v. 22, n. 10, p. 3496–3505, 2016.

HERTWIG, C.; MENESES, N.; MATHYS, A. Cold atmospheric pressure plasma and low energy electron beam as alternative nonthermal decontamination technologies for dry food surfaces: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 77, p. 131–142, 2018.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.011>>.

HOWATSON, A. M. **Descargas electricas en gases**. Madrid: Urmo, 1965.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal 2018**. 2018. Disponível em:

<<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>>. Acesso em: 16 fev. 2020.

IKAWA, S.; KITANO, K.; HAMAGUCHI, S. Effects of pH on bacterial inactivation in aqueous solutions due to low-temperature atmospheric pressure plasma application. **Plasma Processes and Polymers**, v. 7, n. 1, p. 33–42, 2010.

JESUS, N. da Si. De et al. Avaliação microbiológica da água de coco comercializada no município de Ouro Preto do Oeste, Rondônia, Brasil. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 12, n. 10, p. 173–182, 2018.

KANNANGARA, A. C.; CHANDRAJITH, V. G. G.; RANAWEERA, K. K. D. S. Comparative analysis of coconut water in four different maturity stages. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 3, p. 1814–1817, 2018.

KIM, H. J. et al. Microbial safety and quality attributes of milk following treatment with

atmospheric pressure encapsulated dielectric barrier discharge plasma. **Food Control**, v. 47, p. 451–456, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.053>>.

KOSTOV, K. G. et al. Inactivation of *Candida albicans* by Cold Atmospheric Pressure Plasma Jet. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 43, n. 3, p. 770–775, 2015.

KUCHENBECKER, M. et al. Characterization of DBD plasma source for biomedical applications. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 42, n. 4, 2009.

LANGMUIR, I. Oscillations in Ionized Gases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 14, n. 8, p. 627–637, 1928. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.14.8.627>>.

LAURITA, R. et al. Chemical analysis of reactive species and antimicrobial activity of water treated by nanosecond pulsed DBD air plasma. **Clinical Plasma Medicine**, v. 3, n. 2, p. 53–61, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212816615300081>>.

LEE, G. J. et al. Optical and structural properties of plasma-treated *Cordyceps bassiana* spores as studied by circular dichroism, absorption, and fluorescence spectroscopy. **Journal of Applied Physics**, v. 117, n. 2, p. 1–13, 2015.

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

LIAO, X. et al. Application of a Dielectric Barrier Discharge Atmospheric Cold Plasma (Dbd-Acp) for *Escherichia Coli* Inactivation in Apple Juice. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 2, p. 401–408, 2018.

MACHALA, Z. et al. DC discharges in atmospheric air for bio-decontamination - spectroscopic methods for mechanism identification. **European Physical Journal D**, v. 54, n. 2, p. 195–204, 2009.

MAHNOT, N. K. et al. Strategy to achieve a 5-log *Salmonella* inactivation in tender coconut water using high voltage atmospheric cold plasma (HVACP). **Food Chemistry**, v. 284, n. June 2018, p. 303–311, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.084>>.

MALDONADE, I. R. et al. **Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson**, Embrapa. Comunicado Técnico 86, 2013.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. De. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: Panorama 2010**, Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2011/doc_164.pdf>.

MISRA, N. N. et al. Thermodynamics, transport phenomena, and electrochemistry of external field-assisted nonthermal food technologies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 11, p. 1832–1863, 2018.

MISRA, N. N. et al. In-package cold plasma technologies. **Journal of Food Engineering**, v.

244, n. July 2018, p. 21–31, 2019. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.019>>.

MISRA, N. N.; JO, C. Applications of cold plasma technology for microbiological safety in meat industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 64, p. 74–86, 2017. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.005>>.

MOISAN, M. et al. Plasma sterilization. Methods and mechanisms. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 349–358, 2002.

MOUTIQ, R. et al. In-package decontamination of chicken breast using cold plasma technology: Microbial, quality and storage studies. **Meat Science**, v. 159, p. 1–9, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174019305996>>.

NAÏTALI, M. et al. Combined Effects of Long-Living Chemical Species during Microbial Inactivation Using Atmospheric Plasma-Treated Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 22, p. 7662–7664, 2010.

NIEMIRA, B. A. Cold Plasma Decontamination of Foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 125–142, 2012.

OCHOA-VELASCO, C. E. et al. Effect of UV-C light on *Lactobacillus rhamnosus*, *Salmonella Typhimurium*, and *Saccharomyces cerevisiae* kinetics in inoculated coconut water: Survival and residual effect. **Journal of Food Engineering**, v. 223, p. 255–261, 2018.

PANKAJ, S. K. et al. Effect of high voltage atmospheric cold plasma on white grape juice quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 12, p. 4016–4021, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.8268>>.

PANKAJ, S. K.; KEENER, K. M. Cold plasma: background, applications and current trends. **Current Opinion in Food Science**, v. 16, p. 49–52, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799316301278>>.

PERINBAN, S.; ORSAT, V.; RAGHAVAN, V. Nonthermal Plasma–Liquid Interactions in Food Processing: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 6, p. 1985–2008, 2019.

PRADO, F. C. et al. Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 489–497, 2015. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.020>>.

QIU, X. et al. Spectroscopic study of dielectric barrier discharges in cellular polypropylene ferroelectrets. **Applied Physics Letters**, v. 91, n. 13, p. 2005–2008, 2007.

REDDY, K. V.; DAS, M.; DAS, S. K. Filtration resistances in non-thermal sterilization of green coconut water. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 3, p. 381–385, 2005.

RITTER, A. C. et al. Comparative proteomic analysis of foodborne *Salmonella Enteritidis* SE86 subjected to cold plasma treatment. **Food Microbiology**, v. 76, n. June, p. 310–318, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.012>>.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, n. 3, p. 508–514, 1954. Disponível em: <<https://portlandpress.com/biochemj/article/57/3/508/48750/The-estimation-of-carbohydrates-in-plant-extracts>>.

ZIUZINA, D. et al. Investigation of a large gap cold plasma reactor for continuous in-package decontamination of fresh strawberries and spinach. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 59, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856419305284>>.