

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA**

CAMILA DI PAULA SORGE GOMES DA COSTA

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE PLASMAS ELÉTRICOS GERADOS EM
DIFERENTES GASES EM SEMENTES DE CEBOLA CONTAMINADAS COM
CEPAS DE *Penicillium sp.***

STUDY OF THE ANTIFUNGAL ACTION OF ELECTRIC PLASMAS GENERATED IN
DIFFERENT GASES IN ONION SEEDS CONTAMINATED WITH STRAINS OF
Penicillium sp.

São Paulo - SP
2022

PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

CAMILA DI PAULA SORGE GOMES DA COSTA

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE PLASMAS ELÉTRICOS GERADOS COM
DIFERENTES GASES EM SEMENTES DE CEBOLA CONTAMINADAS COM
CEPAS DE *Penicillium* sp.**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia
Biomédica da Universidade Brasil,
como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do título
de Mestre em Engenharia Biomédica.

Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa

Orientador

Prof. Dr. Bruno Manzoli

Coorientador

São Paulo - SP

2022

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).**

C871e COSTA, Camila Di Paula Sorge Gomes da.
Estudo da ação antifúngica de plasmas elétricos gerados em diferentes gases em sementes de cebolas contaminadas com cepas de *Penicillium* sp. / Camila Di Paula Sorge Gomes da Costa -- São Paulo: Universidade Brasil, 2022.
61 f.: il. color.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa.
Coorientação: Prof. Dr. Bruno Manzolli.

1. *Penicillium*. 2. Sementes de cebola. 3. Plasma. I. Pessoa, Rodrigo Sávio. II. Rodrigues, Bruno Vinicius Manzolli. III. Título.

CDD 620.82



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

TERMO DE APROVAÇÃO

CAMILA DI PAULA SORGE GOMES DA COSTA

**“ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE DIFERENTES PLASMAS ELÉTRICOS EM
SEMENTES DE CEBOLA CONTAMINADAS COM CEPAS DE *Penicillium sp*”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof.(a) Dr.(a) Rodrigo Sávio Pessoa (presidente-orientador)

Prof.(a) Dr.(a) Laurita dos Santos (UNIVERSIDADE BRASIL)



Documento assinado digitalmente
WILLIAM CHIAPPIM JUNIOR
Data: 01/11/2022 09:29:24-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.(a) Dr.(a) William Chiappim Junior (UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DE SÃO PAULO)

São Paulo, 31 de outubro de 2022
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a). Rodrigo Sávio Pessoa

Houve alteração do Título: sim () não ():

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE PLASMAS ELÉTRICOS GERADOS EM
DIFERENTES GASES EM SEMENTES DE CEBOLA CONTAMINADAS
COM CEPAS DE *Penicillium sp*.**



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.


Título do Trabalho: **"ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE DIFERENTES PLASMAS ELÉTRICOS EM SEMENTES DE CEBOLA CONTAMINADAS COM CEPAS DE *Penicillium sp*"**

Houve alteração do Título: sim () não ():


ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE PLASMAS ELÉTRICOS GERADOS EM
DIFERENTES GASES EM SEMENTES DE CEBOLA CONTAMINADAS
COM CEPAS DE *Penicillium sp*.

Autor(es):

Discente: **Camila Di Paula Sorge Gomes da Costa**

Assinatura: 

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Rodrigo Sávio Pessoa**

Assinatura: 

Coorientador(a):

Assinatura: _____

Data: 31/10/2022

Campus Itaquera
Rua Carolina Fonseca, 584, Itaquera - São Paulo/SP | 08230-030
Central de Relacionamento com o Aluno - 08007807070
www.ub.edu.br

Resumo

A fisiologia do desenvolvimento vegetal é de grande relevância e consiste em diversas etapas como germinação, crescimento e maturação, mas o processo bem sucedido, pode ser comprometido por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, como clima, qualidade do solo, stress e, até mesmo, algumas doenças. Dentre as novas tecnologias aplicadas à agricultura de forma “limpa”, podemos citar a utilização de plasmas físicos elétricos. A amostra fúngica selecionada, foi a cepa de *Penicillium* sp isolada previamente de sementes de cebola. As amostras de sementes de cebola foram obtidas comercialmente e separadas aleatoriamente. Para a irradiação de todas as amostras, foi utilizado um reator de arco deslizante, cuja geometria permite a exaustão do gás em vórtex reverso e a geração do plasma é feita por fonte de corrente contínua (10 kV). Os gases utilizados foram o Argônio, Hélio e Ar comprimido gerado por compressor médico/odontológico. Após as irradiações, as amostras foram incubadas em condições específicas e observadas por 10 dias. As irradiações das sementes com plasma de gás Argônio com Ar comprimido e o composto apenas de Ar comprimido, apresentaram baixo número de contaminação, enquanto que, os tratamentos baseados nos gases Hélio e Argônio mantiveram altos índices de crescimento fúngico nas amostras. Em contrapartida, os gases Hélio e Argônio não prejudicaram ou, até mesmo, contribuíram para o aumento do número de sementes viáveis. Os valores elevados nas temperaturas, durante as irradiações contendo Ar comprimido, podem ter influenciado, não só no metabolismo fúngico, mas também na viabilidade germinativa das sementes. Apesar do período de exposição das amostras às altas temperaturas ser de, no máximo, 15 minutos, os efeitos foram permanentes. Nos tratamentos efetivos para inibição do crescimento fúngico também houve redução significativa no número de sementes que iniciaram o processo germinativo, mediante a eclosão da casca. Sendo assim, a aplicação do plasma em sementes, nos parâmetros estudados, não foi promissora, tendo em vista a grande queda na viabilidade germinativa porém foi capaz de efetuar controle de crescimento fúngico principalmente, quando houve associação dos gases inertes ao Ar comprimido.

Palavras chave: *Penicillium*, sementes de cebola, plasma.

Abstract

The physiology of plant development is of great relevance and consists of several stages such as germination, growth and maturation, but the successful process can be compromised by several intrinsic and extrinsic factors, such as climate, soil quality, stress and even some diseases. Among the new technologies applied to agriculture in a “clean” way, we can mention the use of electrical physical plasmas. The fungal sample selected was the strain of *Penicillium* sp previously isolated from onion seeds. Onion seed samples were obtained commercially and randomly separated. For the irradiation of all the samples, a sliding arc reactor was used, whose geometry allows the exhaustion of the gas in a reverse vortex and the generation of the plasma is made by a source of direct current (10 kV). The gases used were Argon, Helium and compressed air generated by a medical/dental compressor. After the irradiations, the samples were incubated under specific conditions and observed for 10 days. The irradiation of the seeds with plasma of Argon gas with Compressed Air and the compound only of Compressed Air, showed a low number of contamination, while the treatments based on Helium and Argon gases maintained high rates of fungal growth in the samples. On the other hand, Helium and Argon gases did not harm or even contributed to the increase in the number of viable seeds. The high values in temperatures, during irradiation containing compressed air, may have influenced not only the fungal metabolism, but also the germination viability of the seeds. Although the period of exposure of the samples to high temperatures was, at most, 15 minutes, the effects were permanent. In the effective treatments to inhibit fungal growth, there was also a significant reduction in the number of seeds that started the germination process, through the hatching of the husk. Thus, the application of plasma in seeds, in the parameters studied, was not promising, in view of the great drop in germination viability, but it was able to effect control of fungal growth, mainly, when there was association of inert gases with compressed air.

Keywords: *Penicillium*, onion seeds, plasma.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

O plasma é uma nova tecnologia que vem sendo estudada por diversos cientistas. Essa técnica pode ser aplicada na área da saúde e na agricultura. Neste trabalho foi possível verificar que o plasma é um tratamento que pode ser utilizado para matar os fungos que prejudicam o trabalho dos agricultores na lavoura. O plasma conseguiu matar os fungos de algumas sementes, mas também prejudicou o crescimento delas em alguns casos. Cada tipo de plasma reagiu de forma diferente sobre os fungos e as sementes, precisando ser ajustado conforme a necessidade, mas ainda assim é uma boa alternativa a ser estudada e aplicada no nosso dia a dia.

Lista de Figuras

Figura 1 - Sementes de cebola submetidas ao processo de germinação, que apresentaram contaminações naturais.	25
Figura 2 - Imagens da identificação fúngica presente na amostra de sementes de cebola.....	26
Figura 3 - Colônia de <i>Penicillium</i> em crescimento radial sobre placa contendo ágar batata.	27
Figura 4 - Placa contendo ágar batata, submetido à técnica de semeadura com pique central.....	27
Figura 5 - Esquema do reator de jato de plasma não térmico de argônio/oxigênio ou hélio/oxigênio utilizado no experimento.	29
Figura 6 - Sistema de plasma durante o processo de irradiação das amostras de micro-organismos semeados em placas de Petri contendo ágar batata.	30
Figura 7 - Placas de Petri contendo ágar batata e amostras de <i>Penicillium</i> após irradiações que foram ineficientes para controlar o crescimento fúngico.	35
Figura 8 - Placas de Petri contendo ágar batata e amostras de <i>Penicillium</i> após irradiações que foram capazes de controlar o crescimento fúngico.	35
Figura 9 - Placas de ágar batata, contendo amostra fúngica diluída, semeada e tratada com plasma, representando falhas quanto ao preenchimento da superfície.	36
Figura 10 - Placas contendo ágar batata e cultura de <i>Penicillium</i> após tratamentos com diferentes composições de plasma.	37
Figura 11 - Imagens obtidas pela câmera térmica.	40
Figura 12 - O gráfico representa a curva de temperatura gerada em função de segundos, totalizando 5 minutos de irradiação, com diferentes composições de plasma.....	40
Figura 13 - Índice de sementes contaminadas mediante contaminação prévia com cepa ATCC.....	42
Figura 14 - Índice de sementes contaminadas mediante contaminação prévia com cepa isolada.....	43
Figura 15 - Índice de eclosão das sementes sem contaminação prévia.....	44
Figura 16 - Índice de eclosão das sementes mediante contaminação prévia com cepa ATCC.....	45

Figura 17 - Índice de eclosão das sementes mediante contaminação prévia com cepa isolada.	45
Figura 18 - Imagem adquirida mediante Microscopia Eletrônica de Varredura de sementes de cebola, previamente contaminadas com cepa de <i>Penicillium</i>	46
Figura 19 - Imagens obtidas por MEV da superfície das semente in natura sem qualquer tratamento, onde, A representa aumento de 500x e B representa aumento de 1500x.....	47
Figura 20 - Imagens obtidas por MEV da superfície das semente in natura com tratamento de 10 minutos de plasma de Argônio e Ar Comprimido, onde, A representa aumento de 500x e B representa aumento de 1500x.....	48
Figura 21 - Amostra in natura sem tratamento, aumentada 94x (A) e semente in natura tratada por 10 minutos com plasma associado, aumentada 95x (B).	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição bromatológica de 100g da parte comestível de cebola crua.	17
Tabela 2 - Composição dos diferentes tipos de plasma elétrico aplicados nas amostras.....	29
Tabela 3 - Determinação dos grupos de sementes de cebola.....	31
Tabela 4 - Diferentes combinações, proporções e tensões dos respectivos tratamentos de plasma.....	37
Tabela 5 - O Tabela representa os diferentes tratamentos de plasma, nos tempos de 5, 10 e 15 minutos e seus respectivos valores de temperatura máxima atingida durante a irradiação e o halo médio formado nas placas.	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO GERAL	15
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1. CEBOLA	16
3.1.1. Morfologia e fisiologia da cebola	16
3.1.2. Cultivo da cebola	18
3.2. INTERAÇÕES ENTRE MICRORGANISMOS E PLANTAS	19
3.3. PLASMA	21
3.3.1. Plasma na agricultura	22
3.4. JUSTIFICATIVA.....	23
4. METODOLOGIA	25
4.1. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS FÚNGICAS.....	25
4.1.1. Preparação das amostras fúngicas	26
4.1.2. Irradiação das amostras fúngicas	28
4.1.3. Avaliação dos resultados	30
4.2. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DE SEMENTES	31
4.2.1. Protocolo de contaminação das sementes	31
4.2.2. Irradiação das amostras de sementes	32
4.2.3. Avaliação dos resultados – sementes	32
4.3. AVALIAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS SEMENTES POR MEV	33
5. RESULTADOS	34
5.1. AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS FÚNGICAS	35
5.2. AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SEMENTES	41
5.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	46
5.3.1. Avaliação da adesão dos fungos à semente	46
5.3.2. Avaliação das possíveis alterações geradas pelo tratamento de plasma	47
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

A fisiologia do desenvolvimento vegetal é de grande relevância e consiste em diversas etapas como germinação, crescimento e maturação, mas o processo bem sucedido, pode ser comprometido por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, como clima, qualidade do solo, stress e, até mesmo, algumas doenças (NEGRI; ROSA; ZONETTI, 2009). O trabalho agrícola envolve grandes perigos para a saúde pois além dos riscos ocupacionais, podemos incluir o alto grau de toxicidade dos agrotóxicos que, por suas vezes, podem acarretar diversos problemas adicionais de saúde, tanto para o vegetal quanto para o ser humano e animais (FARIA; FASSA; FACCHINI, 2007).

Atualmente, os consumidores vêm adquirindo uma maior consciência quanto à segurança alimentar e por esse motivo, buscam o consumo cada vez maior de produtos certificados e com rígido controle de qualidade, que incluem, boas práticas de manuseio, controle microbiológico e, até mesmo, redução do uso de compostos químicos. Visando a satisfação dos clientes e, conseqüente aumento nas vendas, muitas indústrias optam pelo uso de ingredientes orgânicos em suas formulações e diminuição do uso que produtos químicos, como fertilizantes e sanitizantes. Dessa forma, os programas de sanidade vegetal do Ministério da Agricultura visam garantir a segurança dos alimentos produzidos e mantém o nosso país no comércio mundial de produtos alimentícios (ISO 22000, 2018).

De acordo com o plano agrícola e pecuário de 2014/2015, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Brasil tem aumentado os índices de produção e exportação do agronegócio na última década, garantindo que o país esteja inserido entre as principais potências agrícolas mundiais. Comparando a produção de 1994 com a registrada em 2012, houve um aumento 1.977,22% em toneladas de cebola que foram produzidas (BRASIL; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014). Com as vulnerabilidades dos sistemas político e financeiro nacionais, houveram grandes variações no cenário de produção, importação e exportação de produtos, inclusive alimentos, contudo, os índices de produção emitidos pelo levantamento do IBGE em Fevereiro de 2017, demonstram que a produção da cebola, apesar de não constituir uma das principais lavouras de produção do Brasil, continua elevada, representando um total de 1.566.896

toneladas, no mês de referência. Estes altos índices e a preocupação com perdas financeiras significativas, incluem a pesquisa e implantação de novas tecnologias que buscam melhoria na qualidade do produto e consequente redução dos prejuízos (IBGE, 2017). De acordo com o Decreto nº 10.534, de 28 de outubro de 2020, faz-se necessário transformar todo o conhecimento adquirido em produtos, processos e serviços inovadores que visem impactar direta e positivamente no âmbito econômico do país.

Dentre as novas tecnologias aplicadas de forma inovadora e “limpa”, podemos citar a utilização de plasmas físicos elétricos, que consistem em protocolos de baixo custo, que geram baixo risco para a saúde do operador e dos consumidores, não geram resíduos prejudiciais ao ambiente e apresentam alta eficácia no processo de descontaminação de alguns produtos. Atualmente tem surgido novas pesquisas que buscam melhorias nos processos de aplicação de plasma na área da saúde e agricultura. Alguns grupos de pesquisa têm estudado a aplicação do plasma no processo em sementes ou diretamente nas lavouras (LING et al., 2015; TAKAKI et al, 2019; RANIERI et al, 2020), enquanto outros tem aplicado a técnica diretamente em diversos substratos para controle de crescimento microbiano (DORIA et al., 2015a; FANTOVA et al., 2013; KOSTOV et al., 2014).

2. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como principal objetivo avaliar os efeitos das diferentes composições de plasma, no controle da contaminação fúngica em amostras de sementes de cebola, utilizando tratamentos com plasma de gás hélio e/ou argônio associados, ou não, ao ar comprimido.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar efeitos antifúngicos do plasma elétrico mediante aplicação direta sobre cepas de *Penicillium* sp.
- Avaliar efeitos de descontaminação das sementes após aplicação de plasma elétrico.
- Avaliar interferência do tratamento de plasma na viabilidade germinativa de sementes de cebola.
- Utilizar a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a adesão das células fúngicas à parede celular vegetal.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CEBOLA

A cebola, conhecida cientificamente como *Allium cepa* L., integra a família *Alliaceae* juntamente com o alho (*Allium sativum* L.), alho poró (*A. ampeloprasum* L. ou *Allium porrum*) e cebolinha (*A. fistulosum* L.). Sua colocação na espécie *Allium cepa* L. foi bem estabelecida desde a primeira taxonomia adotada no livro *Species Plantarum* de Carl Van Lineus (1753), porém sua inclusão na família *Alliaceae* apresentou divergências, levantando questionamentos quanto à possível classificação dentro da família *Liliaceae* ou *Amaryllidaceae*, devido à algumas características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Sua colocação na família atualmente participante, relaciona-se ao fato de combinações de dados moleculares e morfológicos que excluem a possível integração às outras família pelo fato de ser mais compatível com as características gerais monofiléticas (*Alliaceae*) mas que, apesar de distinta, não deixa de manter relação estreita com a família *Amaryllidaceae* (FREIRE et al., 2007).

A cebola representa uma cultura antiga, sendo relatada desde os primeiros livros da Bíblia sendo citada por Moisés, no livro de Números, com data aproximada de 1470 a.C.:

“Lembramo-nos dos peixes que no Egito comíamos de graça, e dos pepinos, dos melões, dos porros, **das cebolas** e dos alhos.” (Números 11:5) – Grifo do Autor

3.1.1. Morfologia e fisiologia da cebola

A cebola pode apresentar diferentes morfologias que subdividem as formas hortícolas em três grupos:

- **Grupo Tyspicum** (Regel): abrange as cebolas comercialmente importantes onde, suas características apresentam bulbos grandes e simples, inflorescências sem bulbinhos, são, tipicamente, originárias de sementes verdadeiras e apresentam ciclo de vida bienal.

- **Grupo Aggregatum** (G. Don): se diferem por apresentar bulbos compostos, possibilidade de ser estéril, ciclo de vida anual e multiplicação basicamente vegetativa. Este grupo apresenta em sua composição, outros três subgrupos:

Cebola múltipla ou batata (Potato onion), Cebola sempre- pronta (Every-Ready onions) e Chalota (Shallot).

- **Grupo Proliferum:** compreende um grupo com déficit no desenvolvimento dos bulbos. As inflorescências apresentam bulbinhos tipicamente, sem sementes verdadeiras.

A cebola é considerada, além de um condimento habitual na dieta de brasileiros, uma hortaliça capaz de trazer benefícios quando ingerida com regularidade. Os nutricionistas recomendam o consumo da cebola e alguns dos compostos deste alimento estão descritos no Tabela 1.

Tabela 1 - Composição bromatológica de 100g da parte comestível de cebola crua.

COMPOSTO	QUANTID ADE
Umidade (%)	88,9
Cinzas (mg)	0,4
Energia (kcal)	39
Energia (kJ)	165
Proteínas (g)	1,7
Lipídeos (g)	0,1
Colesterol (mg)	NA
Carboidrato (g)	8,9
Fibra alimentar (g)	2,2
Cálcio (mg)	14
Magnésio (mg)	12
Manganês (mg)	0,13
Fósforo (mg)	38
Ferro (mg)	0,2
Sódio (mg)	1
Potássio (mg)	176
Cobre (mg)	0,05
Zinco (mg)	0,2
Vitamina C (mg)	4,7

Retinol (µg)	NA
Tiamina (mg)	0,04
Riboflavina (mg)	Tr
Piridoxina (mg)	0,14
Niacina (mg)	Tr

Fonte: NEPA - NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO, (2011).

3.1.2. Cultivo da cebola

O cultivo da cebola abrange um conjunto de processos e condições ideais para o sucesso da lavoura, sendo que, esta hortaliça se desenvolve mais adequadamente em solos de textura média e com condições ajustadas de matéria orgânica, compostos químicos e pH (FREIRE et al., 2007).

De acordo com Freire et al., (2007), o manejo do solo consiste em uma operação de grande relevância para o êxito nas lavouras, pois a alta taxa de exploração agrícola induz um processo acelerado de degradação do solo, desequilibrando as características necessárias para o potencial produtivo desta terra. O sistema de semeadura direta apresenta um diferencial positivo no solo uma vez que é a melhor alternativa para reverter o impacto negativo do cultivo convencional.

O rendimento da safra de cebola está diretamente relacionado aos diversos fatores químicos, físicos e ambientais, como exemplo, podemos citar a disponibilidade de nitrogênio no solo. O comprometimento da concentração deste composto pode ser explicado por fenômenos como a lixiviação (KURTZ et al., 2013). Outro fator determinante para o sucesso da lavoura é a quantidade e qualidade da irrigação durante o plantio, tendo em vista que a cebola é constituída por, aproximadamente, 90% de água, o correto manejo da irrigação proporciona melhor desenvolvimento da hortaliça e, até mesmo, mais de um cultivo no ano. O Brasil é um país que apresenta climas extremos em algumas localidades do perímetro nacional e essa variação das condições climáticas determina diferentes épocas de plantio e colheita em cada região presente na extensão do território brasileiro. Este fato proporciona atendimento da demanda nacional durante todo o ano (FREIRE et al., 2007).

3.2. INTERAÇÕES ENTRE MICRORGANISMOS E PLANTAS

Além dos fatores físicos e químicos, os agentes microbiológicos vêm causando preocupações recorrentes aos agricultores (OTHA, 2016), gerando o comprometimento de boa parte da produção, pois colonizam diversos substratos, se multiplicam rapidamente e degradam facilmente a matéria orgânica. Esses agentes consistem em seres vivos microscópicos com diferentes características, nas quais, são estudadas pelo ramo da biologia denominado microbiologia.

Os micro-organismos podem se relacionar com as plantas de diferentes formas. Os endofíticos estão presentes no interior das partes aéreas, caules e folhas, e não causam nenhum dano ao hospedeiro vegetal, a interação epifítica é caracterizada pela colonização da superfície de órgãos e tecidos vegetais, porém a interação prejudicial é caracterizada pela relação da planta com micro-organismos fisiopatogênicos (AZEVEDO, 1999).

Inicialmente, os fungos eram classificados como vegetais, porém em 1969, foram separados em um reino denominado *Fungi*, pois suas características permitiam sua diferenciação em relação às plantas. Algumas dessas características fúngicas incluem a incapacidade de sintetizar clorofila e/ou qualquer componente fotossintético, não armazenar amido como reserva energética e não conter celulose na parede celular (com exceção de alguns fungos aquáticos). Outras características dos fungos são igualmente observadas em células animais, como a capacidade de armazenamento de glicogênio, por exemplo (TRABULSI, 2008).

De acordo com Trabulsi, (2008), os fungos são organismos eucarióticos, unicelulares quando leveduras e multicelulares, quando filamentosos e cogumelos, e podem ser encontrados em animais, em vegetais, na água, em detritos, no Homem e, em grande quantidade, no solo, pois participam do ciclo dos elementos da natureza. A dispersão destes seres vivos pela natureza ocorre com a contribuição de animais, seres humanos, água e, até mesmo, o ar atmosférico.

O desenvolvimento dos fungos em meios especiais de cultivo, consistem em duas formas de morfologia, sendo elas, leveduriformes e filamentosas.

Os fungos, continuam sendo a principal etiologia das doenças pós colheita, dentre as doenças pode-se citar: Mofo preto (*Aspergillus niger*) e Mofo verde (*Penicillium spp.*).

Além da degradação estrutural dos vegetais, os fungos filamentosos produzem metabólitos tóxicos que podem causar grandes danos ao organismo, quando inseridos na cadeia alimentar de animais e humanos podendo, até mesmo, resultar em óbito (FREIRE et al., 2007). O gênero *Penicillium* é um exemplo de tipo de fungo com grande importância alimentar, pois é responsável pela contaminação de alimentos como maçã, pêra e cereja e integra um dos cinco gêneros fúngicos produtores de micotoxinas (FREIRE et al., 2007; MAZIERO; BERSOT, 2010).

As micotoxinas são substâncias químicas produzidas e secretadas por fungos filamentosos, dentre os quais, as principais espécies são pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. A interação dessas substâncias com o organismo humano e/ou animal pode gerar grandes danos carcinogênicos, hepatotóxicos e mutagênicos, podendo, em determinadas circunstâncias, ser fatal. Devido ao favorecimento climático, o Brasil apresenta um ótimo cenário para disseminação de micro-organismos em lavouras, incluindo fungos produtores de micotoxinas (FREIRE et al., 2007).

Além das doenças fúngicas, as lavouras podem ser acometidas por doenças de origem bacteriana, viral ou nematológica. Parte das doenças afetam a cultura ainda no campo, outra parte, afetam os produtos na fase pós colheita.

Algumas doenças de etiologia bacteriana incluem: Podridão-mole e Podridão bacteriana da escama sendo que, o controle, consiste basicamente na procedência adequada dos bulbos e sementes, controle de insetos e correto armazenamento (FREIRE et al., 2007). Dentre as doenças causadas por vírus vale ressaltar o Mosaico em faixas ou Nanismo amarelo (OYDV), principalmente transmitida por pulgões. O procedimento para controle inclui eliminação das plantas hospedeiras e revezamento do plantio com espécies de outras famílias, visando a interrupção do ciclo viral.

A alternativa atualmente utilizada para controle das pragas em lavouras, tem sido o emprego de produtos químicos que atuam como inseticidas, herbicidas, nematicidas, fungicidas e bactericidas.

Os fungicidas são substâncias químicas aplicadas em vegetais com o intuito de controlar a proliferação dos micro-organismos que afetam diretamente o crescimento e/ou desenvolvimento dos vegetais de diversas formas. Os mecanismos de ação dos fungicidas divergem entre si quanto à finalidade de atuação nos fungos, sendo

classificados de acordo com as normas estabelecidas pelo FRAC (Fungicide Resistance Action Committee).

Em um estudo realizado por Brand et al., (2006), os fungos de maior incidência, em sementes de cebola, são: *Penicillium* spp (45,5%); *Aspergillus* spp (9%); *Trichoderma* spp (2,5%) e em seguida *Rhizopus* spp (0,5%). Como forma de tratamento para essas doenças, atualmente, as alternativas implicam na utilização de fungicidas ou terapias gênicas.

3.3. PLASMA

O plasma físico também é conhecido como plasma gasoso ou elétrico e é gerado como resultado da utilização de um meio gasoso. A utilização do gás promove ionização parcial ou total e, além disso, pode haver emissão de raios ultravioleta (UV) e/ou geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), no momento da aplicação. O fato de não representar um meio sólido, líquido ou gasoso, o plasma passou a ser denominado como o “quarto estado da matéria” (ALKAWAREEK et al., 2012; BOURKE et al. 2017).

Os plasmas elétricos podem ser de alta ou baixa temperatura. O jato de plasma de baixa temperatura consiste na utilização de gases nobres como argônio e hélio e/ou gases que são ativos quimicamente, como oxigênio e nitrogênio. Dessa forma, o ambiente formado durante a irradiação se torna altamente reativo. Essa categoria de plasma vem conquistando um amplo espectro de aplicações, pois em curtos tempos de aplicação suas temperaturas permanecem em nível ambiente equivalente a 25°C e a aplicação em micro-organismos tem sido intensificada (FRICKE et al., 2012). Além da caracterização do tipo de plasma quanto à temperatura, também deve-se avaliar a geometria dos eletrodos durante a irradiação, sendo ela em forma de descargas de barreira dielétrica (DBD), descargas de arco deslizante (*gliding arc*), microplasmas ou jato de plasma (LAROUSSE, 2002; NEHRA et al. 2008; SCHOLTZ et al. 2015). A pressão aplicada no sistema de plasma durante a irradiação também pode classificá-lo em plasma de pressão atmosférica (760mmHg) ou sub-atmosférico.

O plasma é uma tecnologia limpa, isto porque o tratamento não produz resíduos poluentes, fato que, o apresenta como uma importante alternativa substituir os tratamentos clássicos do tipo mecânico ou químico, pois neste processo são usados

reagentes não tóxicos, fáceis de manipular e em pequenas quantidades. Neste contexto, o uso de tecnologias alternativas e ecologicamente corretas, como a tecnologia de plasmas frios, vem se despontando na área médica (KITAZAKI et al., 2012) e, nos últimos anos, na área agrícola (ŠERÁ et al., 2010; PUAČ, GHERARDI, SHIRATANI, 2017).

O mecanismo de ação do plasma ainda não foi bem definido, havendo o levantamento e investigação de diversas hipóteses e questionamentos quanto à interação com células e tecidos vivos. A inativação de micro-organismos é uma área promissora para o estudo e aplicação de novas tecnologias de controle com o plasma elétrico, pois, atualmente, a eliminação de patógenos é uma tarefa desafiadora, principalmente pelo fator da resistência terapêutica adquirida (FRICKE et al., 2012). Alguns trabalhos tem surgido na área de plasma associado à saúde, sabendo que estudos demonstram grande potencial, inclusive fungicida, do tratamento de plasma (FANTOVA et al., 2013; KOSTOV et al., 2014). De acordo com DORIA et al., (2015b), o tratamento de plasma elétrico foi capaz de inibir o crescimento de leveduras do gênero *Candida*, de importância médica, em materiais similares aos utilizados em cateteres venosos centrais, constituindo um grande avanço de uma tecnologia eficaz e promissora. Diferentes microrganismos apresentam características singulares de interação e reação frente à algum tipo de tratamento feito por plasma, ainda que sejam pertencentes ao mesmo gênero de classificação (DORIA et al, 2018). Pelo fato do plasma representar uma tecnologia amplamente adaptável, carrega consigo diversos perfis de aplicação.

3.3.1. Plasma na agricultura

Estudos direcionados à aplicação de plasmas elétricos na agricultura tem aumentado de forma exponencial, havendo diversas perspectivas de abordagens e investigações sobre os mecanismos de ação. Alguns estudos investigam a interação e possível favorecimento da germinação e na qualidade de sementes mediante ao tratamento com diferentes tipos de plasma em pressão atmosférica (VOLIN et al., 2000; JIANG et al., 2014; LING et al., 2015; RANIERI et al, 2020). Além do tratamento direto feito nas amostras, é possível aplicar o tratamento em meios como a água. Neste caso, a água passa a ser tratada com plasma e carrega os benefícios em sua composição, transferindo-os para a amostra desejada, sementes ou mudas,

por exemplo. Esse processo vem sendo amplamente desenvolvido e utilizado em pesquisas (RANIERI et al, 2020). Outros estudos fazem referência ao potencial antimicrobiano do plasma quando aplicado em diferentes tipos de sementes e estudo da inibição do crescimento de micro-organismos de relevância na agricultura (KAMGANG-YOUBI et al., 2009; SELCUK; OKSUZ; BASARAN, 2008).

A molhabilidade é um fenômeno físico que apresenta efeitos diretos sobre a natureza e está relacionada à diferentes interações intermoleculares entre um líquido e um sólido, apresentando diferentes propriedades umectantes (Zhao, Jiang, 2017). Quanto maior a molhabilidade de uma superfície, maior será a capacidade dela em interagir com um líquido. Sendo assim, quanto menor for o ângulo de contato de um sólido com a água, maior será capacidade deste sólido em absorvê-la. No estudo realizado por Holubová (2021), após os tratamentos de plasma, o ângulo do contato com a água nas amostras foi reduzido em aproximadamente 50% havendo diferença entre os resultados obtidos com os plasmas de ar e oxigênio quando comparados ao plasma de nitrogênio. Este fato reforça que o mecanismo de ação e interação entre os compostos é diferenciado, abrindo precedente para diversos estudos acerca da aplicação dessa técnica.

Novas metodologias para o tratamento de água tem sido desenvolvidos e, entre eles, também pode ser citado o emprego de plasma (TRAYLOR et al., 2011). A água tratada tem sido aplicada em diversos substratos e mostrado resultados significativos e promissores (KAMGANG-YOUBI et al., 2009). Corroborando as ideias de Attri et al (2020), o plasma inclui uma vasta gama de utilidades e conformações, incluindo diversos mecanismos de atuação promissores quanto à aplicação em sementes e mudas, porém os estudos necessitam ser aprimorados e aplicados na realidade absoluta da lavoura, caso contrário, não serão descobertas úteis para a sociedade. Apesar de resultados promissores, a possibilidade de aplicação direta no campo ainda gera muitos questionamentos (Yan et al, 2022).

3.4. JUSTIFICATIVA

O Brasil participa ativamente do mercado mundial em produção e comércio de alimentos sendo, a atividade de produção de sementes, uma das mais importantes no Agronegócio de uma maneira geral e a associação de patógenos com semente uma preocupação antiga. Embora a análise sanitária não seja exigida pelo Ministério

da Agricultura e, por vezes, a fiscalização e controle não sejam rigorosos, é uma necessidade constante e primordial para seus produtores, uma vez que, além de ser um parâmetro na determinação da qualidade da semente, pode auxiliar também no monitoramento e controle de diversas doenças.

Tendo em vista os problemas enfrentados na agricultura quanto à contaminação microbiológica das sementes, a emergente utilização do plasma na área biológica e seu potencial antimicrobiano já relatado, o presente estudo sustenta a ideia de uma nova alternativa no tratamento e preservação da qualidade das sementes da cultura da cebola quanto à contaminação fúngica, utilizando uma tecnologia sustentável, acessível financeiramente, eficaz e inovadora, podendo ser uma alternativa no controle sanitário dessas sementes.

4. METODOLOGIA

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Plasmas Elétricos (Biotecplasma) do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento em parceria com o Centro de Diagnóstico Laboratorial (CDLAB) da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS), ambos da Universidade do Vale do Paraíba, campus Urbanova.

4.1. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS FÚNGICAS

O fungo utilizado neste experimento foi selecionado mediante frequência de contaminação relatada por BRAND et al., (2006). O isolamento do fungo de sementes de cebola foi realizado de forma que algumas sementes de cebola foram submetidas ao processo de germinação e, naturalmente, apresentaram contaminações fúngicas conforme Figura 1.

Figura 1 - Sementes de cebola submetidas ao processo de germinação, que apresentaram contaminações naturais.



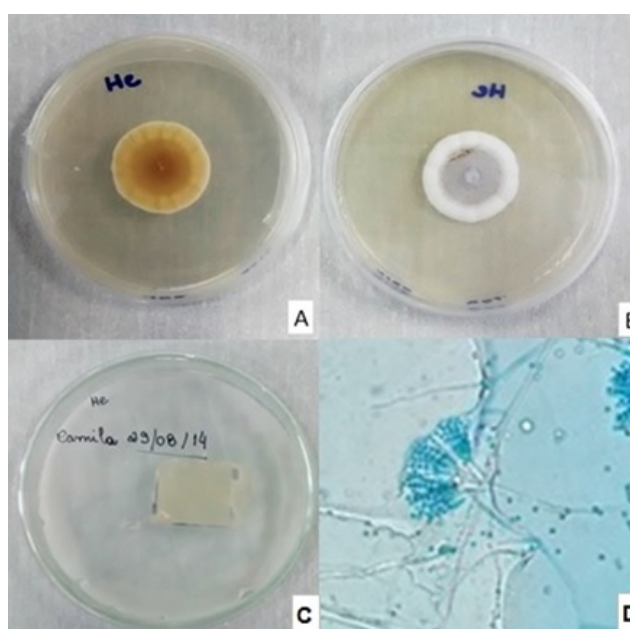
Fonte: o autor.

A semente contaminada foi separada das demais e, com auxílio de agulha de platina flambada, foi efetuada a semeadura em meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar) e incubação a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa microbiológica. Após

crescimento radial da colônia, a cepa foi submetida ao protocolo de microcultivo de para consequente identificação morfológica microscópica, conforme Figura 2D.

As técnicas de microcultivo para análise microscópica e, consequente, identificação presuntiva foram realizadas de acordo com as normas no (BRASIL; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA., [s.d.]).

Figura 2 - Imagens da identificação fúngica presente na amostra de sementes de cebola.



A) Reverso da colônia; B) Verso da colônia; C) Microcultivo e D) Análise microscopia do fungo filamentos, utilizando corante azul de algodão indicando o gênero *Penicillium* sp (aumento de 400X). Fonte: o autor.

Os fungos foram cultivados em placas de Petri, contendo meio de cultura sólido, e o repique dos mesmos foi realizado mensalmente, em ágar batata (PDA), com temperatura de armazenamento em torno de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.1.1. Preparação das amostras fúngicas

Inicialmente, visando a padronização da técnica de irradiação das amostras por plasma e mensuração da resistência e/ou sensibilidade dos micro-organismos perante a aplicação das diferentes composições de plasma elétrico. Para isso, foram

realizadas três tentativas de inoculação dos fungos, em placas de Petri, garantindo seleção da técnica que representasse com maior veracidade os aspectos fungicidas estudados neste trabalho. A amostra fúngica selecionada para realizar os testes iniciais de resistência e/ou sensibilidade perante os tratamentos de plasma, foi a cepa isolada previamente de sementes de cebola, tendo em vista o alto índice de ocorrência do fungo na natureza e em processos de deterioração de alimentos.

Figura 3 - Colônia de Penicillium em crescimento radial sobre placa contendo ágar batata.

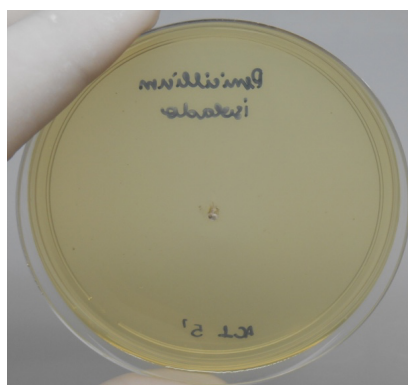


Fonte: o autor.

4.1.1.a. Semeadura por “pique” central

O primeiro teste consistiu na semeadura por “pique”, na qual, com auxílio de uma alça de platina flambada, uma porção do fungo selecionado foi removida da macrocolônia original e inoculada em posição central nas placas de Petri contendo ágar batata e, posteriormente, submetidas ao processo de irradiação por plasma.

Figura 4 - Placa contendo ágar batata, submetido à técnica de semeadura com pique central.



Fonte: o autor.

4.1.1.b. Semeadura diluída por espalhamento

A segunda técnica testada consistiu na remoção de uma quantidade da colônia original, com alça calibrada estéril, e espalhamento completo por estrias no sentido “vai e vem”, em toda a superfície das placas de Petri contendo ágar batata. Após a semeadura, as placas foram expostas aos diferentes tipos de tratamento por plasma.

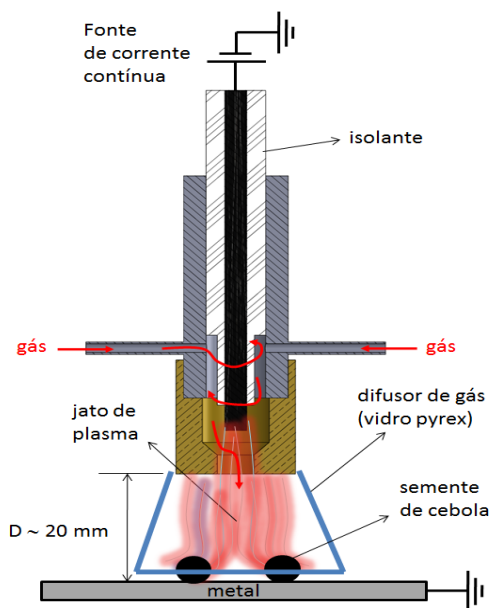
4.1.1.c. Semeadura pura por espalhamento com alça

Por fim, o terceiro protocolo utilizado consistiu na semeadura diluída do fungo previamente isolado. Para tal, foi necessário dispor de 2,5 ml de solução fisiológica 0,9% estéril, acrescida de 3 vezes a remoção de porções da colônia original, com alça calibrada estéril. Este inóculo foi homogeneizado com auxílio do Vortex, visando a separação das hifas e melhora da qualidade da dissolução dos fungos filamentosos no volume total de líquido. Para efetivar a semeadura nas placas de Petri, 100µl do inóculo preparado foram removidos com pipeta automática e dispostos nas placas previamente preenchidas com ágar batata. Utilizando alças de Drigalski estéreis e descartáveis, o inóculo diluído foi semeado por espalhamento, visando preenchimento total da superfície da placa com fungos. Após o procedimento, as placas foram igualmente submetidas aos tratamentos.

4.1.2. Irradiação das amostras fúngicas

Na irradiação das amostras, foi utilizado um reator de arco deslizante, conforme ilustrado na figura 5, cuja geometria permite a exaustão do gás em vórtex reverso e a geração do plasma é feita por fonte de corrente contínua (10 kV). Os gases utilizados foram o Argônio, Hélio e ar comprimido gerado por compressor médico/odontológico. Abaixo do reator foi colocado um porta-amostras a uma distância de 20 mm, fato que permitiu o posicionamento das amostras na região de pós-descarga.

Figura 5 - Esquema do reator de jato de plasma não térmico de argônio/oxigênio ou hélio/oxigênio utilizado no experimento.



Fonte: o autor.

Para este trabalho, foram selecionadas 5 diferentes composições do plasma, com fluxo total de 10L/min, para efetuar as irradiações propostas neste trabalho, de acordo com relevância e disponibilidade técnica.

Tabela 2 - Composição dos diferentes tipos de plasma elétrico aplicados nas amostras.

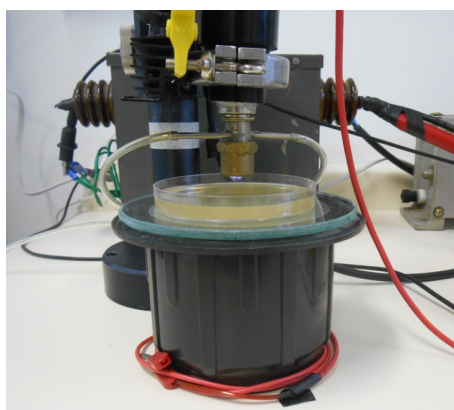
COMBINAÇÕES	PROPORÇÃO
Argônio	Ar 100%
Argônio + Ar Comprimido	Ar 50% + AC 50%
Ar Comprimido	AC 100%
Hélio + Ar Comprimido	He 50% + AC 50%
Hélio	He 100%

Fonte: o autor.

Havendo sido determinada a constituição dos gases para gerar o plasma, foram iniciadas as irradiações pelo equipamento desenvolvido, nos tempos de zero, definido como grupo controle, cinco, dez e quinze minutos consecutivos de exposição tratamento. Durante a operação do protocolo, foram efetuadas medidas constantes de temperatura, utilizando um sistema de aquisição de dados por micro controlador, com um termopar tipo K que coleta os dados captados por micro controlador modelo NI USB 6008 (National Instruments) que analisa, converte os dados e apresenta em função do tempo. Concomitantemente, foram capturadas imagens térmicas, utilizando câmera de infravermelho modelo TiS10 (Fluke) com faixa de medição de temperatura entre -20°C e 250°C , visando avaliar a temperatura efetiva das amostras.

Após as irradiações (figura 6), as placas foram incubadas a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 10 dias e, durante o período, foram efetuadas verificações periódicas para controle do crescimento fúngico. Ao final do período de incubação, houve avaliação do crescimento microbiológico e compilação dos respectivos dados.

Figura 6 - Sistema de plasma durante o processo de irradiação das amostras de micro-organismos semeados em placas de Petri contendo ágar batata.



Fonte: o autor.

4.1.3. Avaliação dos resultados

Após incubação das placas irradiadas com plasma, foram avaliados os aspectos morfológicos de crescimento dos micro-organismos de forma macroscópica.

As diferentes técnicas aplicadas foram comparadas para seleção do protocolo mais adequado visando a obtenção de dados que mais se aproximassem da realidade do perfil de resistência e/ou sensibilidade do fungo isolado de sementes de cebola. As irradiações foram efetuadas em duplicata para favorecer a comparação e comprovação dos resultados obtidos.

4.2. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DE SEMENTES

As amostras iniciais de sementes de cebola foram obtidas comercialmente da empresa Hortices Sementes®, estando estas, livres de agentes contaminantes, obedecendo assim, os padrões sanitários vigentes. As sementes selecionadas possuem 99% de pureza, não devendo ser aplicado o processo de peneiramento, requerido pelo protocolo do Manual de Análise Sanitária de Sementes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MACHADO et al., 2009).

As sementes foram escolhidas ao acaso e separadas aleatoriamente em três grupos conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Determinação dos grupos de sementes de cebola

GRUPO 01: <i>"in natura"</i>	GRUPO 02: sementes contaminadas com cepa ATCC	GRUPO 03: sementes contaminadas com cepa isolada previamente
A1: Sementes não tratadas (controle negativo)	A2: Sementes não tratadas (controle positivo)	A3: Sementes não tratadas (controle positivo)
B1: Sementes com tratamento de plasma	B2: Sementes com tratamento de plasma	B3: Sementes com tratamento de plasma

Fonte: o autor.

4.2.1. Protocolo de contaminação das sementes

A preparação do inóculo fúngico para contaminação das sementes consistiu na raspagem na colônia original, com alça calibrada, cinco vezes e posterior diluição em 5 ml de salina 0,9% estéril. O conteúdo foi agitado vigorosamente com intuito de favorecer a separação dos “grumos”, habitualmente formados por fungos filamentosos. O fungo ATCC utilizado para confecção do inóculo aplicado ao grupo 2, foi *Penicillium candidum* e a cepa de *Penicillium* sp aplicada ao grupo 3, foi isolada conforme item 4.1 da metodologia descrita neste trabalho.

As sementes do grupo 1 foram mantidas “*in natura*”, não havendo nenhum emprego de contaminação prévia, enquanto que, as sementes do grupo 2 e 3, foram dispostas em placas de Petri e submetidas a contaminação de modo que, cada semente recebeu 10 µl de inóculo fúngico, e foi submetida a secagem em estufa a 25°C por, aproximadamente, 30 minutos.

O número amostral selecionado foi de 22 sementes para cada processo (inclusive grupo controle, sem tratamento) e o procedimento foi efetuado em duplicata.

4.2.2. Irradiação das amostras de sementes

As irradiações foram efetuadas com um jato de plasma operado em corrente contínua cuja geometria foi descrita no item 4.1.2.

Ao fim do protocolo de tratamento, as sementes foram submetidas a processo de germinação e, conseqüente, avaliação dos efeitos do plasma sob as amostras.

4.2.3. Avaliação dos resultados – sementes

A avaliação dos resultados do tratamento do plasma nas amostras de sementes de cebola foi realizada em duas etapas, sendo a primeira relacionada com o processo germinativo, na qual estabelece se houve possível interferência ou colaboração do tratamento aplicado nas amostras, e a segunda na verificação de contaminações que acometeram a amostra durante o período de incubação.

Em fluxo laminar, as sementes de cebola, imediatamente após as irradiações, foram dispostas em grandes placas de Petri, contendo 2 camadas de papel filtro, ambos esterilizados previamente (LING et al., 2015; SELCUK; OKSUZ; BASARAN, 2008). Essas placas foram mantidas em temperatura controlada (22°C ± 2°C), sem

incidência direta de luz solar e com regime de 12h/12h de luminosidade, visando a indução da germinação das sementes, representando condições ambientais típicas necessárias para desenvolvimento (MACHADO et al., 2009).

4.2.3.a. Avaliação do potencial antifúngico do plasma

Durante o processo de germinação das sementes, foi avaliado o número de contaminações que ocorreram nas amostras. Tanto os crescimentos fúngicos em forma de UFC, quanto os crescimentos fúngicos observados sobre as sementes, foram considerados e classificados neste trabalho como indícios de contaminação.

4.2.3.b. Avaliação da viabilidade germinativa das sementes

A rega foi efetuada no ato da acomodação das sementes sobre o papel filtro e, diariamente, conforme necessidade visível de água, evitando encharcamento das amostras e consequente prejuízo no desenvolvimento germinativo (MACHADO et al., 2009). A umidificação foi realizada dentro do fluxo laminar, com pipeta de Pasteur e água destilada, ambas estéreis, na borda mais externa do papel, até obter nível homogêneo de umidade no recipiente. As placas foram tampadas e redirecionadas para regime de incubação.

O acompanhamento da análise germinativa das sementes foi efetuado entre o 1º e 10º dia, onde houve observação macroscópica do desenvolvimento morfológico do vegetal, sendo computado diariamente dados referentes ao número de sementes que iniciaram o processo de brotamento, avaliado mediante eclosão da casca pelo embrião.

4.3. AVALIAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS SEMENTES POR MEV

O emprego de Microscopia Eletrônica de Varredura é uma técnica amplamente utilizada para análise morfológica qualitativa de estruturas em larga escala de aumento no zoom da imagem, viabilizando comparação e possível avaliação da fixação de células fúngicas à superfície das amostras de semente e possíveis prejuízos gerados à semente de cebola mediante o processo de irradiação por plasma.

Ao final dos procedimentos de irradiação, as sementes foram separadas em placas de Petri vazias (apenas para transporte) e encaminhadas para o laboratório, onde precisaram ser preparadas com “banho de ouro” para posterior análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) onde, avaliou-se estrutura morfológica externa das sementes.

Para os ensaios analíticos com MEV, foram usados A: sementes *in natura*, B: sementes *in natura* tratadas com plasma de Ar+AC por 10 minutos, C: sementes previamente contaminadas com *Penicillium* isolado, D: sementes previamente contaminadas com *Penicillium* isolado e submetidas ao tratamento com plasma de Ar+AC por 10 minutos, E: sementes *in natura* tratadas com plasma de Ar+AC por 10 minutos e cortadas de modo sagital e F: sementes *in natura* cortadas de modo sagital.

5. RESULTADOS

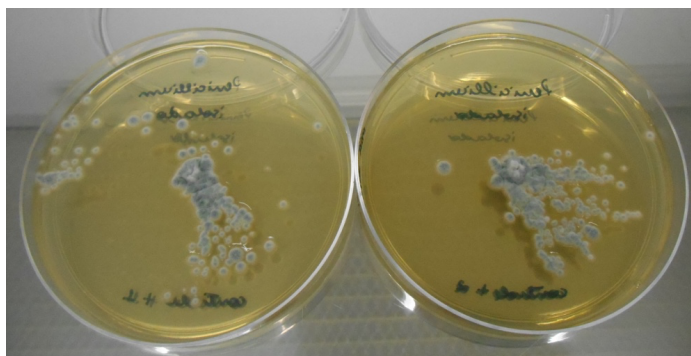
Os resultados adquiridos foram agrupados e analisados conforme os diferentes aspectos e protocolos utilizados para realização dos experimentos, e correlacionados de acordo com a relevância.

5.1. AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS FÚNGICAS

O primeiro aspecto analisado, quanto ao crescimento fúngico da cepa de *Penicillium* sp, isolada previamente de sementes, foi referente ao método de semeadura aplicado em cada placa de Petri, para posterior irradiação com plasma.

A metodologia descrita no item 4.1.1.a., de semeadura por “pique” foi descartada levando em consideração que as células fúngicas e/ou seus respectivos esporos foram dissipados pela superfície do meio de cultura, em baixos períodos de tratamento ($T = 5$ minutos), conforme figura 7. Este fato foi presuntivamente relacionado com o fluxo de gás aplicado ao sistema de geração de plasma, durante as irradiações e, dessa forma, acreditamos que o protocolo não representaria de modo fidedigno o potencial fungicida do plasma.

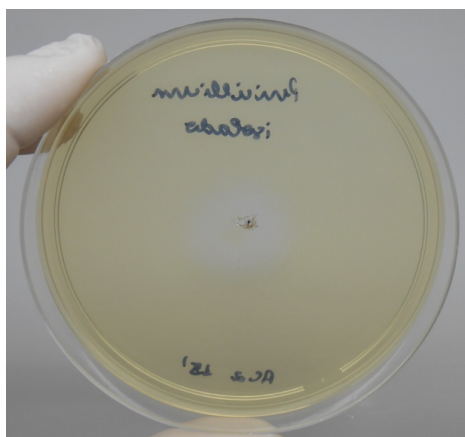
Figura 7 - Placas de Petri contendo ágar batata e amostras de *Penicillium* após irradiações que foram ineficientes para controlar o crescimento fúngico.



Fonte: o autor.

Os períodos de tratamento iguais ou superiores a 10 minutos, não apresentaram nenhum tipo de crescimento, apenas uma ligeira descoloração na porção central do meio de cultura, que representa o local da aplicação do plasma, conforme figura 8.

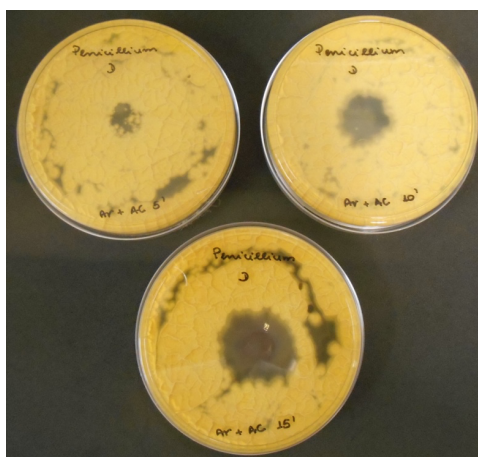
*Figura 8 - Placas de Petri contendo ágar batata e amostras de *Penicillium* após irradiações que foram capazes de controlar o crescimento fúngico.*



Fonte: o autor.

A semeadura efetuada por diluição do micro-organismo em solução fisiológica (item 4.1.1.b.), apresentou diversas falhas quanto ao preenchimento da superfície do meio de cultura por colônias do fungo filamentososo, sendo assim, foi descartado o uso desta metodologia, tendo em vista os resultados falsamente empregados quanto à classificação do perfil de sensibilidade e/ou resistência fúngica frente ao tratamento com plasma, conforme figura 9. Havendo a formação de halos centrais, na porção referente à zona de atuação do plasma, os mesmos foram medidos mas, este fato foi comprometido devido às falhas de crescimento descritas acima.

Figura 9 - Placas de ágar batata, contendo amostra fúngica diluída, semeada e tratada com plasma, representando falhas quanto ao preenchimento da superfície.



Fonte: o autor.

A aplicação da técnica por semeadura direta da colônia, com alça calibrada, foi a mais promissora tendo em vista o preenchimento total da superfície do meio de cultura por crescimento do fungo selecionado.

Havendo sido levado em consideração as falhas e, consequentes déficits nas análises propostas pelas técnicas de semeadura, que não foram de forma direta, os resultados referentes a temperatura, condições de irradiação e mensuração dos halos de inibição não foram efetuados e/ou expressos de modo inconclusivo para serem apresentados neste tópico.

Sendo assim, os resultados obtidos por meio da técnica de semeadura pura e direta, puderam qualificar o perfil de resposta dos fungos frente aos diferentes tratamentos propostos neste estudo, nos quais apresentaram formações de halos inibitórios de tamanhos diferentes que variaram de acordo com a proporção e o tipo de gás utilizado no sistema de plasma e tempo de exposição da amostra ao tratamento, conforme figura 10.

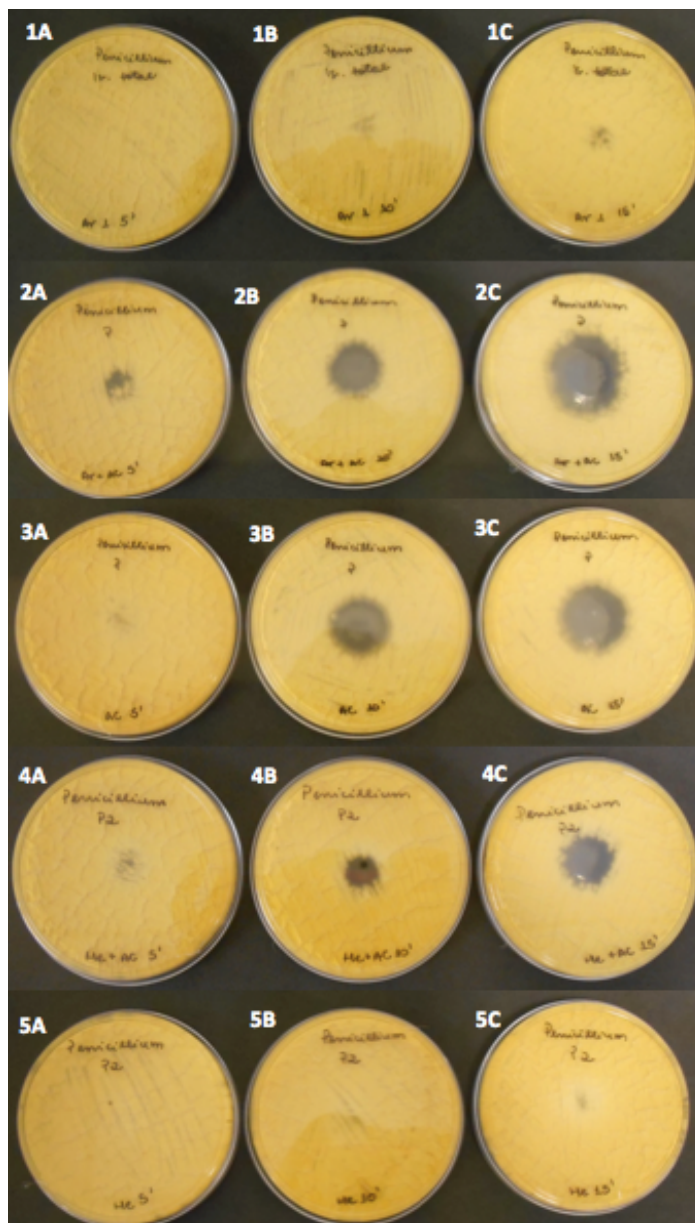
As diferentes composições do plasma, utilizaram tensões diferentes no sistema, sendo elas descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Diferentes combinações, proporções e tensões dos respectivos tratamentos de plasma.

COMBINAÇÕES	PROPORÇÃO	TENSÃO
Argônio	Ar 100%	0,4 V
Argônio + Ar Comprimido	Ar 50% + AC 50%	2,5 V
Ar Comprimido	AC 100%	3,8 V
Hélio + Ar Comprimido	He 50% + AC 50%	0,6 V
Hélio	He 100%	2,4 V

Fonte: o autor.

Figura 10 - Placas contendo ágar batata e cultura de Penicillium após tratamentos com diferentes composições de plasma.



Linha 1: plasma composto por 100% de Argônio, 1A: 5, 1B: 10 e 1C: 15 minutos de tratamento; Linha 2: plasma de 50% Argônio com 50% Ar Comprimido, 2A: 5, 2B: 10 e 2C: 15 minutos de tratamento; Linha 3: plasma de 100% Ar Comprimido, 3A: 5, 3B: 10 e 3C: 15 minutos; Linha 4: plasma de 50% Hélio e 50% Ar Comprimido, 4A: 5, 4B: 10 e 4C: 15 minutos de tratamento e Linha 5: plasma de 100% Hélio, 5A: 5, 5B: 10 e 5C: 15 minutos de tratamento. Fonte: o autor.

A Tabela 5 representa o tipo de tratamento aos quais as amostras foram submetidas com seus respectivos tamanhos de halo de inibição formado no centro da placa.

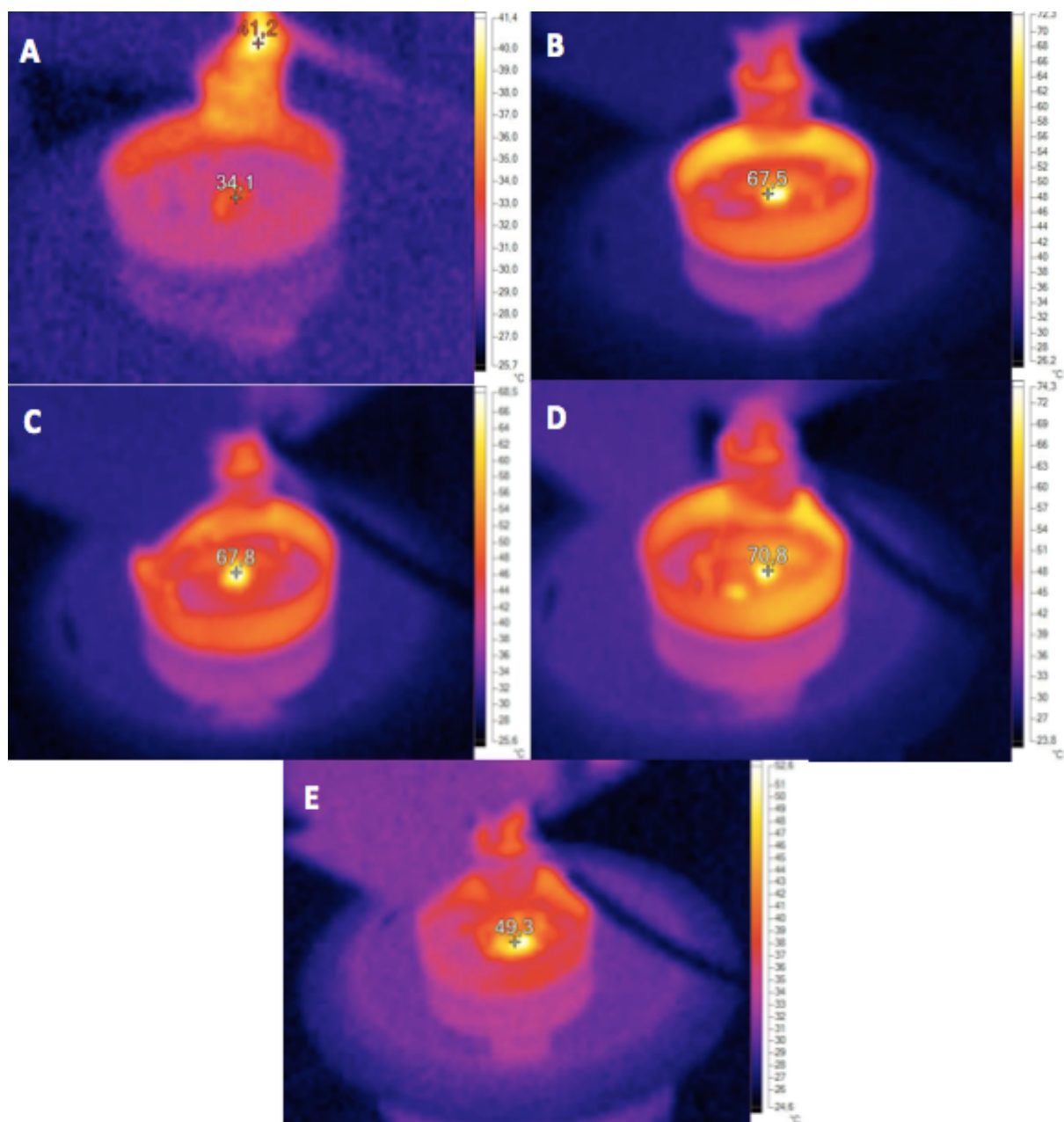
Tabela 5 - O Tabela representa os diferentes tratamentos de plasma, nos tempos de 5, 10 e 15 minutos e seus respectivos valores de temperatura máxima atingida durante a irradiação e o halo médio formado nas placas.

Argônio	
TEMPO	HALO MÉDIO
5 minutos	0 mm
10 minutos	0 mm
15 minutos	0 mm
Argônio + Ar Comprimido	
TEMPO	HALO MÉDIO
5 minutos	8,25 mm
10 minutos	19,95 mm
15 minutos	26,35 mm
Ar Comprimido	
TEMPO	HALO MÉDIO
5 minutos	0 mm
10 minutos	17,80 mm
15 minutos	24,90 mm
Hélio + Ar Comprimido	
TEMPO	HALO MÉDIO
5 minutos	0 mm
10 minutos	10,70 mm
15 minutos	16,70 mm
Hélio	
TEMPO	HALO MÉDIO
5 minutos	0 mm
10 minutos	0 mm
15 minutos	0 mm

Fonte: o autor.

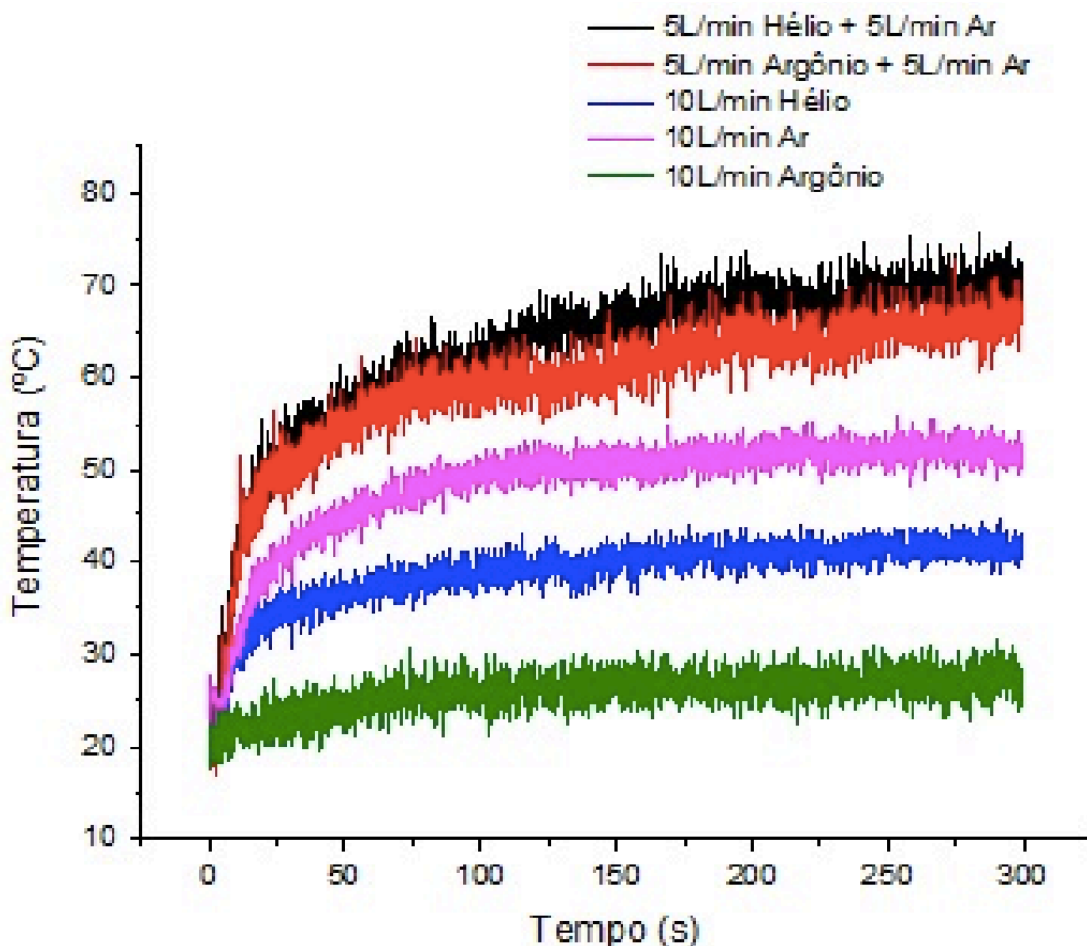
Na figura 11, é possível visualizar as imagens térmicas capturadas que demonstram a temperatura das sementes durante os tratamentos, enquanto na figura 12 observa-se a curva de aquecimento gerado pelo sistema sobre as amostras.

Figura 11 - Imagens obtidas pela câmera térmica.



(A) representa a temperatura atingida durante a irradiação de sementes de cebola com plasma de Argônio, (B) representa irradiação das amostras com plasma de 50% Argônio e 50% Ar Comprimido, (C) corresponde à a mostras tratadas com plasma de Ar Comprimido, (D) são amostras tratadas com plasma composto de 50% gás Hélio associado ao Ar Comprimido e, por fim, (E) representa a temperatura obtida durante a irradiação das amostras de sementes de cebola com plasma composto por 100% gás Hélio. Fonte: o autor.

Figura 12 - O gráfico representa a curva de temperatura gerada em função de segundos, totalizando 5 minutos de irradiação, com diferentes composições de plasma.



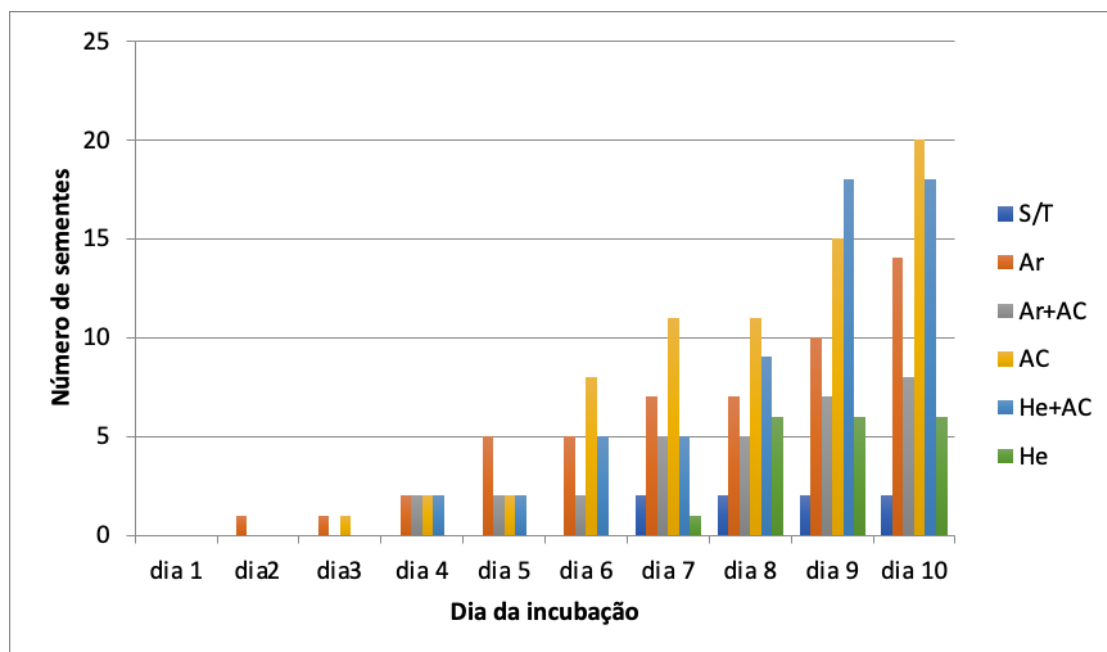
Fonte: o autor.

Tendo sido avaliado o perfil de atuação do plasma diretamente sobre as amostras fúngicas, o protocolo de contaminação e tratamento das sementes foi iniciado.

5.2. AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SEMENTES

Inicialmente as sementes foram avaliadas conforme o número de sementes que apresentaram crescimento microbiano, representando o índice de contaminação, que foi mensurado diariamente durante os 10 dias do experimento. A figura 13 representa o grupo controle que não recebeu contaminação prévia.

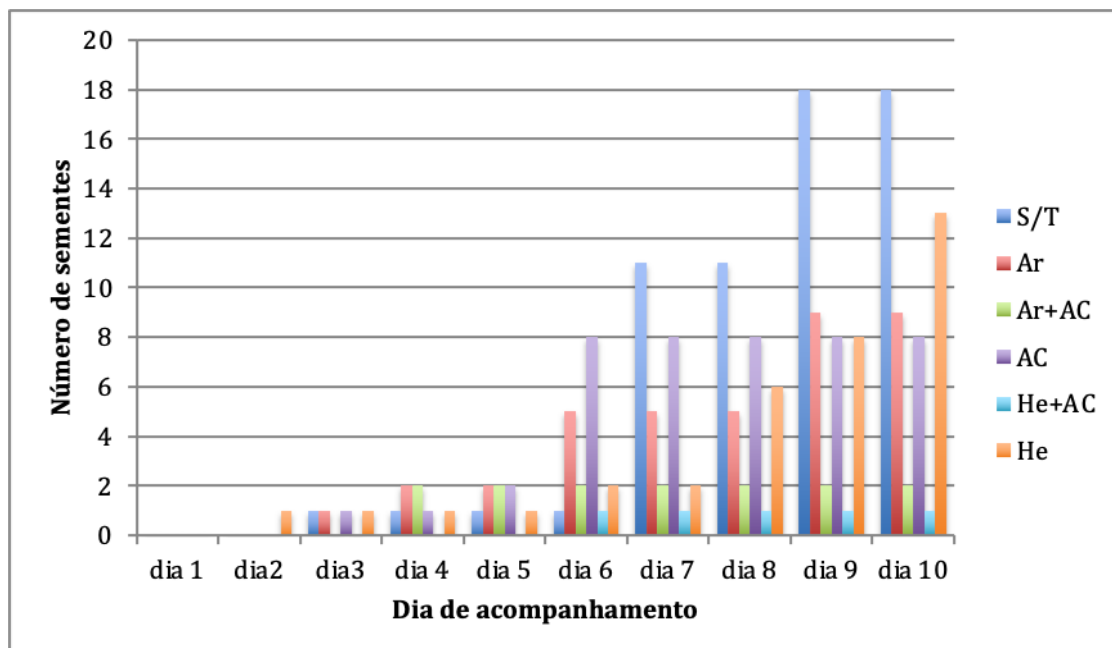
Figura 13 - Índice de contaminação de sementes do grupo controle.



Fonte: o autor.

A figura 14 representa a seleção de sementes que foi submetida à contaminação prévia com cepa ATCC e seus respectivos tratamentos associados: S/T (Sementes sem tratamento com plasma), Ar (Sementes tratadas com plasma composto de 100% gás Argônio), Ar+AC (Sementes tratadas com plasma composto de 50% gás Argônio associado com 50% Ar Comprimido), AC (Sementes tratadas com plasma composto de 100% Ar Comprimido), He+AC (Sementes tratadas com plasma composto de 50% gás Hélio associado com 50% Ar Comprimido) e He (Sementes tratadas com plasma composto de 100% de gás Hélio).

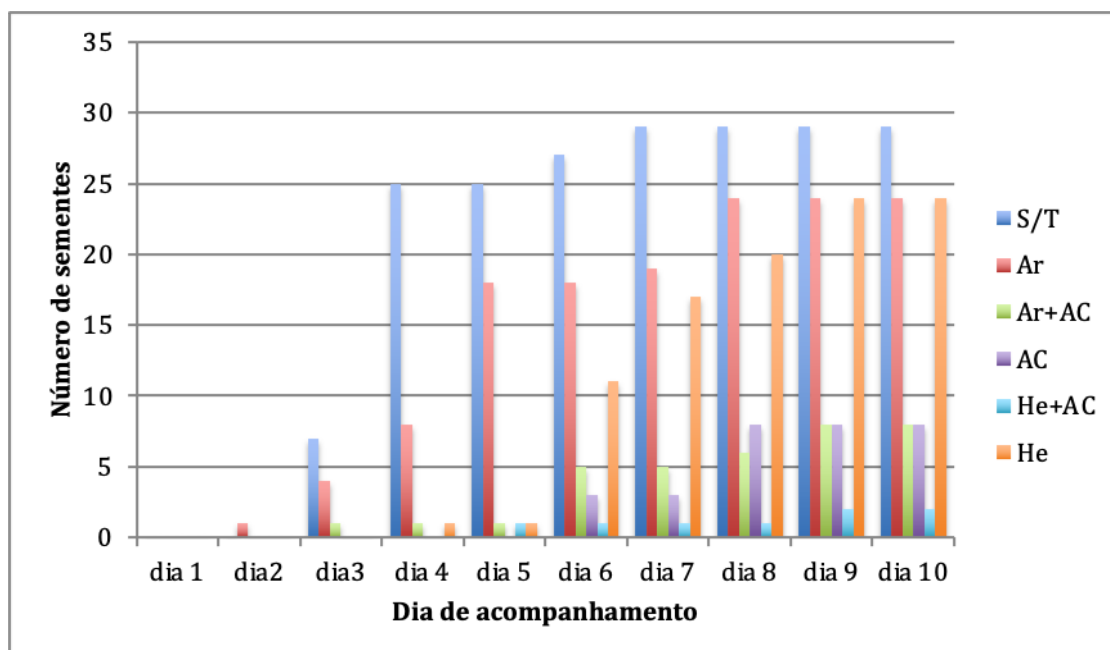
Figura 14 - Índice de sementes contaminadas mediante contaminação prévia com cepa ATCC.



Fonte: o autor.

A figura 15 representa a seleção de sementes que foi submetida à contaminação prévia com cepa isolada de *Penicillium* e seus respectivos tratamentos associados: S/T (Sementes sem tratamento com plasma), Ar (Sementes tratadas com plasma composto de 100% gás Argônio), Ar+AC (Sementes tratadas com plasma composto de 50% gás Argônio associado com 50% Ar Comprimido), AC (Sementes tratadas com plasma composto de 100% Ar Comprimido), He+AC (Sementes tratadas com plasma composto de 50% gás Hélio associado com 50% Ar Comprimido) e He (Sementes tratadas com plasma composto de 100% de gás Hélio).

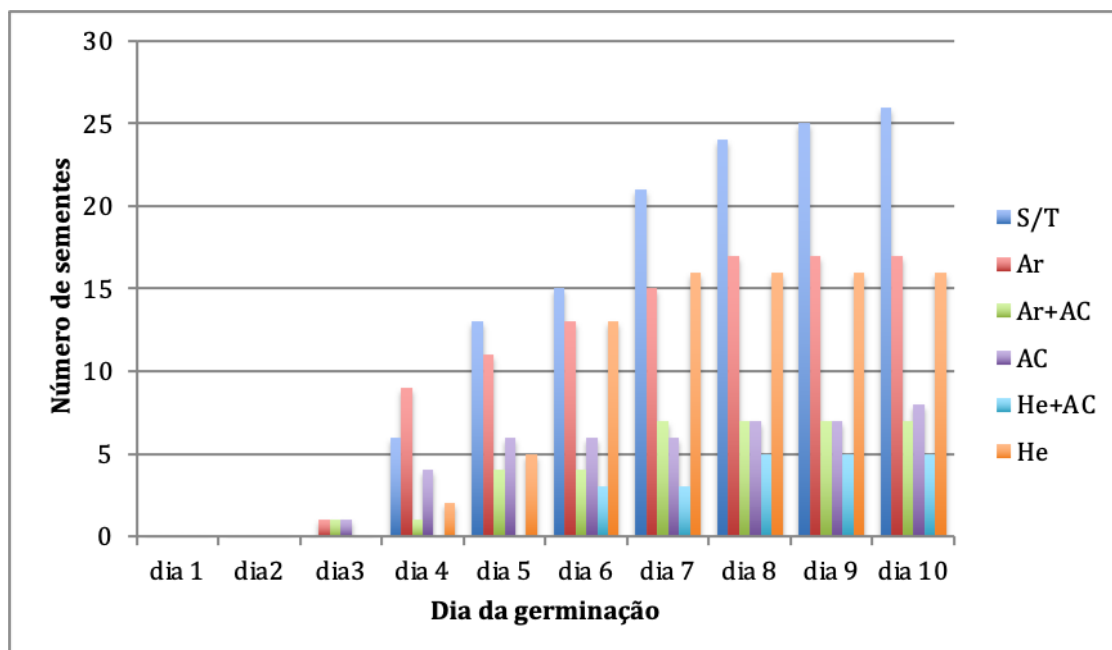
Figura 15 - Índice de sementes contaminadas mediante contaminação prévia com cepa isolada



Fonte: o autor.

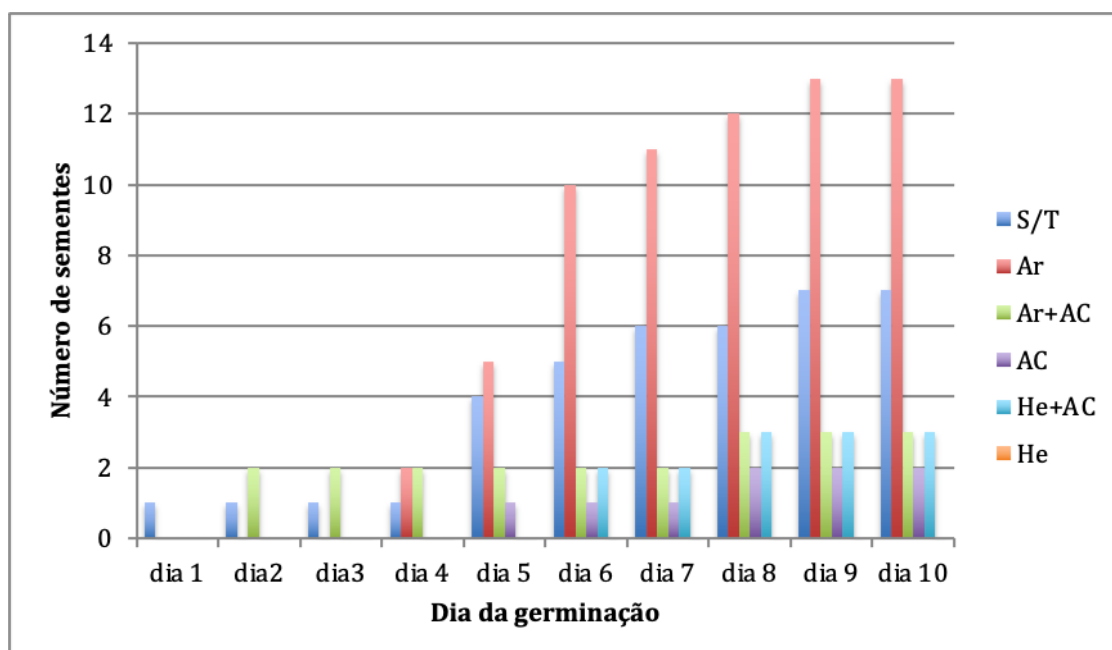
Durante o acompanhamento do desenvolvimento microbiano nas amostras de cebola, também foi avaliada capacidade da semente iniciar o processo germinativo conforme a emergência do embrião para o meio externo da casca. Sendo assim, foram obtidos resultados do índice de eclosão da casca, que representam o número de sementes em que o embrião rompeu visivelmente a casca da semente, mas que não foram submetidas ao processo contaminação prévia com qualquer tipo de micro-organismo (figura 16), com contaminação prévia das sementes, com cepa ATCC (figura 17) e sementes contaminadas previamente com cepa isolada de *Penicillium* (figura 18), nos seguintes parâmetros: S/T (Sementes sem tratamento com plasma), Ar (Sementes tratadas com plasma composto de 100% gás Argônio), Ar+AC (Sementes tratadas com plasma composto de 50% gás Argônio associado com 50% Ar Comprimido), AC (Sementes tratadas com plasma composto de 100% Ar Comprimido), He+AC (Sementes tratadas com plasma composto de 50% gás Hélio associado com 50% Ar Comprimido) e He (Sementes tratadas com plasma composto de 100% de gás Hélio).

Figura 16 - Índice de eclosão das sementes sem contaminação prévia.



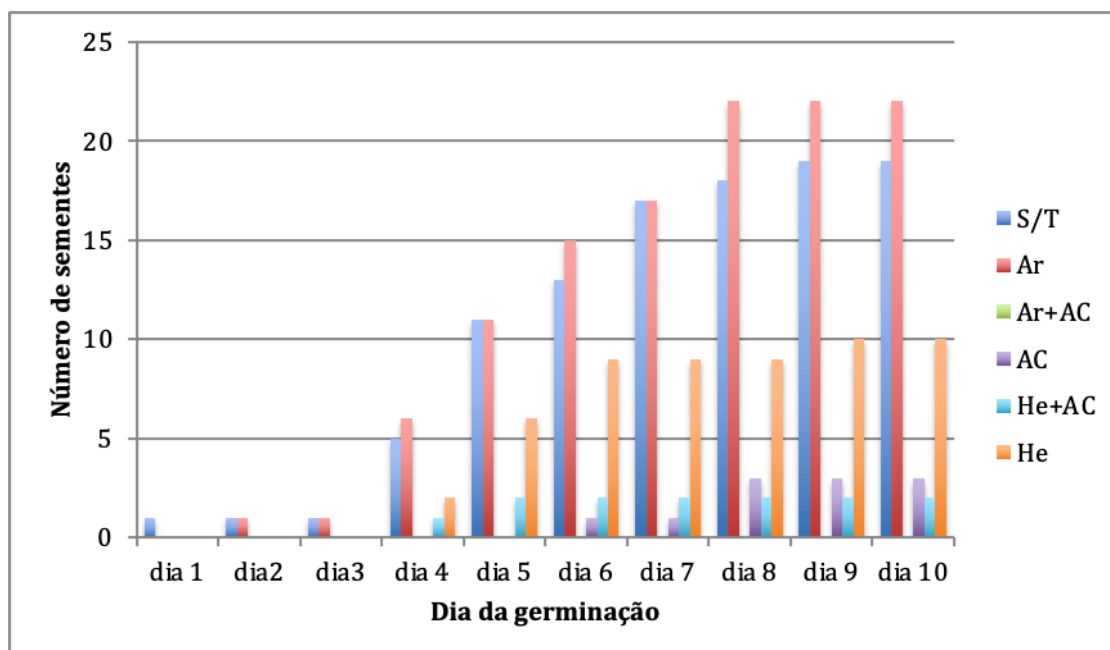
Fonte: o autor.

Figura 17 - Índice de eclosão das sementes mediante contaminação prévia com cepa ATCC.



Fonte: o autor.

Figura 18 - Índice de eclosão das sementes mediante contaminação prévia com cepa isolada.



Fonte: o autor.

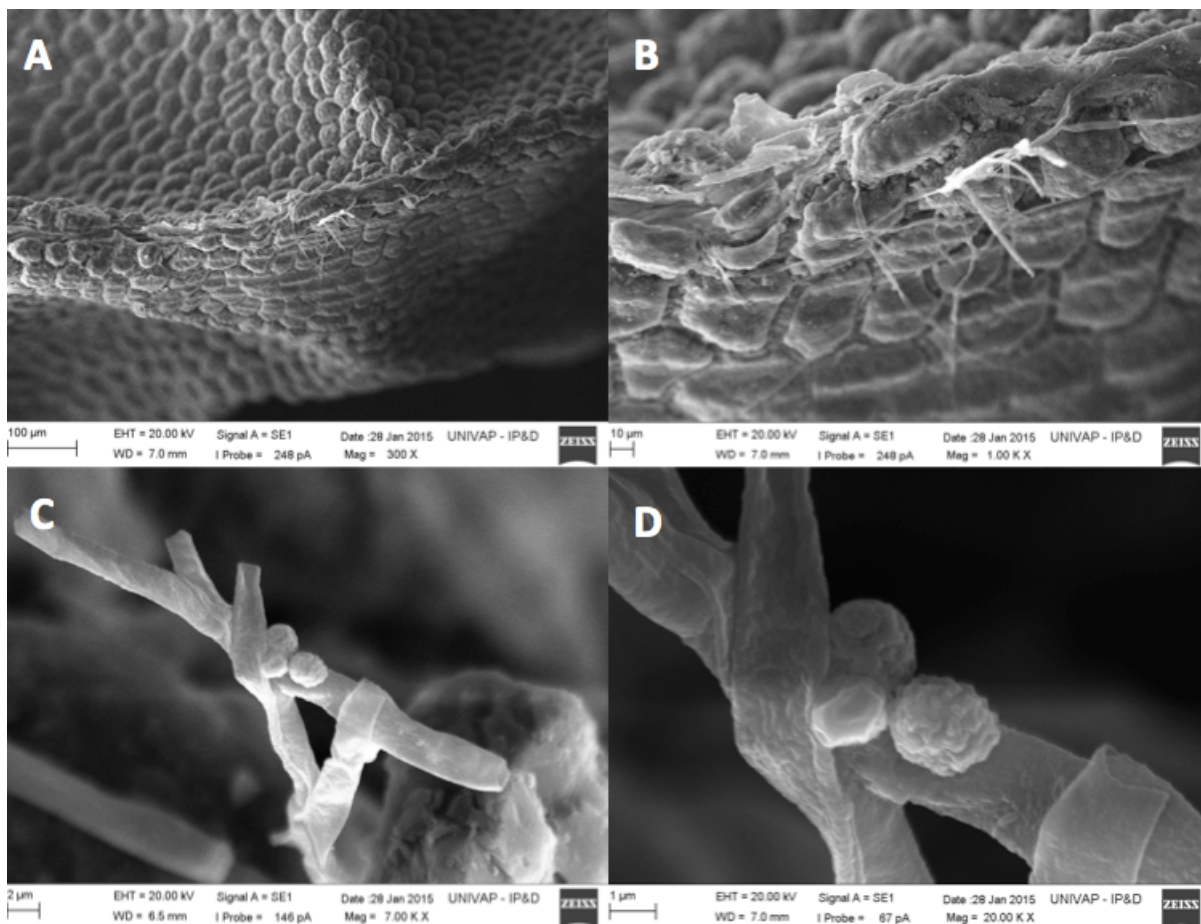
5.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após os tratamentos descritos, as sementes foram submetidas à análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), onde foram obtidas as imagens das sementes.

5.3.1. Avaliação da adesão dos fungos à semente

Mediante o protocolo de análise das sementes com MEV, além de avaliar possíveis danos à camada exterior e estruturas interiores da semente, também foi possível verificar adesão de células fúngicas na casca da semente no grupo de sementes contaminadas previamente com *Penicillium* e que não receberam nenhum tratamento, de acordo com a figura 19.

Figura 19 - Imagem adquirida mediante Microscopia Eletrônica de Varredura de sementes de cebola, previamente contaminadas com cepa de Penicillium.

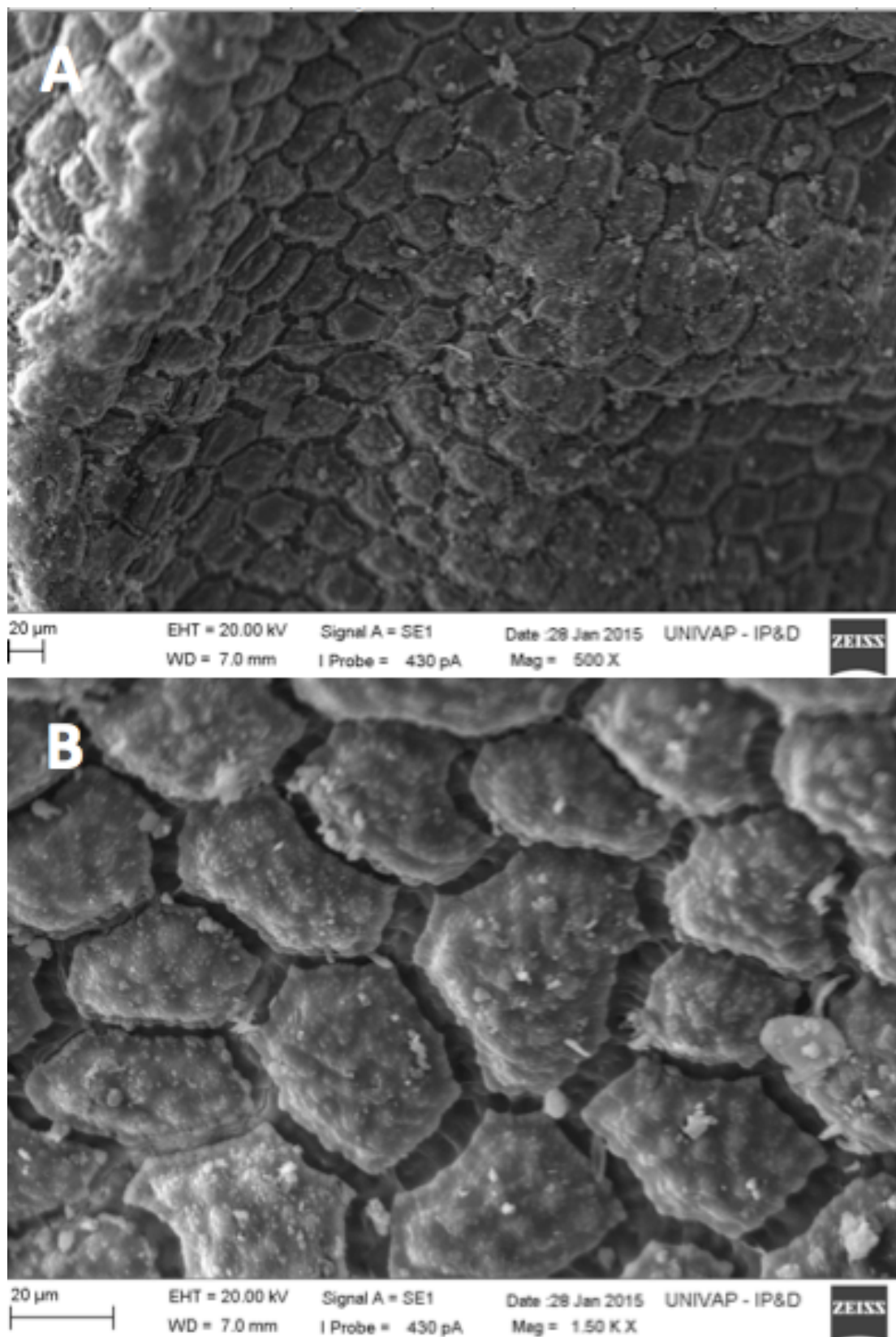


(A) semente com aumento de 500x, (B) aumento de 1000x, C representa aumento 7000x e D representa aumento de 20000x. Fonte: o autor.

5.3.2. Avaliação das possíveis alterações geradas pelo tratamento de plasma

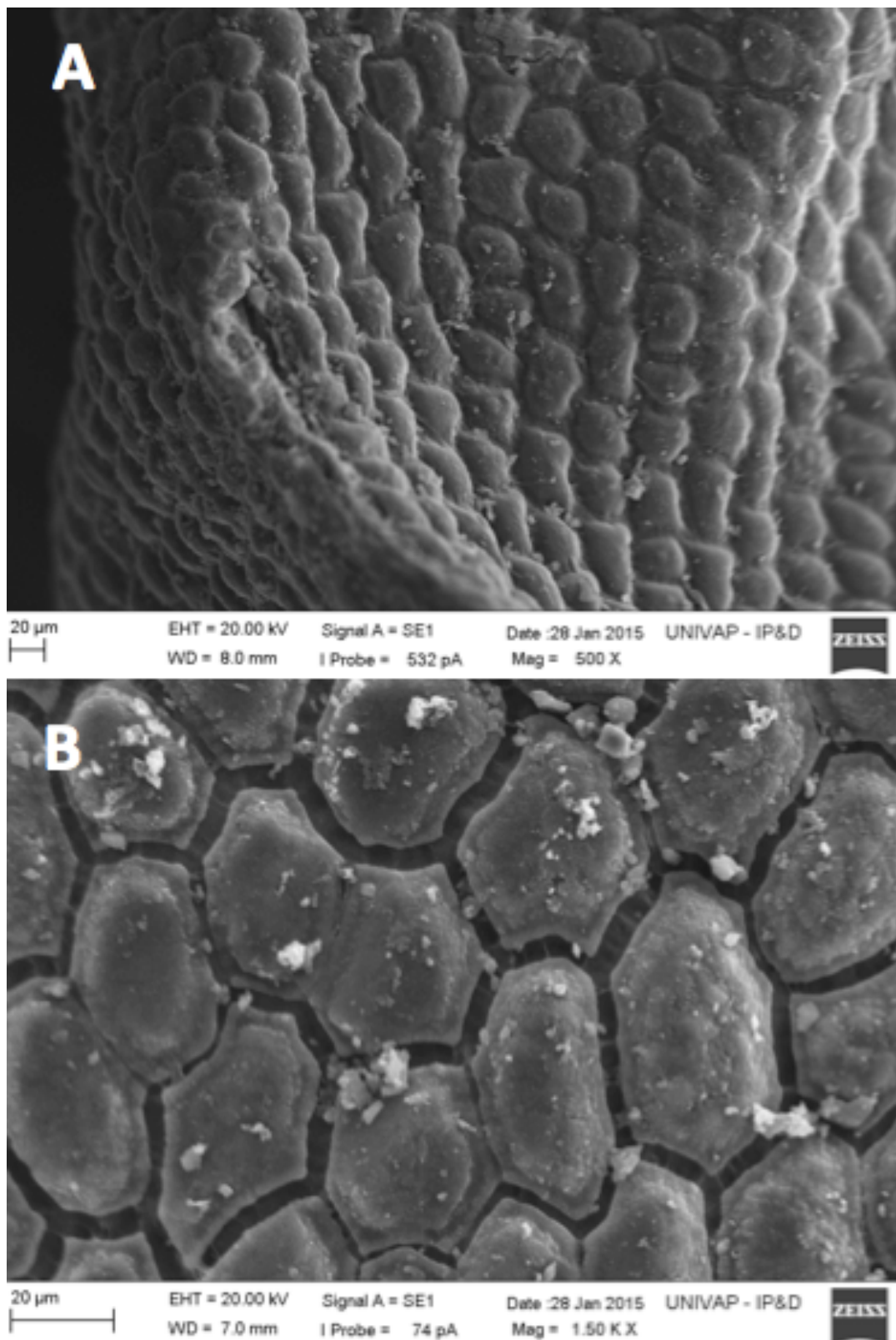
As sementes *in natura* sem tratamento, *in natura* com 10 minutos de tratamento de plasma composto por 50% gás Argônio associado com 50% Ar Comprimido, nos aumentos de 500 e 1500 vezes, respectivamente, foram avaliadas mediante as imagens microscópicas (figuras 20 e 21).

Figura 20 - Imagens obtidas por MEV da superfície das semente in natura sem qualquer tratamento, onde, (A) representa aumento de 500x e (B) representa aumento de 1500x.



Fonte: o autor.

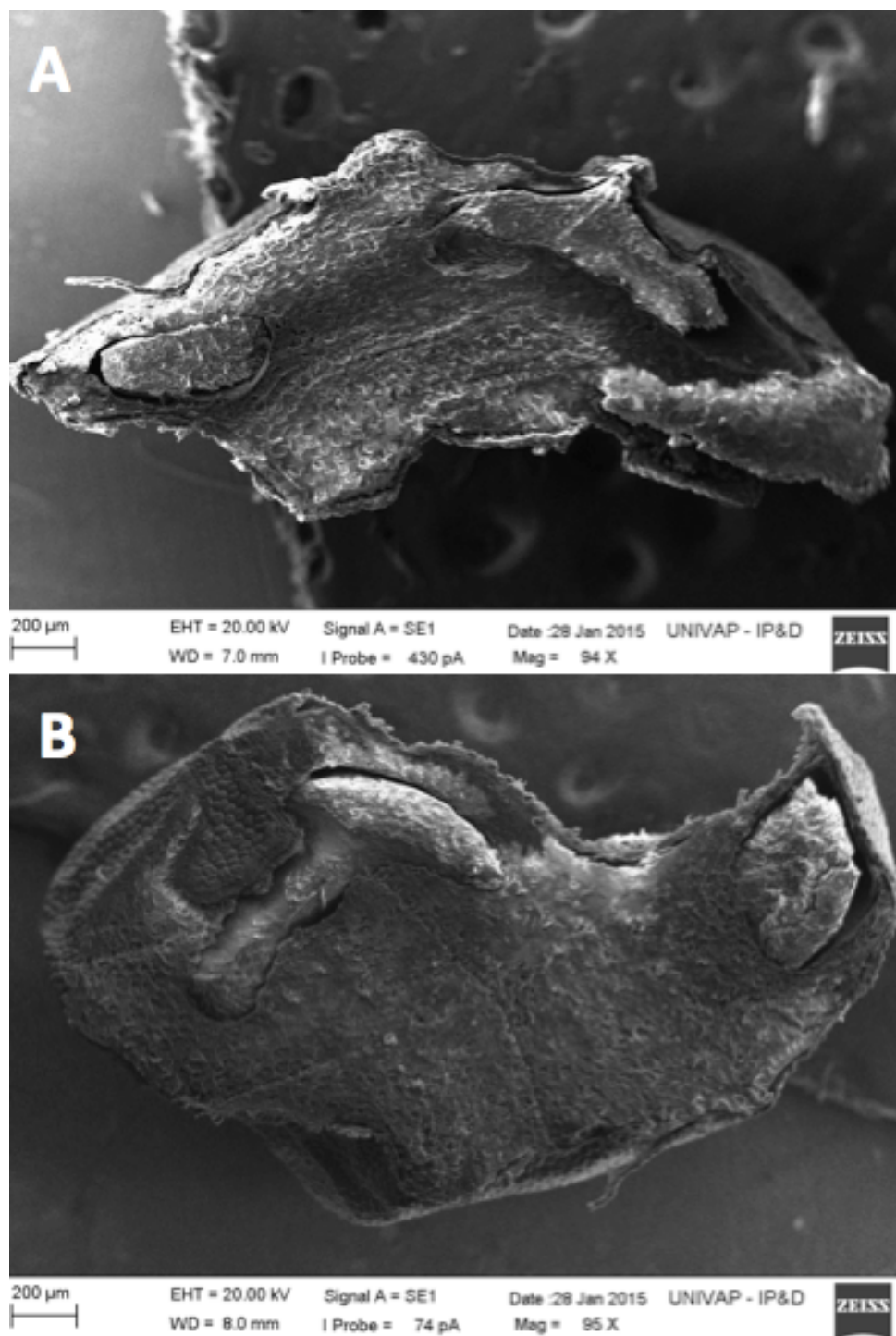
Figura 21 - Imagens obtidas por MEV da superfície das semente in natura com tratamento de 10 minutos de plasma de Argônio e Ar Comprimido, onde, (A) representa aumento de 500x e (B) representa aumento de 1500x.



Fonte: o autor.

Após avaliação qualitativa da superfície externa das sementes, foram analisadas possíveis alterações nas estruturas internas sendo viabilizada mediante corte sagital da amostra (figura 22).

Figura 22 - Amostra in natura sem tratamento, aumentada 94x (A) e semente in natura tratada por 10 minutos com plasma associado, aumentada 95x (B).



Fonte: o autor.

6. DISCUSSÃO

Alguns resultados foram descartados, sendo considerados inviáveis para avaliar o efeito antifúngico do plasma, diretamente sobre cepas de *Penicillium* isolado. Apenas a sementeira que foi efetuada pura onde, uma alíquota da colônia original, foi removida e semeada preenchendo toda a superfície do meio de cultura. Os grupos tratados com plasma composto 100% gás argônio e, igualmente, no plasma formado com 100% gás hélio não apresentaram halos (HALO MÉDIO = 0mm). Este fato pode estar diretamente associado ao fator de resistência que o micro-organismo apresentou frente ao tratamento desenvolvido. Sendo assim, faz-se necessário avaliar de modo mais amplo visando elucidar o mecanismo de atuação do plasma frente ao microrganismo em questão. Algumas hipóteses podem ser a baixa concentração de espécies reativas geradas ou tempo insuficiente de tratamento.

Quando o tratamento com plasma consistiu na inserção de ar comprimido no sistema de geração de plasma, em qualquer proporção, o efeito foi positivo na inibição gradativa do crescimento microbiano conforme aumento proporcional do período de irradiação sendo T=15 mais efetivo que T=10 que, conseqüentemente, foi mais promissor que T=5 minutos.

O maior índice de inibição do crescimento do fungo, mensurado pelo halo médio gerado no centro da placa, foi constatado no tratamento correspondente à 15 minutos de irradiação com plasma composto de 50% gás Argônio associado com 50% ar comprimido, equivalente a 26,35mm. Este mesmo tratamento mostrou-se eficaz para inibição do crescimento fúngico a partir do tempo de 5 minutos, apresentando halo médio de 8,25mm enquanto que, nos outros tratamentos, os efeitos de inibição se tornaram evidentes em tratamentos a partir de 10 minutos.

A irradiação das sementes com plasma composto 100% de ar comprimido apresentou inibições a partir de 10 minutos de exposição, apresentando um halo médio de 17,80mm e de 24,90mm para 15 minutos de irradiação. Outro tratamento que ainda apresentou formação de halos de inibição foi a composição com 50% gás Hélio associado com 50% ar comprimido com halos de 10,70mm e 16,70mm para os tempos de 10 e 15 minutos de irradiação, respectivamente.

O fato da associação do ar comprimido no sistema de geração de plasma e os efeitos positivos para controle de crescimento microbiano pode estar relacionado com o alto índice de geração de espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio pela atmosfera rica em moléculas químicas favoráveis para geração dos mesmos. Em um trabalho realizado por Holubová (2021), mediante análise de bandas por

espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier de refletância total atenuada (ATR-FTIR), as amostras tratadas com plasma de ar e plasma de oxigênio, apresentaram considerável diminuição nas bandas de ligações C – H e C = O e diminuição dos grupos típicos dos lipídeos, indicando oxidação e remoção da camada lipídica superior na superfície do milho. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio incluem hidroxila, superóxido, peroxila, alcoxila, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, óxido nítrico, óxido nitroso, ácido nitroso, nitritos, nitratos, entre outros. Mesmo os compostos que apresentam baixa reatividade na interação com organismos vivos, ainda assim, configuram moléculas nocivas à saúde celular podendo atuar em lipídeos, proteínas, DNA ou ambos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). De acordo com Doria et al (2018) a combinação de plasma composto por argônio e ar, apresentou os maiores índices de espécies reativas geradas. Embora as espécies reativas sejam consideradas prejudiciais às sementes, pesquisadores como Su et al (2016) e Ranieri et al (2020) observam o desempenho positivo das espécies reativas de oxigênio no alívio da dormência e início da germinação em sementes. Ranieri et al (2020) ainda acrescenta e descreve que as espécies reativas foram consideradas protagonistas nas alterações em sementes tratadas com plasmas de baixa pressão e pressão atmosférica.

Mediante a reprodução do protocolo de irradiação por plasma nas sementes de cebola, foi possível observar que os resultados foram correlacionados quanto ao perfil comportamental do fungo frente aos diferentes tratamentos. Após o acompanhamento das amostras, por 10 dias, apenas 4,54% das sementes irradiadas com o plasma composto de gás Hélio associado ao ar comprimido, desenvolveu contaminações. As irradiações com plasma de gás argônio com ar comprimido e o composto apenas de ar comprimido, obtiveram o número de contaminações representando 18,18% cada, enquanto, os plasmas compostos de 100% gás hélio e o 100% gás argônio, representaram, individualmente, um percentual de contaminações de 54,54% cada. Como esperado, o grupo controle superou o número de contaminações, apresentando 65,90% das sementes contaminadas após 10 dias de acompanhamento. Estabelecendo comparações, assim como ocorreu no primeiro experimento, as irradiações compostas por Hélio e argônio, quando associadas com o ar comprimido, apresentam resultados promissores, enquanto os mesmos gases nobres sendo aplicados individualmente, quase se aproximam aos resultados obtidos com as amostras sem tratamento. O ar

comprimido, também sendo aplicado sem nenhuma associação a outro gás, afetou o desenvolvimento de colônias fúngicas fato, possivelmente, relacionado com a geração de espécies reativas.

O estudo de Holubová et al (2016), demonstrou que o tratamento com plasma de nitrogênio produziu espécies reativas e demonstrou que a ausência do oxigênio remete à baixa capacidade remoção de lipídios da superfície observada pela análise de ATR-FTIR, fazendo com que o ângulo de contato seja mais elevado diminuindo, conseqüentemente, a capacidade de umectação da amostra.

De acordo com o Manual de Sementes do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil, as condições ideais para favorecer a germinação das sementes incluem adição subsequente de água à câmara de germinação, quando necessária e a critério do avaliador (MACHADO et al., 2009). Neste projeto, o fator de controle de contaminação e a avaliação da viabilidade germinativa, foram efetuados concomitantemente, no mesmo grupo amostral, fazendo com que as amostras estivessem submetidas aos mesmos fatores ambientais. Sendo assim, a disponibilidade de umidade na câmara de germinação e temperaturas favoráveis (em torno de 25°C) constituíram condições ideais não só para a germinação, mas também, para o crescimento fúngico das células que permaneceram viáveis.

Devido a escassez de trabalhos semelhantes à essa linha de pesquisa, não foi possível adequar o protocolo reproduzido e padronizado neste estudo com o de outros estudos porém, mesmo com diferenças metodológicas, os resultados obtidos no presente estudo, se relacionaram com dados obtidos por Selcuk; Oksuz; Basaran, (2008) quando demonstraram que o plasma exerce potencial de descontaminação sobre sementes contaminadas por *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. sem afetar a qualidade germinativa, dentro do limiar comercial de 85%, segundo os mesmos autores.

A elevação da temperatura, durante o processo de tratamento das amostras, trouxe preocupações referentes ao protocolo, tendo em vista que altas temperaturas poderiam afetar a viabilidade germinativa das sementes. Um estudo realizado na EMBRAPA, demonstrou que as sementes continuam se desenvolvendo em temperaturas em torno de 35°C porém, as irradiações que foram mais promissoras no controle da contaminação fúngica, apresentaram temperaturas altamente elevadas, ultrapassando o limiar dos 60°C, conforme representado na figura 12 (RAFAELE; BARROS; CAVALCANTI, 2015).

Durante o procedimento de utilização do plasma sobre qualquer material, existe geração de uma certa quantidade de calor que é transmitida para a amostra que está sendo tratada, possivelmente relacionada com a quantidade de moléculas reativas e proporção com que essas moléculas promovem reações químicas e físicas no meio de interação (DORIA, 2015). Após a exposição das amostras ao plasma, a temperatura deixa de aumentar e se estabiliza conforme temperatura ambiente da sala de procedimento e/ou incubação. Para obter as medidas, foram utilizadas duas metodologias que puderam revelar a quantidade de calor tanto que foi incidida, quanto a que foi absorvida pelas amostras.

O plasma gerado com gás argônio, apresentou mínimas alterações de temperatura, atingindo seu limite máximo em 34,1°C durante todo o processo. O segundo plasma que apresentou temperaturas mais baixas durante a irradiação das amostras, foi o de hélio, apresentando a maior temperatura igual a 49,3°C.

Os tratamentos mais promissores quanto ao controle de contaminação microbiológica também foram, respectivamente, os que apresentaram maiores temperaturas sobre as amostras, sendo eles, argônio associado ao ar comprimido, ar comprimido e hélio associado ao ar comprimido.

As temperaturas atingidas durante o processo, no caso da associação do gás hélio com ar comprimido, superaram os 70°C, enquanto que, o plasma gerado por argônio e ar comprimido e somente ar comprimido, aqueceram 67,5 e 67,8°C, respectivamente.

Os valores elevados nas temperaturas podem, não só influenciar no metabolismo fúngico mas também na viabilidade germinativa das sementes. Apesar do período de exposição das amostras às altas temperaturas ser de, no máximo, 15 minutos, os efeitos foram permanentes. De acordo com as Figuras 17 e 18, é possível verificar que os índices que representam maior número de eclosão de sementes correspondem às sementes tratadas com plasma composto de 100% gás argônio e 100% gás hélio. No grupo de amostras que foram contaminadas com colônia ATCC (Figura 17), o único plasma que não interferiu negativamente no número de eclosão das sementes, foi o plasma composto 100% gás argônio. Como observação da figura 16, no dia 3 foram verificados os primeiros indícios de germinação sendo relacionados aos grupos tratados com argônio, argônio associado ao ar comprimido e ar comprimido puro. O grupo controle (que não recebeu tratamento de plasma) apresentou os primeiros indícios de germinação apenas no

dia 4 do estudo, porém ainda tenho seu número superado pelo grupo tratado com plasma de argônio. A partir do quinto dia de avaliação o grupo controle se sobressaiu quanto ao número de sementes germinadas mantendo os maiores níveis até o final do período de acompanhamento. O plasma de argônio e de hélio foram os que incidiram menores valores de temperatura sobre as amostras podendo, presuntivamente, alegar que as baixas elevações nas temperaturas não afetaram drasticamente a viabilidade germinativa, não podendo ser afirmada de igual modo quanto aos tratamentos onde houve associação do ar comprimido ao sistema.

É importante salientar que, neste trabalho, o foco do estudo foi avaliar o efeito antifúngico do plasma sobre sementes, mas sem afetar a qualidade germinativa das mesmas. Sabe-se que, naturalmente, um percentual de sementes pode ser dura e/ou dormente e, para superar essas características, é necessário aplicar protocolos específicos sobre as amostras tais como embebição, escarificação mecânica ou escarificação química. As amostras que não quebram a dormência, mesmo após o emprego de alguma das técnicas citadas, são consideradas duras e inviáveis para prosseguir com a germinação (MACHADO et al., 2009). Essa é uma regra geral aplicada à qualquer análise de sementes, incluindo de cebola. Sendo assim, deve-se considerar que, pode ter havido a ocorrência de sementes duras e/ou dormentes neste estudo. Como não foi aplicado protocolo metodológico específico para avaliação de tais parâmetros, este fato foi, somente, levado em consideração no balanço geral da obtenção dos resultados. É possível observar que as sementes contaminadas e tratadas

Possivelmente, as inibições de crescimento fúngico, relatadas neste trabalho, possam ser advindas do efeito térmico gerado pelo plasma sobre as amostras, porém, como o mecanismo de atuação do plasma não está elucidado na literatura atual, existem muitas hipóteses que podem ser levadas em consideração quanto aos resultados obtidos no presente estudo. Em um estudo realizado por Doria et al (2018)

A literatura apresenta diferentes protocolos para análise qualitativa de amostras de sementes, tais como potencial germinativo, peso seco, peso úmido, crescimento e ângulo de contato, por exemplo (LING et al., 2015; RANDENIYA; DE GROOT, 2015). Neste estudo, não foram aplicados os mesmos parâmetros analíticos, sendo utilizada apenas a tecnologia de Microscopia Eletrônica de Varredura, para uma verificação no aspecto das sementes.

O primeiro item avaliado mediante MEV, foi a aderência fúngica à superfície da semente que, por sua vez, pôde ser visualizada na figura 18, em diferentes aumentos. A microscopia foi utilizada apenas para verificação da qualidade do protocolo aplicado às amostras, não podendo ser utilizada como parâmetro analítico.

De acordo com Ling et al., (2015), mediante submissão de sementes ao tratamento com plasma frio, houve melhora percentual na germinação (14,66%), vigor (63,33%), capacidade de absorção de água (14,03%) e peso das amostras (26,19%). Em comparação com as amostras de sementes de cebola deste trabalho, pôde-se observar aumento do volume do embrião (figura 22B), presuntivamente sendo relacionado aos efeitos gerados pelo tratamento de plasma porém, o baixo nível do número de eclosão de sementes sugere que, no geral, as altas temperaturas aplicadas, foram prejudiciais ao desenvolvimento das mesmas.

O outro quesito que foi observado nas amostras tratadas e não tratadas, mediante a análise microscópica, foi a diferenciação aparente no aspecto visual da rugosidade na casca da semente. Não foram aplicadas metodologias quantitativas para avaliar ou mensurar a ação do plasma sobre as sementes e, assim como qualquer ser vivo, cada indivíduo apresenta características diferentes. Assim como relatado por Selcuk; Oksuz; Basaran (2008), diversos parâmetros são capazes de interferir nos resultados dos tratamentos, incluindo o tipo de gás, a duração e, até mesmo, a característica da superfície do grão tratado.

7. CONCLUSÃO

O plasma, neste estudo, demonstrou ser capaz de efetuar controle de crescimento fúngico principalmente, quando existe associação dos gases inertes ao ar comprimido, gerando um ambiente mais reativo. Quando o tratamento de plasma foi aplicado diretamente sobre as cepas de *Penicillium*, houve a percepção do comportamento do fungo quanto à sensibilidade do mesmo frente ao protocolo de irradiação. Este mesmo perfil comportamental do fungo, se reproduziu quando os mesmos tratamentos foram aplicados nas sementes contaminadas. Quanto à questão germinativa, sua aplicação em sementes, nos parâmetros estudados, não foi promissora, tendo em vista a grande queda na viabilidade quando comparada ao grupo controle. Neste caso é possível observar que os tratamentos que foram mais eficazes para o controle de crescimento fúngico em sementes, foram os apresentaram os piores índices de germinação, por outro lado, os tratamentos menos eficazes para o controle de contaminação foram os que menos interferiram no processo germinativo das sementes estudadas.

A utilização da técnica de microscopia eletrônica de varredura foi capaz de auxiliar no desenvolvimento do trabalho pois permitiu avaliar a estrutura da parede externa da semente de cebola e constatar que os fungos realmente estavam aderidos após a contaminação induzida com o fungo deste trabalho.

A aplicação do plasma utilizando a associação de gases exatamente nos parâmetros utilizados neste estudo demonstrou não ser promissora para utilização direta em sementes contaminadas que necessitem continuar viáveis para germinação, mas pode ser adaptada para aplicação em materiais termo resistentes visando a desinfecção. Já para a aplicação do plasma em organismos vivos que necessitem manter a viabilidade após o tratamento, fazem-se necessárias modificações no protocolo de irradiação, para que não haja danos às estruturas vitais.

O presente estudo foi capaz verificar que o plasma apresenta um tipo de tratamento que pode ser amplamente versátil quanto ao seu perfil de regulação e, conseqüente, aplicação em algum meio definido. As diferentes finalidades entram em acordo com os diversos perfis de composição e atuação deste, necessitando de novas pesquisas na área que possam elucidar os mecanismos de atuação desta nova tecnologia e explorar os resultados potenciais que este tratamento pode gerar.

REFERÊNCIAS

- A BLÍBLIA DA MULHER: Leitura, devocional, estudo. 2 ed. Barueri, SP: Sociedade Bíblica do Brasil, 2009.
- ALKAWAREEK, M. Y. et al. Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 381–384, jul. 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT/ISO 22000. Rio de Janeiro, 2018.
- ATTRI, P. et al. Plasma Agriculture from Laboratory to Farm: A Review. **Processes**, 8, 1002, 2020; doi:10.3390/pr8081002
- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 225–229, 1999.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BRAND, S.C.; et al . **EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE PATÓGENOS EM SEMENTES DE CEBOLA**. XV Congresso de Iniciação Científica. **Anais**. 2006.
- BRASIL; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Deteção e Identificação dos Fungos de Importância Médica Módulo VII**, [s.d.].
- BRASIL; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. **Plano agrícola e pecuário 2014/2015**, 2014.
- Brasil. Decreto nº 10.534, de 28 de outubro de 2020. Institui a Política Nacional de Inovação e dispõe sobre a sua governança. Brasília, DF, 2020.
- Bourke P., et al. Microbiological Interactions with Cold Plasma. **Journal Of Applied Microbiology**, v.123, issue 2, p. 308-324, 2017.
- DORIA, A. C. O. C. et al. Application of post-discharge region of atmospheric pressure argon and air plasma jet in the contamination control of candida albicans biofilms. **Revista Brasileira de Engenharia Biomedica**, v. 31, n. 4, p. 358–362, 2015a.
- DORIA, A. C. O. C. **Estudo da ação antifúngica de um jato de plasma não-térmico de argônio e/ou ar comprimido sobre biofilmes de leveduras do gênero candida**. [s.l.] Universidade do Vale do Paraíba, 2015.
- DORIA, A. C. O. C. et al. Application of post-discharge region of atmospheric

pressure argon and air plasma jet in the contamination control of *Candida albicans* biofilms. **Research on Biomedical Engineering**, v. 31, n. 4, p. 358–362, dez. 2015b.

DORIA, A. C. O. C. et al. Surfatron-Produced Atmospheric-Pressure Plasma Jet Applied to *Candida* Biofilms. **Plasma Medicine**. v. 8, issue 3, 2018.

FANTOVA, V. et al. Inactivation of *Candida albicans* by corona discharge: The increase of inhibition zones area after far subsequent exposition. **Acta Polytechnica**, v. 53, n. 2, p. 148–151, 2013.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 25–38, 2007.

FREIRE, F. DAS C. O. et al. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. **Oecologia**, v. 129, p. 48, 2007.

FRICKE, K. et al. Atmospheric pressure plasma: A high-performance tool for the efficient removal of biofilms. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–8, 2012.

HOLUBOVÁ, L'. et al. Cold Atmospheric Pressure Plasma Treatment of Maize Grains—Induction of Growth, Enzyme Activities and Heat Shock Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 8509.

IBGE. Estatística da Produção Agrícola. p. 74, 2017.

JIANG, J. et al. Effect of Cold Plasma Treatment on Seed Germination and Growth of Wheat. **Plasma Science and Technology**, v. 16, n. 1, p. 54–58, 2014.

KAMGANG-YOUBI, G. et al. Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by gliding electric discharges. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 13–18, 2009.

KITAZAKI, S. et al. Growth enhancement of radish sprouts induced by low pressure o 2 radio frequency discharge plasma irradiation. **Japanese Journal of Applied Physics**, v. 51, n. 1 PART 2, p. 1–4, 2012.

KOSTOV, K. G. et al. Surface modification of polymeric materials by cold atmospheric plasma jet. **Applied Surface Science**, v. 314, p. 367–375, 2014.

KURTZ, C. et al. Produtividade e conservação de cebola afetadas pela adubação nitrogenada no sistema de plantio direto. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 559–567, 2013.

LAROUSSE, M. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. **IEEE Transactions on Plasma**

Science, v. 30, n. 4, p. 1409–1415, ago. 2002.

LING, L. et al. Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 5859, 2015.

MACHADO, J. DA C. et al. **Manual de Análise Sanitária de Sementes** Mapa, 2009.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. D. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89–99, 2010.

NEGRI, L. C. G.; et al. Quebra de dormência de sementes de espécies arbóreas. **Revista em Agronegocio e Meio Ambiente**, v. 2, n. 3, p. 487–500, 2009.

Nehra, V., Kumar, A. and Dwivedi, H.K. Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources. *Int. J. Eng*, 2, 53 – 68, 2008.

NEPA - NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Tabela brasileira de composição de alimentos. **NEPA - Unicamp**, p. 161, 2011.

OTHA, T. Plasma in agriculture. **Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications**, 83-116, 2016.

PUAČ, N.; et al. Plasma agriculture: A rapidly emerging field. **Plasma Process and Polymers**, 2017.

RAFAELE, J.; et al. Germinação de Sementes de Cebola em Diferentes Temperaturas Germination of Onion in Different Temperatures. p. 3–8, 2015.

RANDENIYA, L. K.; DE GROOT, G. J. J. B. Non-Thermal Plasma Treatment of Agricultural Seeds for Stimulation of Germination, Removal of Surface Contamination and Other Benefits: A Review. **Plasma Processes and Polymers**, v. 12, n. 7, p. 608–623, 2015.

RANIERI, P. et al. Plasma agriculture: Review from the perspective of the plant and its ecosystem. **Plasma Processes and Polymers**, 2020.

SCHOLTZ, V. et al. Nonthermal plasma — A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol. Adv*, 33(6), 1108–1119, 2015.

SELCUK, M.; OKSUZ, L.; BASARAN, P. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 5104–5109, 2008.

ŠERÁ, B. et al. Influence of plasma treatment on wheat and oat germination and early growth. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 38, n. 10, p. 2963–2968, 2010.

SU, L.; et al. Reactive oxygen species induced by cold stratification promote germination of *Hedysarum scoparium* seeds. **Plant. Physiol. Biochem.** 2016, 109,

406–415.

TAKAKI, K. et al. High-voltage technologies for agriculture and food processing. **Journal of Physics D: Applied Physics**, 2019.

TRABULSI, L. R. E COLABORADORES. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRAYLOR, M. J. et al. Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 44, n. 47, p. 472001, 2011.

VOLIN, J. C. et al. Modification of Seed Germination Performance through Cold Plasma Chemistry Technology. **Crop Science**, v. 40, n. 6, p. 1706, 2000.

YAN, D. et al. Improving Seed Germination by Cold Atmospheric Plasma. **Plasma**, 5, 98–111, 2022.

ZHAO, T.; JIANG, L. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 161 (2018) 324–330.