



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Gabriel Laus de Oliveira

**Aplicação de plasma frio e água ativada como desativadores de
microrganismos contaminantes na indústria cervejeira**

Florianópolis
Março/2025



Gabriel Laus de Oliveira

Aplicação de plasma frio e água ativada como desativadores de microrganismos contaminantes na indústria cervejeira

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador 1: Luís Otávio de Brito Benetoli
(Afastado devido à licença médica)

Orientador 2: Prof. Dr. Nito Angelo Debacher

Coorientadora: Dra. Gabriela Müller

Florianópolis
Março/2025

Oliveira, Gabriel Laus de

Aplicação de plasma frio e água ativada como desativadores de microrganismos contaminantes na indústria cervejeira / Gabriel Laus de Oliveira ; orientador, Nito Angelo Debacher, orientador, Luís Otávio de Brito Benetoli, coorientadora, Gabriela Müller, 2025.

50 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Graduação em Química - Bacharelado, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

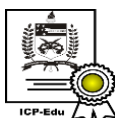
1. Química - Bacharelado. 2. água ativada por plasma. 3. plasma frio. 4. indústria cervejeira. 5. qualidade microbiológica. I. Debacher, Nito Angelo . II. Benetoli, Luís Otávio de Brito . III. Müller, Gabriela . IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Química - Bacharelado. V. Título.

Gabriel Laus de Oliveira

Aplicação de plasma frio e água ativada como desativadores de microrganismos contaminantes na indústria cervejeira

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Química.

Florianópolis, 06 de Março de 2025.



Documento assinado digitalmente
Miguel Soriano Balparda Caro
Data: 06/03/2025 15:02:51-0300
CPF: ***.282.530-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Curso

Banca Examinadora



Documento assinado digitalmente
Nito Angelo Debacher
Data: 05/03/2025 22:25:44-0300
CPF: ***.522.939-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Nito Angelo Debacher

Prof. Dr. Thiago Ferreira da Conceição



Documento assinado digitalmente
Diego Galvan
Data: 06/03/2025 12:16:29-0300
CPF: ***.012.499-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Diego Galvan

Aluno



Documento assinado digitalmente
GABRIEL LAUS DE OLIVEIRA
Data: 06/03/2025 07:03:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Gabriel Laus de Oliveira

Florianópolis
Março/2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Jaime e Sonia, por tudo que fazem por mim e por nossa família. Agradeço por todo apoio, compreensão, auxílio, sabedoria, carinho e amor. Agradeço por tudo que me deram e dão até hoje para viver, alcançar as minhas ambições e formar a minha própria família.

Aos meus colegas por todas as gentilezas e coleguismos que se fazem necessários na comunidade acadêmica e científica. Destes quero agradecer também aqueles que se tornaram amigos que espero ter para vida toda. Ao Johny, ao Kevin, ao Chris e ao Gabriel José agradeço por me ajudarem e apoiarem em momentos que pareciam obscuros. Também agradeço pelos momentos de alegria que compartilhamos e que nos uniram para continuar em frente.

Ao Kevin e ao Chris por sua genialidade e camaradagem. Agradeço e peço desculpas por me explicarem sobre todos os conteúdos do curso como quem fala para uma criança birrenta.

Agradeço a minha companheira de vida, Ana Karoline, por estar ao meu lado durante os difíceis anos de pandemia e pelos anos que se seguiram e seguirão. Agradeço pelo companheirismo, pelo carinho, pela reciprocidade, pelo amor e por me fazer adotar dois gatos, Talia e Orion, para compor a nossa família feliz.

Agradeço a todos que me ajudaram profissionalmente e academicamente para a realização deste trabalho. Ao Chris novamente por me aconselhar, mesmo à distância, sobre o meu material de trabalho. Ao Volnei pela ajuda indispensável no laboratório de plasma. A Adri pela supervisão e aconselhamento durante meus experimentos no laboratório microbiológico da LevTeck.

Agradeço ao meu orientador, Luís Otávio, por apostar no meu desenvolvimento acadêmico e profissional desde o início, quando tínhamos apenas um galpão velho e o desejo de ensinar as pessoas a fazer cerveja. Agradeço à minha co-orientadora, Gabriela Müller, pelas oportunidades profissionais e acadêmicas e pela orientação. Ao professor Nito, agradeço especialmente por me ceder do seu tempo e aconselhamento, mesmo não se tratando de um de seus orientandos.

Finalmente agradeço à UFSC, ao Departamento de Química, à LevTeck e toda a sua equipe pela ajuda e disponibilização de recursos e espaço físico para o meu trabalho e para a minha evolução profissional e acadêmica.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1 Processo de produção da cerveja.....	11
2.1.1 Leveduras e a etapa de fermentação	12
2.1.2 Pontos de contaminação.....	Erro! Indicador não definido.
2.1.3 Principais contaminantes na cerveja	16
2.2 Plasma: uma ferramenta química versátil	19
2.2.1 Reações de plasma atmosférico sobre meio aquoso.....	20
2.2.2 Aplicação da PAW para a melhoria da qualidade microbiológica na indústria alimentícia	23
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 METODOLOGIA.....	27
4.1 Materiais e equipamentos	27
4.1.1 Geração e aplicação do Plasma e obtenção da PAW	27
4.1.2 Cepas e meios de cultura selecionados	29
4.2 Métodos experimentais.....	29
4.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima	30
4.1.3 Exposição direta dos microrganismos seguida de cultivo	32
4.4 Segurança e tratamento de resíduos.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

5.1 Determinação da concentração inibitória mínima	36
5.1.1 Características da PAW gerada pelo reator de plasma frio utilizado	36
5.1.2 Testes de concentração inibitória mínima.....	38
5.2 Exposição direta dos microrganismos ao plasma	41
6 CONCLUSÃO.....	45
6 REFERÊNCIAS	47

LISTA DE ABREVIACÕES

pH - Potencial hidrogeniônico

ROS - Reactive oxygen species

RNS - Reactive nitrogen species

PAW - Plasma activated water

ORP - Oxirreductive potential

CIM - Concentração inibitória mínima

S.I. - Sem inibição

T (°C) - Temperatura em graus Celsius

RESUMO

Em 2023, a indústria cervejeira no Brasil registrou um crescimento de 6,8%, alcançando uma produção nacional de mais de 15 bilhões de litros. Esse avanço destacou a necessidade de métodos inovadores para garantir a qualidade microbiológica e a segurança alimentar na produção de cerveja. Neste contexto, o presente trabalho experimentou a água ativada por plasma (PAW) como um agente antimicrobiano. O trabalho aborda a importância do controle microbiológico na produção de cerveja, os principais contaminantes e a versatilidade do plasma como ferramenta química. O plasma frio gera espécies reativas em solução que podem ser utilizadas para controlar a qualidade microbiológica na indústria alimentícia. Durante os testes, a PAW foi gerada em laboratório e utilizada em testes de concentração inibitória mínima (CIM) contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus brevis* e *Brettanomyces bruxellensis*. Também foram realizados testes com exposição direta de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus brevis* ao plasma por 25 minutos. Dentre os microrganismos testados por CIM, a PAW só teve efeito mensurável na inibição dos *Lactobacillus brevis*. Já nos testes com exposição direta dos microrganismos ao plasma, os mesmos sofreram clara inibição na sua capacidade de multiplicação. Os *Lactobacillus brevis* novamente foram os mais afetados, sofrendo inibição total em menos de 10 minutos de exposição, enquanto as *Saccharomyces cerevisiae* sofreram apenas inibição parcial no tempo total de exposição do experimento.

Palavras-chave: descontaminação, cerveja, plasma

1 INTRODUÇÃO

Em 2023, a indústria cervejeira no Brasil experimentou um crescimento de 6,8%, resultando na abertura de 118 novos estabelecimentos cervejeiros, consolidando o Brasil como um dos principais produtores de cerveja no mundo. Com um total de 1.847 cervejarias em operação, o país atingiu o volume de produção declarado nacionalmente de mais de 15 bilhões de litros em 2023.

Os ótimos resultados do setor em 2023 são ainda mais animadores quando olhamos para 2022, quando as cervejarias brasileiras se consagraram, novamente, como um dos mais importante pilares econômicos para o crescimento do Brasil, contribuindo com a geração de mais de 2 milhões de empregos diretos, indiretos e induzidos, tornando o setor uma importante força motriz do desenvolvimento de nosso país, representando 2% do Produto Interno Bruto Nacional (Anuários da Cerveja 2022 e 2023 — Ministério da Agricultura e Pecuária).

Entretanto, o crescimento da indústria cervejeira também traz desafios, especialmente no que diz respeito à segurança alimentar e à garantia da qualidade do produto final. Nesse contexto, o controle microbiológico adequado nas indústrias de alimentos e bebidas é essencial para evitar organismos patogênicos e degradadores, que afetam a qualidade e a segurança dos seus produtos (FORSYTHE, 2013). Portanto, torna-se evidente a necessidade de inovações na indústria cervejeira, como o desenvolvimento de novos métodos avançados de descontaminação microbiológica dos materiais e equipamentos empregados nesse importante setor.

Uma abordagem promissora é o uso de Água Ativada por Plasma (PAW), que devido ao seu potencial oxidante, demonstra propriedades antimicrobianas e, portanto, potencial para ser empregada em diversas aplicações tecnológicas, inclusive na indústria de alimentos e bebidas (OLIVEIRA et al., 2022). Nesse trabalho serão testadas as propriedades antimicrobianas da PAW a fim de futuramente desenvolver um novo método de descontaminação microbiológica de equipamentos de cervejarias. A tecnologia de plasma frio, em contraste com os métodos tradicionais de sanitização, tem se mostrado eficiente na remoção de contaminantes, tem baixo custo de operação e impacto ambiental e portanto um passo importante rumo a uma indústria sustentável.

2 REVISÃO DA LITERATURA

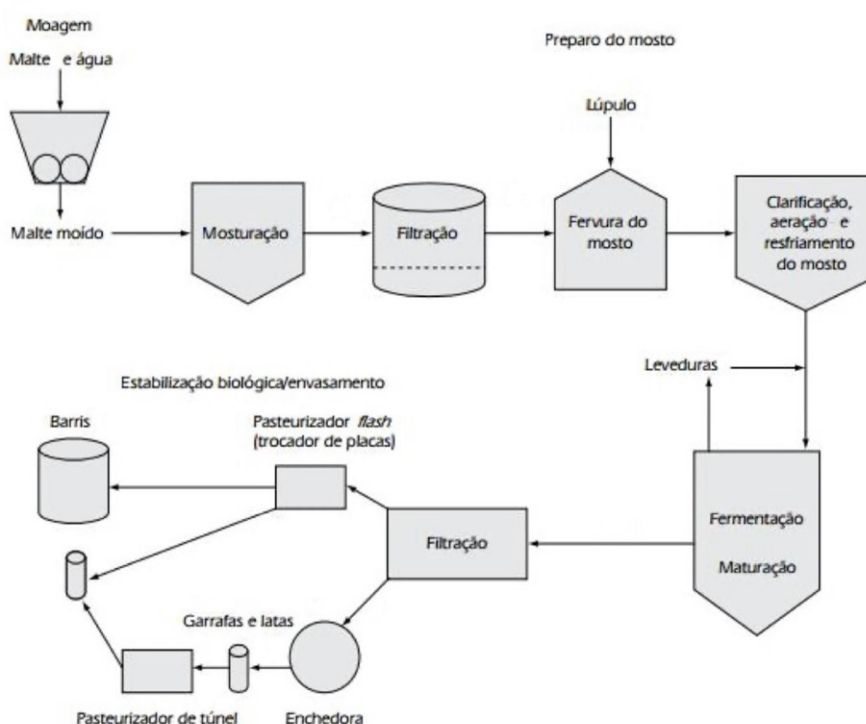
2.1 Processo de produção da cerveja

De acordo com o decreto n.º 9.902 de 2019,

“Cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro” (BRASIL, 2019).

A figura 1 ilustra resumidamente as etapas básicas envolvidas na produção de uma cerveja. O processo de fabricação da cerveja pode ser resumido em algumas etapas distintas. Inicia-se com a elaboração do mosto cervejeiro, seguido pela fermentação, maturação, pasteurização e envase (GOMES, P.; SOUZA, D., 2010).

Figura 1: Visão simplificada das etapas envolvidas no processo de produção da cerveja.



Fonte: VAUGHAN et al., (2005). Adaptado por DRAGONE et al., (2007).

2.1.1 Leveduras e a etapa de fermentação

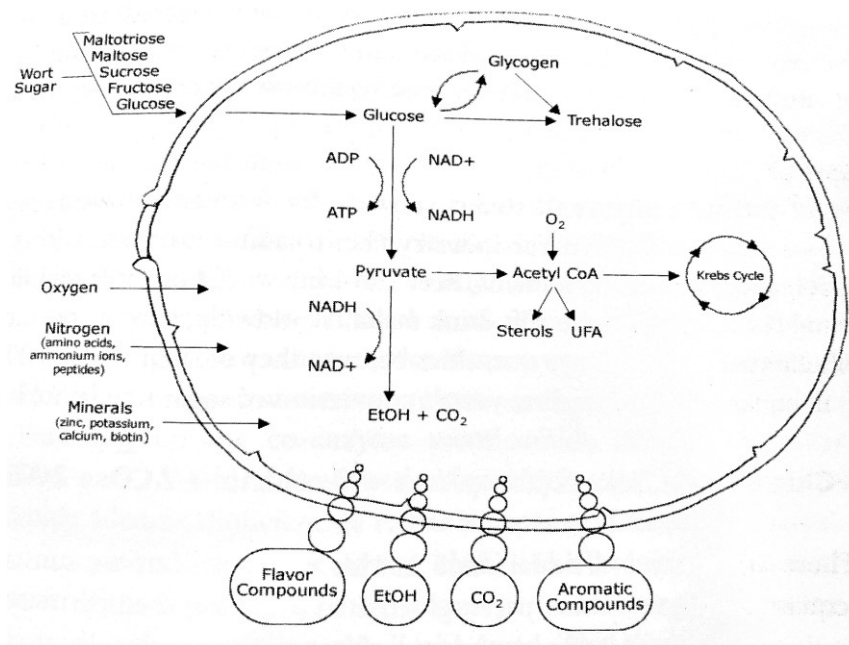
Durante a etapa de mosturação, o amido presente nos grãos utilizados como matéria prima é hidrolisado através da ação de enzimas presentes no mosto. Ao final desta etapa, o mosto torna-se um extrato rico em diversos açúcares com diferentes tamanhos de cadeias glicosídicas. As leveduras se alimentam destes açúcares para criar etanol e dióxido de carbono, mas as fontes de açúcar e sua complexidade resultarão em condições de fermentação variadas (GABRIEL GERBER HORNINK, 2024 e WHITE; JAMIL ZAINASHEFF, 2010).

Via de regra, açúcares mais simples (como monossacarídeos e dissacarídeos) são mais fermentescíveis do que açúcares de cadeia mais longa e mais complexa (polissacarídeos). Dentre os açúcares fermentescíveis do mosto estão a glicose e a maltose, sendo a segunda presente em maior quantidade devido a especificidades das enzimas presentes no malte de cevada usado na produção de cerveja. Já os açúcares não fermentescíveis ou pouco fermentescíveis são em sua maioria dextrinas solúveis provindas da quebra enzimática do amido. Ao final da fermentação, as dextrinas são em grande parte responsáveis pelo corpo da cerveja (WENZEL, 2024, p. 3. e WHITE; JAMIL ZAINASHEFF, 2010).

A fermentação é uma etapa essencial na produção de cerveja. Nessa fase as leveduras realizam intensa atividade metabólica, convertendo quase todo o açúcar fermentescível do extrato em álcool e gás carbônico. Nesse período, também ocorrem reações que resultam na formação de subprodutos que influenciam o sabor da cerveja (LINKO et al., 1998). A figura 2 mostra um desenho esquemático do metabolismo de uma levedura.

Figura 2: Metabolismo celular de uma levedura:

Açúcares, oxigênio, compostos nitrogenados e minerais são absorvidos pela célula;
Etanol, dióxido de carbono e compostos de sabor/aroma são secretados.

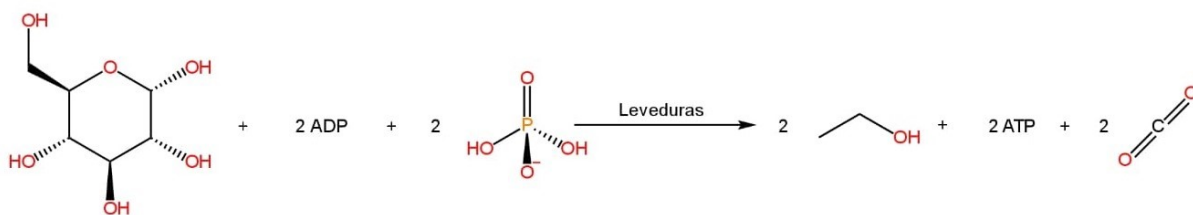


Fonte: Yeast, - The Practical Guide to Beer Fermentation (Capítulo 2, p. 23)

As leveduras desempenham um papel crucial na fabricação de cerveja durante a etapa de fermentação. Esses micro-organismos unicelulares, tipicamente do gênero *Saccharomyces*, são responsáveis por uma função primordial: a conversão dos açúcares presentes no mosto em etanol, a fermentação alcoólica. Tradicionalmente, as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* são as mais utilizadas na produção de cerveja, seja para cervejas Ale ou Lager, moldando o perfil de sabor e textura do produto final (JACKSON, 2010; AQUILANI et al., 2015; CAPECE et al., 2018).

A presença e atividade das leveduras são essenciais para a transformação do mosto em cerveja, uma vez que convertem os açúcares em etanol e dióxido de carbono, adicionando dimensões sensoriais fundamentais à bebida, como o teor alcoólico e os aromas característicos. Portanto, as leveduras desempenham um papel central na produção de cerveja, influenciando significativamente suas características finais (DIAS et al., 2010). A figura 3 mostra a equação da reação global da conversão da glicose em etanol e dióxido de carbono que pode ser usada como exemplo para as reações de conversão de açúcares realizadas pela levedura.

Figura 3: Reação global simplificada da fermentação alcoólica da glicose.



Fonte: figura elaborada pelo autor utilizando aplicativo KingDraw Chemistry.

A temperatura da fermentação, a composição do mosto, o nível de oxigênio inicial, a viabilidade celular e a concentração de etanol são fatores que podem influenciar a fermentação do mosto cervejeiro (GOMES, P.; SOUZA, D., 2010).

Inicialmente, as leveduras passam por uma fase aeróbica, na qual o oxigênio desempenha um papel essencial na reprodução celular. Durante essa fase, o oxigênio é fundamental para a formação de componentes essenciais da membrana celular, como ácidos carboxílicos e esteróis, contribuindo para a viabilidade das leveduras e o equilíbrio de componentes sensoriais (MUNROE, 1994).

À medida que o oxigênio é consumido, as leveduras passam para a fermentação anaeróbica, convertendo açúcares em etanol, gás carbônico e calor (MUNROE, 1994; VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. 1997).

2.1.2 Pontos de contaminação

Os principais pontos de contaminação na produção de cerveja incluem matérias-primas (malte, adjuntos, etc), recipientes, equipamentos, mangueiras e linhas de transferência. As contaminações podem ocorrer em diferentes estágios do processo, como na maturação, no armazenamento e no envase. Cerca de metade dos problemas microbiológicos documentados são atribuídos a contaminações secundárias (ou seja, originam-se do próprio processo de produção, não tendo relação com as matérias primas), muitas vezes ocorrendo durante fases críticas como envase ou maturação (VAUGHAN et al., 2005).

Para aprimorar a cerveja recém-fermentada, é necessário passar por um processo de maturação em tanques específicos, conhecido como "*lagering*" para cervejas lagers (MUXEL, 2022). Quando contaminações ocorrem nesta fase o produto pode chegar até o cliente e se não houver o devido controle, microrganismos patogênicos podem chegar ao consumidor. Além disso, microrganismos deteriorantes podem alterar um lote inteiro tornando-o desagradável ao consumidor.

Antes de passar pelo processo de pasteurização, a cerveja é denominada chope, podendo ser direcionada a barris e comercializada de forma rápida. No envase em garrafas de vidro ou latas de alumínio, a cerveja passa pelo processo de pasteurização, onde é aquecida a 60 °C e depois resfriada. Esse método busca conferir maior estabilidade microbiológica ao produto, permitindo uma validade de seis meses após a fabricação, em contraste com o chope, que possui validade de apenas sete dias. A pasteurização é amplamente adotada na indústria de alimentos e bebidas, sem alterar a composição do produto (GOMES, P.; SOUZA, D., 2010).

Durante a produção da cerveja é necessário realizar a sanitização para evitar contaminantes como bactérias, bolores e leveduras selvagens. Uma das metodologias mais utilizadas na produção caseira de cerveja e às vezes até na indústria consiste nas seguintes etapas: 1) limpar os equipamentos delicadamente, usando um pano embelecido com agentes a base de percarbonato de sódio (um alcali leve que contem oxigenio ativo em sua formulação) ou outro agente limpante; 2) higienizar todos os equipamentos com o uso de um desinfetante, tendo cuidado para não deixar restos de resíduos caso o sanitizante não seja volátil o bastante para evaporar do equipment. (RICHARDS, K. 2015).

Outra forma de controlar os contaminantes comum na industria é a utilização de aço inoxidável na construção dos equipamentos de produção cervejeira, pois o inox facilita o processo de limpeza. As etapas da metodologia de limpeza que pode ser usada são: 1) lavar os equipamentos com água sob pressão; 2) tratar os equipamentos com solução quente de soda cáustica, junto com hipoclorito de sódio; 3) rinçagem com água, a fim de arrastar qualquer resíduo de produtos (AQUARONE et al., 2017 p. 112).

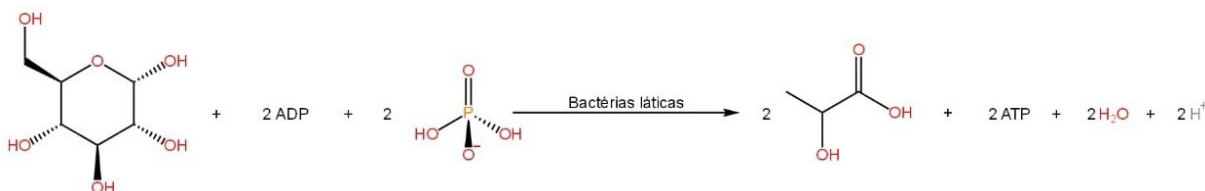
Muitos dos métodos de limpeza e sanitização citados utilizam produtos químicos que podem apresentar risco ambiental quando despejados inadequadamente e em grandes quantidades. Alguns desses químicos podem causar impacto ambiental mesmo em pequenas quantidades, apresentar toxicidade e podem ser corrosivos ou urticantes. Portanto, é imprescindível buscar novos métodos de esterilização mais baratos, eficientes e menos agressivos ao meio ambiente.

Neste contexto, a tecnologia de plasma frio vem demonstrando ser uma nova alternativa para sanitização de materiais através do uso de água ativada (OLIVEIRA et al., 2022).

2.1.3 Principais contaminantes na cerveja

A presença de microrganismos contaminantes, como bactérias e leveduras selvagens, é uma preocupação na produção de cerveja. As bactérias gram-positivas, especialmente *Lactobacillus* e *Pediococcus*, são particularmente problemáticas, podendo produzir ácido lático e acético, prejudicando a qualidade da cerveja, além de dióxido de carbono, etanol e glicerol, que se produzidos para além do esperado pelas leveduras utilizadas na cerveja podem desequilibrá-la e prejudicar a palatabilidade do produto (DRAGONE e ALMEIDA E SILVA, 2010). A figura 4 mostra a equação da reação global da conversão da glicose em ácido lático através das bactérias lácticas. Esta reação pode ser usada como exemplo para as reações de conversão de açúcares em compostos que podem prejudicar o perfil da cerveja.

Figura 4: Reação global simplificada da fermentação láctica da glicose.



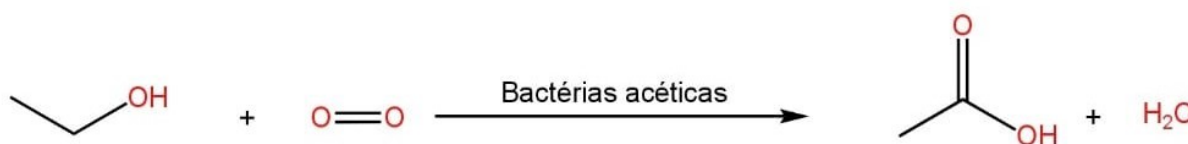
Fonte: figura elaborada pelo autor utilizando aplicativo KingDraw Chemistry.

Além disso, leveduras selvagens podem acelerar a fermentação, alterar a atenuação, a floculação e paladar do produto final. Importante mencionar ainda que leveduras não cervejeiras podem gerar compostos indesejáveis, assim como as bactérias (DRAGONE e ALMEIDA E SILVA, 2010).

Leveduras diferentes das culturas utilizadas industrialmente na elaboração de cerveja são consideradas selvagens. Leveduras selvagens podem ter origem nos mais variados habitats. Além de várias espécies de *Saccharomyces*, são encontradas também espécies dos gêneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces*. Dentre as leveduras selvagens pode haver espécies ou estirpes com características tecnológicas e perfil metabólico adequado para a produção de cerveja. Porém, quando presentes como contaminantes, as leveduras selvagens podem causar problemas que variam de acordo com cada contaminante, como turbidez, odores e sabores indesejados, atenuação incompleta e floculação. Algumas leveduras selvagens podem ainda apresentar características distintas, como a capacidade de produzir glucoamilases (que as permitem utilizar dextrinas como alimento causando super-atenuação) ou de descarboxilar ácidos fenólicos (dando a característica de aromas fenólicos ao produto que muitas vezes remetem a estrebarias) (AQUARONE et al., 2001; DRAGONE et al., 2010).

Na indústria cervejeira às bactérias Gram-negativas aeróbias também tem seu destaque como microrganismos degradadores, principalmente às bactérias ácido-acéticas *Gluconobacter* e *Acetobacter*. Isso porque bactérias acéticas são capazes de converter etanol em ácido acético, resultando em um desagradável odor de vinagre na cerveja (SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N, 2003). As bactérias do ácido acético costumam apresentar resistência aos compostos do lúpulo, aos ácidos produzidos na fermentação e ao etanol. Podem contaminar a cerveja com a presença de ar no *headspace* (espaço vazio no topo de recipientes) de fermentadores, barris, garrafas e latas, como resultado de envasamento imperfeito (VAUGHAN et al., 2005). A figura 5 mostra a equação da reação conversão do etanol em ácido acético através das bactérias acéticas.

Figura 5: Reação global simplificada converção de etanol em ácido acético.



Fonte: figura elaborada pelo autor utilizando aplicativo KingDraw Chemistry.

A tabela 1 traz alguns exemplos de bactérias degradadoras que podem ser encontradas em diversas etapas do processo e alguns efeitos comumente observados no produto final.

Tabela 1: Exemplos de bactérias degradantes na indústria cervejeira.

Gênero	Espécie	Efeito Observado
Bactérias Gram-Positivas		
Lactobacillus	<i>Lb. brevis</i>	Acidez elevada, super atenuação.
	<i>Lb. lindneri</i>	
Pediococcus	<i>P. damnosus</i>	Acidez elevada, super atenuação, mudança da viscosidade, produção de diacetil.
	<i>P. inopinatus</i>	
Micrococcus	<i>M. kristinae</i>	Atípico aroma de frutas.
Bactérias Gram-Negativas		
Pectinatus	<i>P. cerevisiophilus</i>	Inibição da levedura cervejeira
	<i>P. frisingensis</i>	Turbidez
	<i>P. portalensis</i>	Cheiro de "ovo podre"
Megasphaera	<i>M. cerevisiae</i>	Cheiro de "ovo podre"

Fonte: DRAGONE et al., (2007) modificado pelo autor.

2.2 Plasma: uma ferramenta química versátil

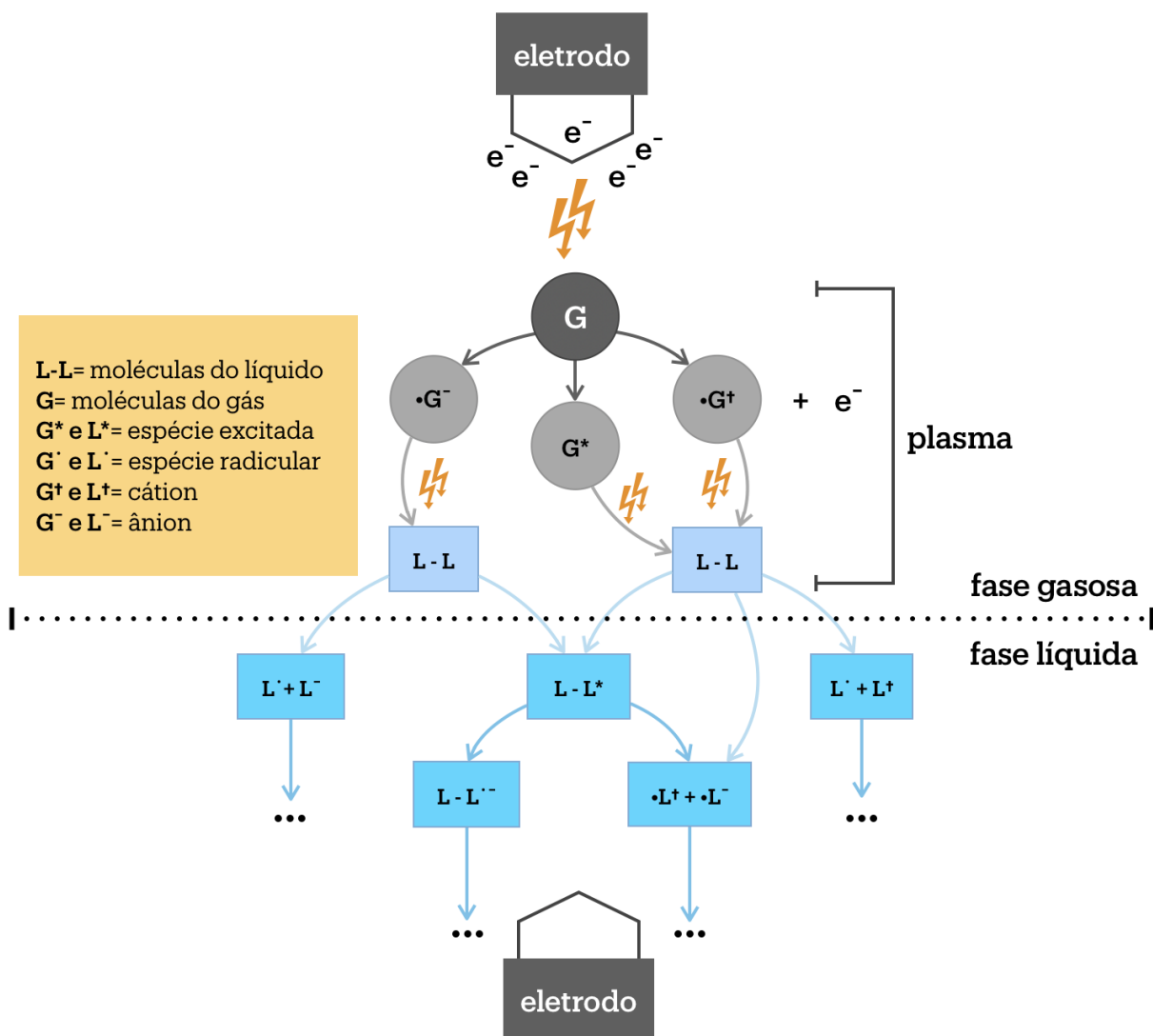
O plasma consiste em um gás de alta energia formado por cargas elétricas livres (íons positivos e elétrons), moléculas neutras, espécies radicalares, moléculas eletronicamente excitadas e fótons. Frequentemente nomeado como 4° estado da matéria, o plasma pode ser produzido por elétrons primários sob a ação de fortes campos elétricos. Esses campos aceleram os elétrons que colidem em alta velocidade com moléculas de um gás e geram um efeito cascata no qual elétrons liberados por este gás colidem com outras moléculas resultando em íons, radicais e espécies excitadas. O plasma produzido desta forma pode ser referenciado como “plasma frio” ou “não térmico”, pois a temperatura translacional dos elétrons no gás é muito maior que a dos outros componentes (FRIDMAN, 2008 e CHU; LU, 2013). Sendo assim, ao contrario do plasma térmico, o plasma frio é utilizado em processos que ocorrem próximos a temperatura ambiente ou menos. O plasma frio não necessita de aquecimento para iniciar a ionização do gás ou para mantê-la.

Para produzir plasma, pode-se utilizar uma fonte de alta tensão e corrente alternada alimentada pela própria rede elétrica de um laboratório. Quando o gás de interesse é submetido ao campo elétrico da fonte o mesmo libera alguns elétrons dando início ao efeito cascata. A partir disso o gás antes neutro passa para um estado de baixa ionização (na faixa de 10^{-7} a 10^{-4} partes de gás ionizado por parte de gás neutro), aumentando drasticamente sua condutividade. A formação de um caminho de baixa resistência elétrica permite a passagem de corrente que sustenta o estado de plasma que pode ser então direcionado para aplicações específicas, independentemente do estado físico do alvo (FRIDMAN, 2008 e CHU; LU, 2013).

2.2.1 Reações de plasma atmosférico sobre meio aquoso

Por estar em desequilíbrio termodinâmico (com os elétrons ocupando níveis de energia mais altos que dos outros componentes) o plasma frio pode inserir energia em sistemas químicos sem a necessidade de aquecê-los (FRIDMAN, 2008 e CHU; LU, 2013). Dessa forma, o plasma frio quando gerado na interface líquido-gás é capaz de produzir espécies quimicamente ativas de interesse em meio aquoso, que podem ser direcionadas para aplicações desejadas. A dinâmica das espécies químicas geradas na interface líquido-gás é exemplificada na figura 2:

Figura 6: Dinâmica de desenvolvimento das espécies químicas energéticas geradas pelo plasma frio em uma interface líquido-gás.



Fonte: o autor, feito com o Freeform.

As técnicas de geração de plasma frio atmosférico em água são consideradas tecnologias de oxidação avançada, pois geram espécies químicas oxidantes bastante reativas. Ao aplicar o plasma utilizando gás atmosférico sobre água, algumas espécies excitadas e reativas podem ser geradas a partir da colisão dos elétrons primários com os gases presentes na superfície da solução e o vapor da mesma. Alguns exemplos de espécies químicas formadas nesta etapa são NO^* , NO_2 , O^* , N_2^* , H_2O^* , H^* , O^* , O^+ e OH^* . Tais espécies são bastante instáveis e podem ser rapidamente extintas ou podem reagir entre si formando espécies secundárias que, devidos a proximidade com a água, podem ser solvatadas e estabilizadas em solução. Alguns exemplos de espécies secundárias formadas são O_3 , H_2O_2 , HNO_2 , HNO_3 , dentre outros.

A presença de gases atmosféricos no plasma induz a formação de 2 grupos de espécies reativas que são solvatadas para o seio da solução. A introdução de O_2 no plasma leva a formação de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* em inglês ou ROS), como H_2O_2 e O_3 . Já a inserção de atmosferas contendo N_2 resulta na formação de espécies reativas de nitrogênio (*reactive nitrogen species* RNS), como os NO_x , ácidos nitroso (HNO_2), nítrico (HNO_3) e peroxinitroso (ONOOH). Estas espécies são altamente oxidantes reagindo com a superfície dos materiais presentes no sistema ou com substâncias que estejam dissolvidas na solução. (BRUGGEMAN et al., 2016 e THIRUMDAS, 2018). A tabela 2 mostra algumas reações que ocorrem durante a aplicação do plasma, divididas entre aquelas que ocorrem pela colisão dos elétrons primários e as que se devem ao desenvolvimento das espécies reativas formadas.

Tabela 2. Reações típicas envolvendo espécies reativas formadas durante aplicação de plasma frio sobre uma interface ar-água.

Reações de iniciação (colisões com elétrons primários)		
$N_2 + e^- \rightarrow N_2^* + e^-$	$O_2 + e^- \rightarrow O^+ + O + 2e^-$	$O_2 + e^- \rightarrow O^- + O$
$H_2O + e^- \rightarrow \cdot OH + H\cdot + e^-$	$H_2O + e^- \rightarrow H^+ + \cdot OH + 2e^-$	
Reações de desenvolvimento das espécies		
$N_2^+ + 2H_2O \rightarrow 2NO\cdot + 4H\cdot$	$O + O_2 \rightarrow O_3$	$OH\cdot + OH\cdot \rightarrow H_2O_2$
$O + N_2 \rightarrow NO\cdot + N$	$2NO\cdot + O_2 \rightarrow 2NO_2$	$NO\cdot + OH\cdot \rightarrow HNO_2$
$O_3 + NO\cdot \rightarrow NO_2 + O_2$	$3NO_2 + H_2O \rightarrow 2HNO_3 + NO\cdot$	$NO_2 + OH\cdot \rightarrow HNO_3$
$H_2O_2 + H^+ + NO_2^- \rightarrow ONOOH + H_2O$		$OH\cdot + NO_2 \rightarrow ONOO^- + H^+$

Fonte: THIRUMDAS, (2018)

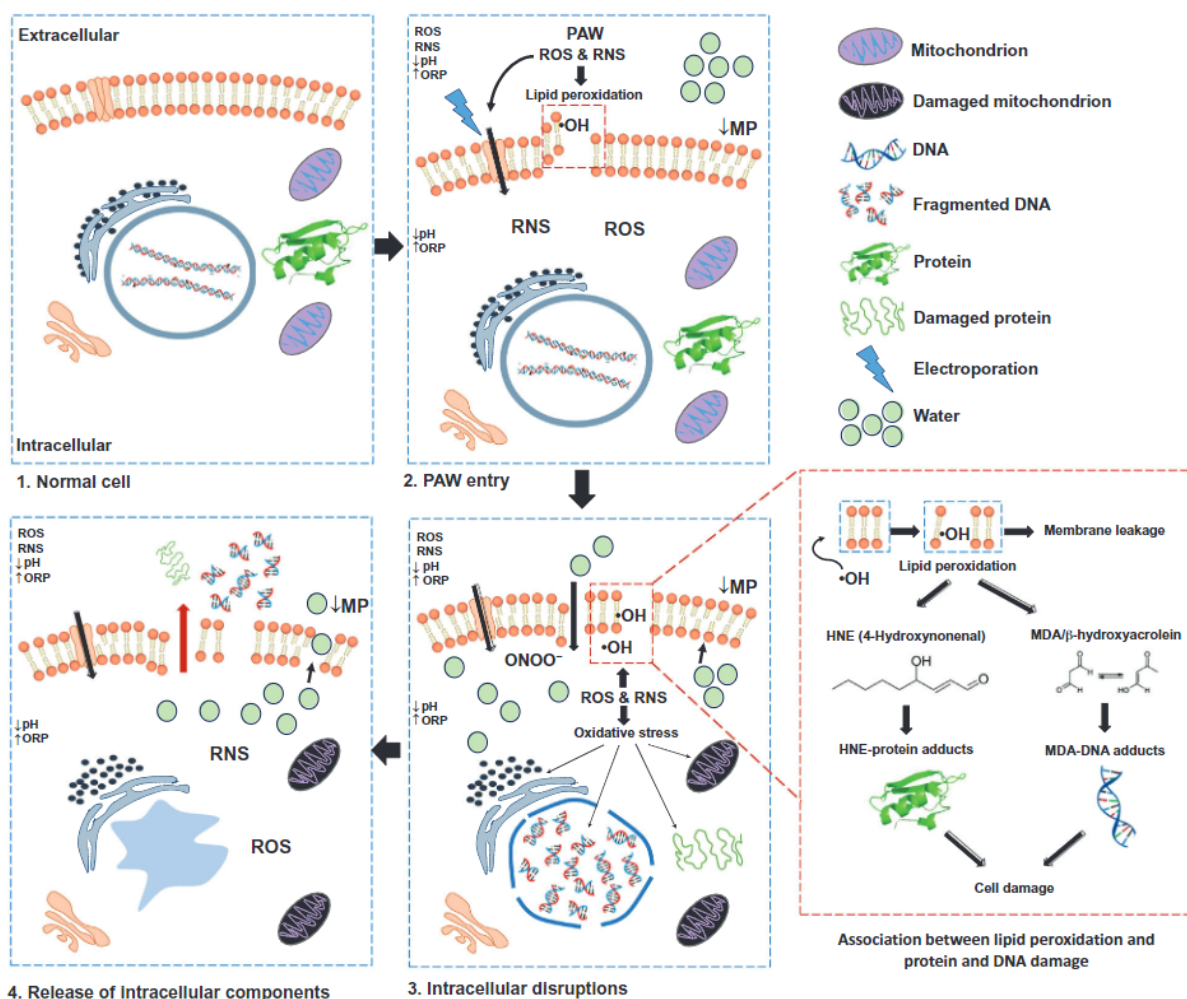
Espécies reativas, como H_2O_2 , HNO_3 , HNO_2 , $ONOOH$ e ainda outras, apresentam relativa estabilidade em comparação aos radicais que dão origem a essas espécies. Sendo assim, após a extinção do plasma, estas espécies permanecem em solução por um certo tempo. O efeito da permanência dessas substâncias na solução bem como a capacidade reativa da solução é conhecido como efeito pós descarga. A solução aquosa afetada pelo plasma pode ser armazenada e usada, como uma alternativa para utilidades nas quais o plasma não possa ser aplicado diretamente, tal como um reagente químico. Essa solução pode ser denominada de “água ativada por plasma”, ou PAW (Plasma Activated Water) (BRUGGEMAN et al., 2016 e THIRUMDAS, 2018).

2.2.2 Aplicação da PAW para a melhoria da qualidade microbiológica na indústria alimentícia

A utilização do plasma e da PAW é promissora na indústria de alimentos para controlar a qualidade microbiológica dos produtos, para descontaminar materiais de embalagens e para descontaminar superfícies de contato com alimentos. Embora o mecanismo exato pelo qual a PAW pode inativar os microrganismos ainda não tenha sido completamente elucidado, existe um consenso na comunidade científica de que as ROS e RNS presentes na PAW desempenham um papel central nesse processo (OLIVEIRA et al., 2022). As espécies reativas exercem seu efeito oxidativo especialmente sobre os ácidos graxos poli-insaturados da membrana citoplasmática, que são muito suscetíveis aos fenômenos de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica pode comprometer a viabilidade celular, modificando as propriedades da membrana, diminuindo sua permeabilidade e até mesmo sua integridade (LÓPEZ et al., 2019).

A figura 7 mostra de forma genérica o mecanismo de inativação microbiana pela PAW. No esquema, a exposição da célula de microrganismo à PAW é seguida pela peroxidação lipídica da membrana citoplasmática. No caso de exposição direta dos microrganismos ao plasma, há ainda nesta etapa o fenômeno de eletroporação da membrana, que é caracterizado pelo aumento da permeabilidade da mesma. Estes fatores contribuem para a entrada das espécies reativas da PAW permitindo que elas interajam destrutivamente com outras estruturas da célula. A interação das ROS e RNS com as estruturas intracelulares pode causar danos às proteínas destas bem como a fragmentação das moléculas de DNA. A peroxidação lipídica pode ainda gerar compostos tóxicos para a célula causando danos na célula (HERIANTO et al., 2020).

Figura 7: Mecanismo de inativação microbiana por PAW dividido em três estágios principais, incluindo ruptura da membrana celular, ruptura de componentes intracelulares e liberação dos materiais e componentes para o meio extracelular.



Fonte: HERIANTO et al., (2020)

A tecnologia de plasma frio por gás atmosférico foi usada pela primeira vez para o processo de esterilização por Laroussi, M. (1996). Desde então, estudos vêm demonstrando excelentes resultados na inativação de microrganismos como a *Escherichia coli* (CUBAS, A. L. et al. 2019.). Em (CUBAS, A. L. et al. 2019. e 2021.) foram testados diferentes tipos de reatores de plasma utilizando misturas de ar atmosférico e argônio. Nestes trabalhos concluiu-se que a descarga elétrica e a geração de luz UV foram fatores que contribuíram para a inativação dos microrganismos. Porém, a inativação da *Escherichia coli* foi apenas parcial quando utilizado apenas argônio como gás plasmogênico, o que indica que RNS e ROS são muito importantes no processo.

Um dos primeiros artigos acadêmicos a explorar o uso da PAW como descontaminante de superfícies de alimentos (Non-thermal plasma-activated water inactivation of food-borne pathogen on fresh produce, por MA et al., 2015) buscou estudar a sua eficácia na descontaminação de morangos contaminados com *Staphylococcus aureus*. Devido a sua complexa estrutura topográfica, a superfície dos morangos é difícil de ser descontaminada, no entanto, o estudo mostrou que o contato com uma PAW que fora tratada por 10 minutos com plasma frio foi o suficiente para reduzir as unidades bacterianas cerca de 1,7 e 2,5 unidades logarítmicas a depender do tempo de exposição. Esses resultados demonstraram um efeito bactericida da PAW comparável ao dos tratamentos com soluções de hipoclorito de sódio.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Aplicar plasma frio e água ativada como desativadores de microrganismos contaminantes na indústria cervejeira.

3.2 Objetivos específicos

Produzir um sanitizante a base de água ativada por plasma frio utilizando um reator de plasma híbrido gás-líquido operando com ar atmosférico e água deionizada;

Avaliar o poder sanitizante da água ativada por plasma no combate a microrganismos contaminantes típicos da indústria cervejeira;

Avaliar o potencial do plasma no combate a microrganismos contaminantes típicos da indústria cervejeira através da exposição direta dos mesmos ao plasma em uma solução salina utilizando nitrogênio como gás plasmogênico.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e equipamentos

A maior parte dos materiais utilizados para os testes microbiológicos foram cedidos pela empresa de biotecnologia cervejeira Levteck Tecnologia Viva Ltda. Dentre estes materiais estão placas de cultivo, meios de cultura, soluções esterilizadas para microrganismos, micropipetas, starter de microrganismos, ponteiros de micropipeta descartáveis, dentre outros. Além dos materiais a empresa também cedeu o espaço e os equipamentos para a manipulação de microrganismos (estufas de cultivo, capela de fluxo laminar e autoclave para esterilização de materiais).

Para além dos materiais fornecidos pela empresa, um conjunto de placas de elisa foi adquirido para a realização dos testes de CIM. O conjunto foi adquirido pelo aluno e cedido ao projeto. Os demais equipamentos e reagentes utilizados, localizavam-se no Departamento de Química da UFSC e foram eles: o equipamento de plasma, pHmetro multifunção, banho termostático e água deionizada.

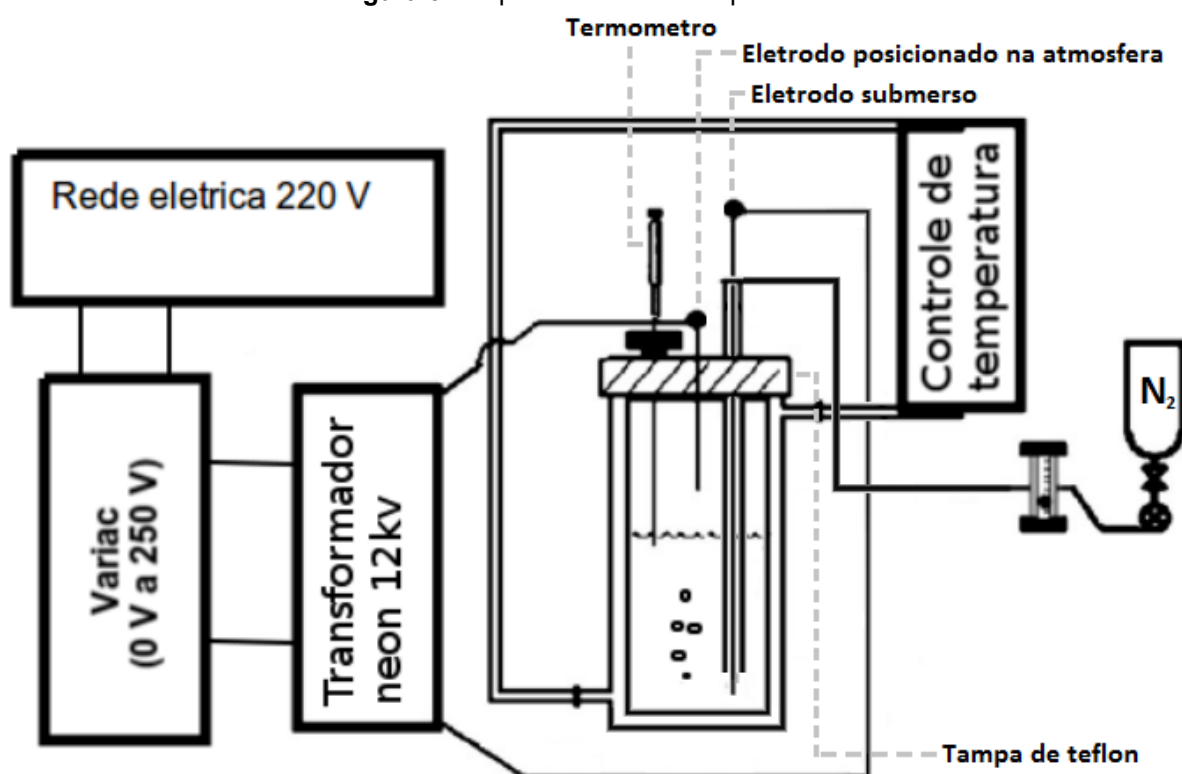
4.1.1 Geração e aplicação do Plasma e obtenção da PAW

O plasma pode ser gerado de diferentes formas a depender do objetivo da sua utilização. Os principais parâmetros operacionais do reator de plasma são o gás plasmogênico utilizado, a distancia entre os eletrodos ou entre o eletrodo e a superfície de aplicação (gap de descarga), o arranjo dos eletrodos e a pressão interna do reator, a fonte de energia (corrente continua ou alternada e a frequência) e em que meio o plasma esta se propagando (eletrodos submersos, por exemplo) (CUBAS, A. L. et al. 2021).

Estudos anteriores realizados pelos pesquisadores SILVA, A.F.F. (2019); GRETTTER, C. (2023) e BENETOLI, L. O. B. (2011) mostraram a efetividade de reatores do tipo ponta-plano operando com ar atmosférico ou nitrogênio puro e água na geração de espécies oxidantes em meio aquoso. Em reatores deste tipo, o plasma é gerado acima da interface gás-liquido e a descarga elétrica é gerada em direção a água. Essas pesquisas também apontaram os parâmetros elétricos (potência elétrica, gap de descarga) de maior eficiência na geração dessas espécies. As pesquisas também determinaram quais as qualidades e os parâmetros químicos dentro do reator de plasma e na PAW gerada.

O esquema do reator de plasma frio está ilustrado na figura 3. O reator consiste de uma câmara cilíndrica de borossilicato com uma tampa de teflon no topo. A câmara possui parede dupla para permitir o controle da temperatura interna do reator por meio de um banho termostatzado. Um transformador de alta tensão (Neonena de 12 kV) foi acoplado a um controlador de tensão primária que por sua vez foi ligado na rede elétrica (220 V a 60 Hz). O controlador de tensão foi ajustado para 200 V, o que gerou uma tensão alternada de cerca de 11 kV entre os polos do transformador. Estes equipamentos elétricos foram utilizados para gerar uma diferença de tensão elétrica entre os dois eletrodos de tungstênio fixados na tampa do reator, sendo um posicionado na atmosfera gasosa acima da interface ar-água e o outro, submerso na água e protegido por um tubo de vidro. Uma bomba de aquário foi empregada no bombeamento de ar pelo tubo de vidro que cobria o segundo eletrodo. Posteriormente a bomba foi substituída por um cilindro de nitrogênio durante os testes de exposição direta dos microrganismos ao plasma. Essa medida visou minimizar a possibilidade de contaminações microbiológicas.

Figura 3: Esquema do reator de plasma frio



Fonte: Adaptado de BENETOLI, L. O. B. (2011).

4.1.2 Cepas e meios de cultura selecionados

As cepas de microrganismos utilizadas foram de *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Brettanomyces bruxellensis*. A *Lactobacillus brevis* pode ser considerada uma boa representante das bactérias ácido-láticas, uma vez que os *Lactobacillus* são os principais contaminantes na indústria cervejeira. Para o cultivo desta cepa tanto em meio líquido quanto sólido utilizou-se do meio de Man, Rogosa e Sharpe (MRS). O MRS é constituído de dextrose, extrato de levedura, peptonas, acetato de sódio (que age como inibidor) e outros sais minerais para a nutrição dos microrganismos. Trata-se de um meio de cultura projetado para favorecer o crescimento de *Lactobacillus* em geral. A *Saccharomyces cerevisiae* também pode ser considerada um contaminante, uma vez que a contaminação cruzada entre levas de cervejas diferentes pode resultar na alteração do perfil das mesmas. A *Brettanomyces bruxellensis* trata-se de uma levedura de origem selvagem normalmente considerada estranha devido a sua capacidade de descarboxilar ácidos fenólicos gerando odores desagradáveis no produto. Para os cultivos de leveduras, tanto sólidos quanto líquidos, utilizou-se de um meio constituído de extrato de levedura, peptona e dextrose (referido pela sua sigla em inglês YPD - *Yeast, Peptone and Dextrose*).

4.2 Métodos experimentais

A primeira metodologia adotada para testar o potencial antimicrobiano do plasma, consistiu em gerar o reagente de água ativada por plasma para em seguida ser testado como agentes antimicrobianos. Para testar o potencial da PAW, foi utilizado um método de determinação de concentração inibitória mínima (CIM), para 3 cepas de microrganismos comuns na indústria cervejeira, que podem agir como contaminantes degradantes. As cepas utilizadas foram dos microrganismos *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus brevis* e *Brettanomyces bruxellensis*.

A segunda metodologia concentrou-se em avaliar o potencial da exposição direta do plasma sobre os microrganismos. Para isso duas cepas foram expostas ao plasma em reatores previamente esterilizados contendo uma solução com microrganismos na concentração de 10^5 células por mililitro. As cepas utilizadas foram de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus brevis*.

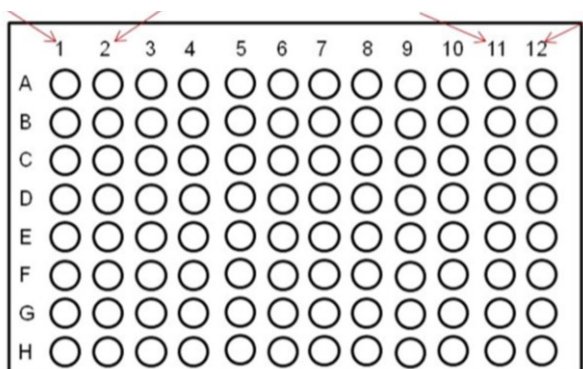
4.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima

Baseado nos estudos realizados por SILVA, A.F.F. (2019); GRETTTER, C. (2023) e BENETOLI, L. O. B. (2011), a produção da PAW seguiu com o seguinte procedimento: 100 mL de água deionizada, adicionada ao reator. Após o ajuste dos parâmetros elétricos, a descarga de plasma frio foi então gerada sobre a superfície da água e mantida ligada pelo intervalo de tempo de 30 minutos. A água exposta ao plasma (PAW) foi transferida para recipientes apropriados e então armazenada até sua utilização futura.

A determinação da CIM comumente ocorreu através da inoculação de microrganismos em uma série de tubos de cultura contendo concentrações decrescentes do agente antimicrobiana. Após um determinado tempo de incubação, verificou-se a ausência de crescimento nas culturas com menor concentração do agente possível. Os tubos de menor concentração do agente nos quais não são observados crescimento (aumento de turbidez ou mudança de coloração) estão próximos da concentração inibitória mínima.

Uma substituição adequada para os tubos é uma placa de elisa, que consiste em uma placa com vários orifícios nos quais os microrganismos são inoculados junto ao meio de cultura com o agente antimicrobiano. A figura 4 mostra uma ilustração de uma placa de elisa para melhor compreensão do processo de diluição e inoculação para os testes.

Figura 4: Placa de elisa para o teste de CIM



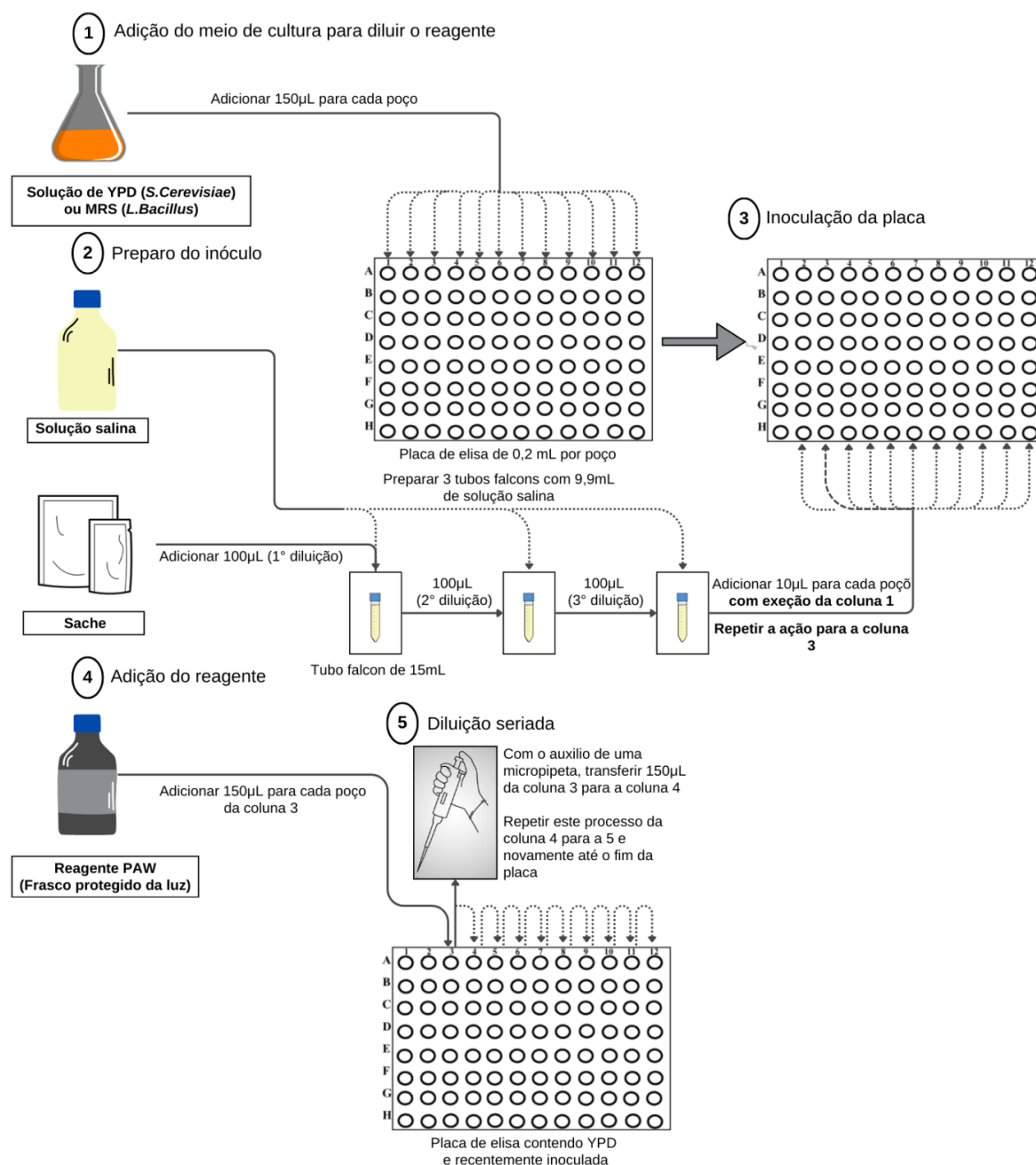
Fonte: “Concentração Mínima Inibitória (CIM) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia”, (2000)

Para a diluição seriada do agente antimicrobiano (nesse caso a PAW), o agente foi adicionado em uma determinada quantidade à coluna 3 com o auxílio de uma micropipeta. Antes disso, os orifícios da placa foram semipreenchidos com um meio de cultura pré-selecionado e inoculados com os microrganismos respectivos aos meios de cultura. Os tubos foram inoculados com os microrganismos da coluna 2 a 12. A coluna 1 foi estabelecida como o controle negativo, além de certificar a esterilidade do meio de cultivo. Já a coluna 2 foi estabelecida como controle positivo e serviu também para certificar-se de que as cepas de microrganismos estavam ativas.

Após a adição da PAW nos tubos da coluna 3 (início da diluição), com o auxílio de uma micropipeta, metade do conteúdo dos tubos foi transferido para os da coluna 4 e assim sucessivamente até a coluna 12. Dessa forma, o agente teve uma diluição seriada de 1/2 a cada coluna.

Para evitar erros por distração e para melhorar a visualização dos resultados optou-se por manter um espaço de 1 linha entre os cultivos nas placas. A fim de comparar a eficácia da PAW com um produto comercial, na última linha de cada placa foi utilizado ácido peracético (comercializado pela Agência Enológica Bresciana - AEB) como reagente em uma concentração de 0,4%, concentração comum de uso no laboratório. Todo o processo de diluição foi realizado em uma capela de fluxo laminar para evitar contaminações pelo exterior. Após a montagem das placas, as mesmas foram mantidas em estufa de crescimento a 30° C por 48 horas. Os resultados foram obtidos observando o aumento da turbidez da solução nos poços da placa. Um fluxograma na figura 5 mostra de forma ilustrativa o processo para o cultivo nas placas de elisa.

Figura 5: Fluxograma de processos: preparo do cultivo em placas de elisa



Fonte: figura elaborada pelo autor utilizando aplicativo Canva. (2024)

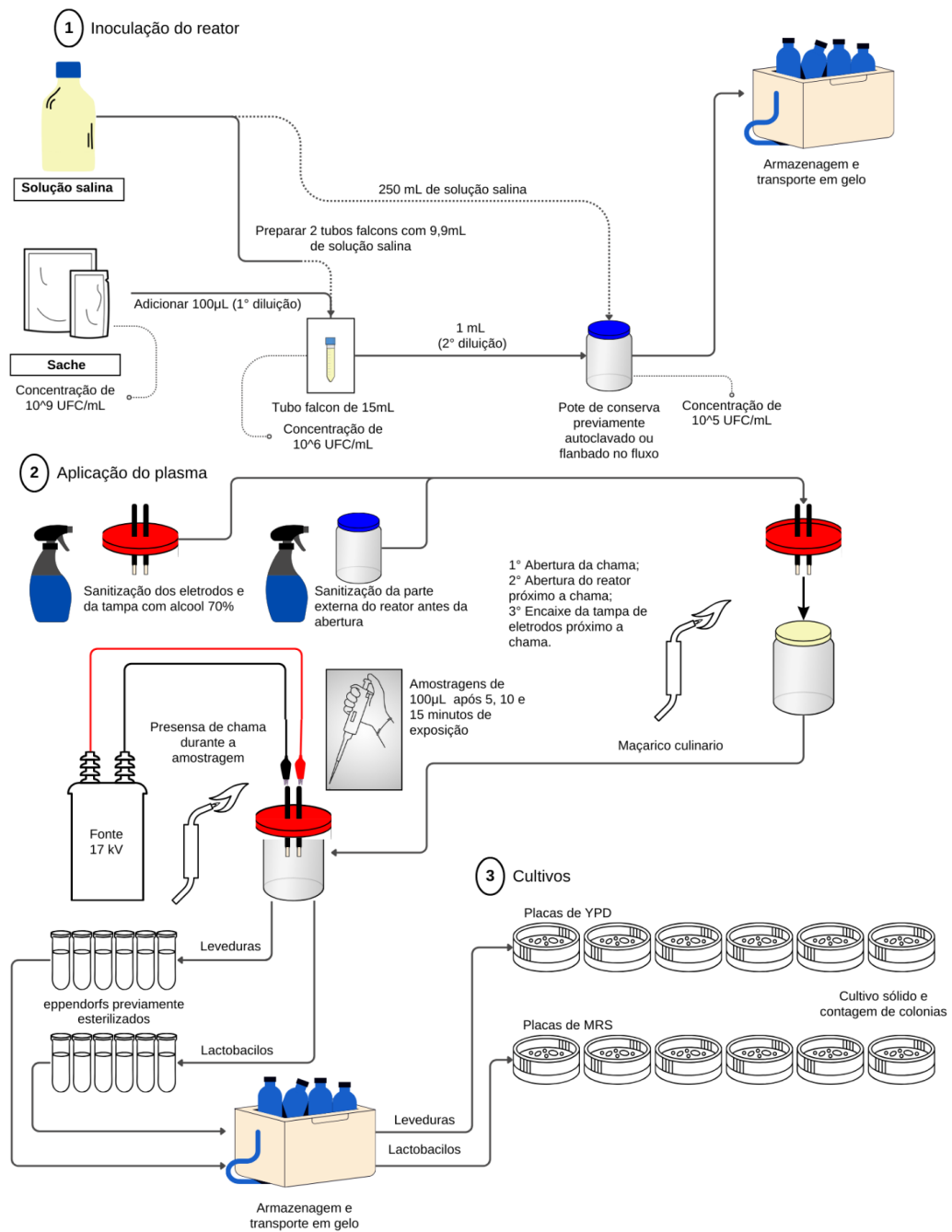
4.1.3 Exposição direta dos microrganismos seguida de cultivo

A metodologia utilizada para esta etapa foi adaptada dos estudos de CUBAS, A. L. et al. (2019). e CUBAS, A. L. et al. (2021). Nestes artigos, testou-se a eficiência de diferentes reatores de plasma na desativação de bactérias de *Escherichia coli* utilizando diferentes gases.

Os microrganismos foram diluídos em frascos previamente esterilizados contendo 250 mL cada de solução salina de 0,85%, também estéril. A concentração após a diluição foi de 10^5 células/mL. Estes frascos foram armazenados em gelo e transportados até o laboratório da UFSC para a aplicação do plasma.

Os arredores do equipamento foram sanitizados com álcool 70 INPM e com o auxílio de uma chama um dos frascos foi aberto. O frasco foi utilizado como reator durante o experimento, por conta disso não foi possível controlar a temperatura do reator. A solução contendo os microrganismos foi exposta ao plasma por 25 minutos e ao longo desse tempo amostras foram retiradas a cada 5 minutos. Com o auxílio de uma micropipeta, 400 µL de amostra foram retirados do reator a cada etapa da exposição. As amostras foram armazenadas em eppendorfs previamente autoclavados e colocadas no gelo para transporte. O mesmo processo foi realizado para os 2 microrganismos nos seus respectivos frascos.

As amostras foram então levadas até uma capela de fluxo laminar onde 100 µL de cada foram inoculadas em placas de cultivo sólido. Uma alíquota das soluções de antes da exposição ao plasma também foi inoculada em placas de cultivo. Os meios de cultura foram de YPD para *Saccharomyces cerevisiae* e MRS para *Lactobacillus brevis*. As culturas foram incubadas por 48 horas em estufa a 30°C. Após esse período o número de colônias formadas foi contado visualmente pelo pesquisador com o auxílio de uma caneta e um contador manual. A figura 6 mostra uma ilustração dos processos realizados nesta etapa.

Figura 6: Fluxograma de processos: exposição direta.

Fonte: figura elaborada pelo autor utilizando aplicativo Canva. (2024)

4.4 Segurança e tratamento de resíduos

Embora o reator de plasma possa gerar campos elétricos de alta tensão, a corrente gerada por este é pequena, não apresentando risco de vida ao operador. Porém os cuidados básicos relativos à utilização da rede elétrica e manipulação de componentes eletrônicos foram levados em consideração. Com relação aos reagentes utilizados tanto nos experimentos quanto nas análises e quanto aos cuidados gerais também é importante destacar que (por conter uma certa quantidade de peróxido de hidrogênio) a PAW pode apresentar atividade corrosiva e urticante. Outras substâncias que foram utilizadas também podem apresentar caráter urticante, como surfactantes industriais ou outros peróxidos, como o ácido peracético.

Quanto ao descarte dos resíduos, a PAW poderá ser descartada na rede municipal após uma diluição adequada, tendo em vista que seus compostos são biodegradáveis. Já para os resíduos biológicos gerados é recomendável a descontaminação por calor húmido antes do descarte em resíduo orgânico ou na rede municipal de esgoto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de exposição direta se mostraram mais elucidativos com relação às propriedades antimicrobianas do plasma. Ao decorrer dos testes microbiológicos, os mesmos equipamentos elétricos foram utilizados de diferentes formas e mostraram diferentes resultados. Nos testes de CIM não foi possível observar claramente a diminuição ou ausência de crescimento dos microrganismos, em comparação ao controle positivo, após a aplicação da PAW. Apenas 1 dos microrganismos testados (*Lactobacillus brevis*) apresentou ausência de crescimento onde a PAW foi aplicada na sua maior concentração (água ativada por plasma diluída em meio de cultura na proporção de 1 parte de PAW para 1 parte de meio de cultura levando a uma diluição de 1/2 da PAW).

Utilizando o método de exposição direta dos microrganismos ao plasma, foi possível observar uma diminuição gradativa na capacidade de multiplicação dos mesmos. O microrganismo mais afetado pela exposição ao plasma também foi o *Lactobacillus brevis*, tendo sua total inativação em menos de 10 minutos de exposição. A *Saccharomyces cerevisiae* também teve sua capacidade de crescimento reduzida consideravelmente, porém sua inativação foi apenas parcial para o tempo total de exposição (25 minutos).

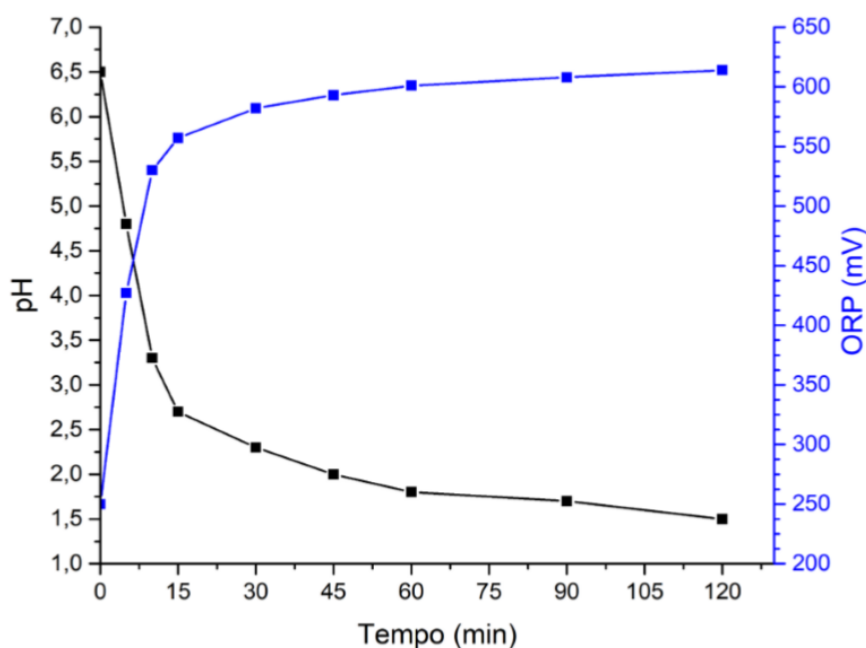
5.1 Determinação da concentração inibitória mínima

5.1.1 Características da PAW gerada pelo reator de plasma frio utilizado

As características do reator de plasma a frio foram definidas em estudos realizados por SILVA, A.F.F. (2019); GREYTER, C. (2023) e BENETOLI, L. O. B. (2011) antes dos experimentos desta pesquisa. Nestes estudos foram avaliados parâmetros referentes à capacidade do reator de gerar espécies oxidativas em diferentes condições. Estes estudos foram importantes para definir como foi a geração da PAW (vide item 4.2.3).

Em GREYTER, C. (2023) estabeleceu-se uma correlação entre o tempo de exposição da água ao plasma e a alteração de suas propriedades físico-químicas. Os dados do experimento e as relações observadas estão no gráfico 1. Observou-se que o potencial hidrogeniônico (pH) diminuiu ao longo da exposição, o que sinaliza o surgimento de espécies de aumentar a concentração de íons hidrônio na solução. Outra propriedade química verificada no estudo foi o potencial oxirredutivo (ORP - *Oxirreductive potential*) da solução, que teve um aumento ao longo da exposição. O aumento da ORP sinaliza que houve formação de espécies oxidantes durante a exposição e que estas foram incorporadas à solução. A ORP representa a soma dos potenciais de oxirredução das espécies presentes na PAW. Ela apresenta uma relação logarítmica com a concentração das espécies oxidantes da solução, o que significa que um pequeno aumento pode representar uma grande mudança na concentração das espécies. A ORP da solução exposta ao plasma aumenta rapidamente no início da exposição. Porém a taxa de crescimento da ORP diminui exponencialmente até se estabilizar em um platô.

Gráfico 1: Evolução temporal de pH e ORP da PAW ao longo da exposição ao plasma atmosférico.



Fonte: GRETTTER, C. (2023).

O potencial oxidativo de uma espécie oxidante representa a capacidade desta de remover elétrons de outras substâncias. Entre as substâncias passíveis de oxidação estão moléculas biológicas presentes nos microrganismos. Assim, a ORP pode representar indiretamente um dos parâmetros para medir a capacidade antimicrobiana da PAW. Os radicais gerados pelo plasma promovem a ruptura da membrana plasmática, a desnaturação proteínas e a fragmentação do DNA, além de gerar substâncias tóxicas no interior das células.

Outro parâmetro importante na ação antimicrobiana da PAW é o pH após a exposição. Assim como a ORP o pH representa uma escala logarítmica, porém inversamente proporcional a concentração de íons hidrônio na solução. A diminuição do pH em uma solução contendo microrganismos pode acarretar na desnaturação de proteínas presentes em suas estruturas. O pH da solução exposta ao plasma também sofre uma mudança acentuada no início, mas estabiliza após 30 minutos.

5.1.2 Testes de concentração inibitória mínima

As placas dos testes de CIM foram fotografadas após os testes e suas imagens editadas para melhor compreensão dos resultados. As figuras 7, 8 e 9 apresentam os resultados das placas contendo respectivamente os microrganismos *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus brevis* e *Brettanomyces bruxellensis*. Nas legendas sobrepostas às imagens tem-se as seguintes informações: canto superior, grau de diluição; canto inferior, número dos poços nas coordenadas da placa; canto direito, letra da linha utilizada na placa; canto esquerdo, reagente utilizado e diluição da CIM no teste (S.I. -.Sem inibição). Os poços onde houveram inibição total dos microrganismos (CIM), foram marcados com um X na cor verde.

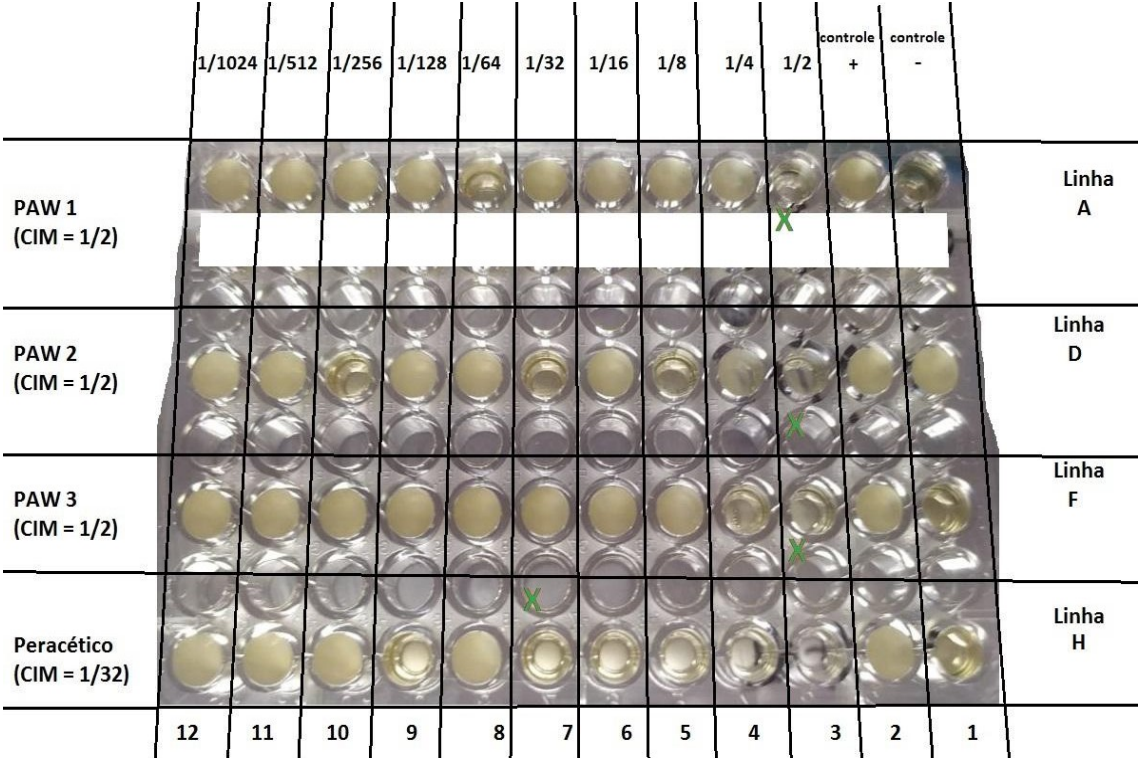
Figura 7: Resultados dos testes de CIM para *Saccharomyces cerevisiae*

(foto da placa de elisa após a incubação).

	1/1024	1/512	1/256	1/128	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	controle +	controle -	
PAW 1 (S.I.)													Linha A
PAW 2 (S.I.)													Linha D
PAW 3 (S.I.)													Linha F
Peracético (CIM = 1/8)													Linha H
	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	

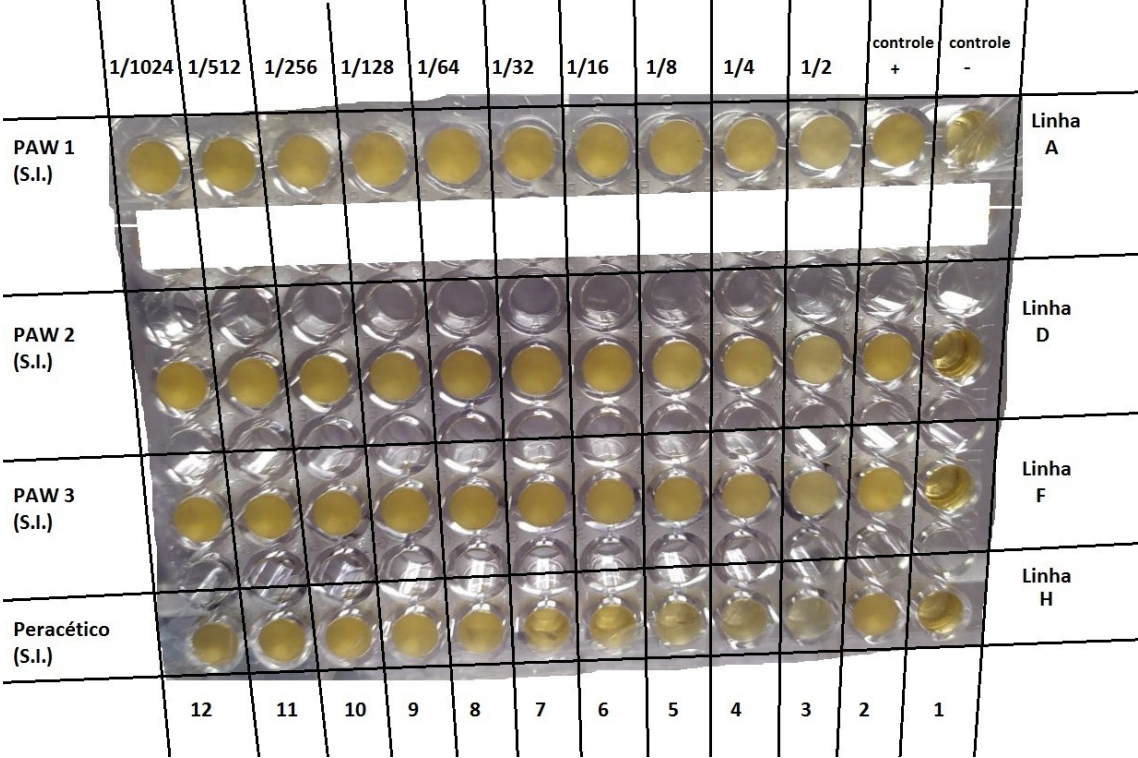
Fonte: Fotografia registrada pelo autor com um telefone portátil e editada no aplicativo Paint. (2024)

Figura 8: Resultados dos testes de CIM para *Lactobacillus brevis*
(foto da placa de elisa após a incubação).



Fonte: Fotografia registrada pelo autor com um telefone portátil e editada no aplicativo Paint. (2024)

Figura 9: Resultados dos testes de CIM para *Brettanomyces bruxellensis*
(foto da placa de elisa após a incubação).



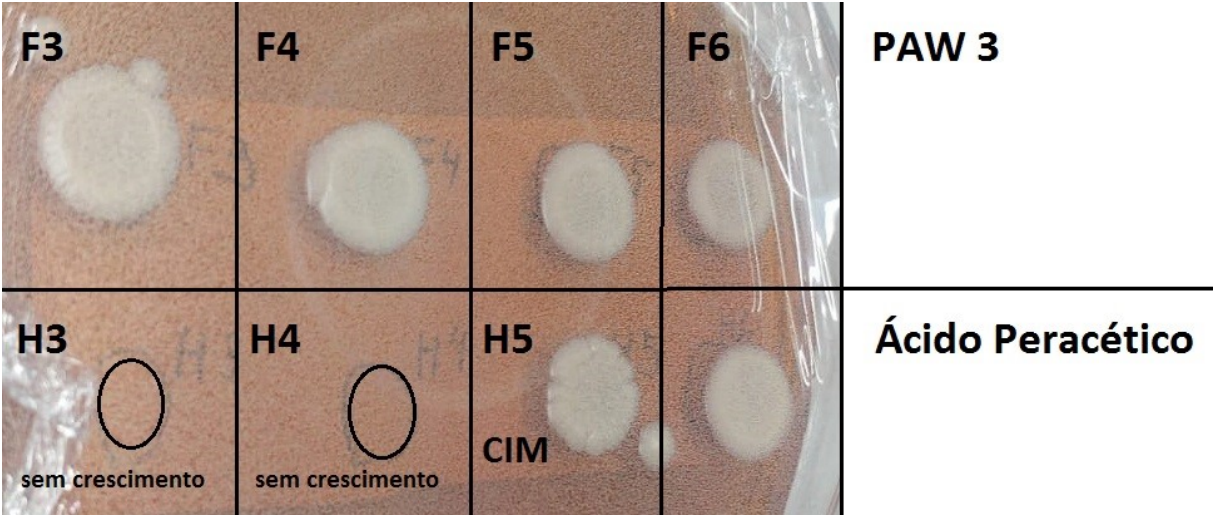
Fonte: Fotografia registrada pelo autor com um telefone portátil e editada no aplicativo Paint. (2024)

Não foi observada diminuição ou ausência de crescimento, em comparação ao controle positivo, nos poços onde a PAW foi aplicada para as placas de *Saccharomyces* e *Brettanomyces*. Somente a placa contendo *Lactobacillus* teve ausência de crescimento nos poços de concentração máxima da PAW (1/2). No entanto, os poços contendo ácido peracético apresentaram ausência de crescimento desde a concentração mais elevada (1/2 ou 0,2%) até a concentração diluída em 1/32 (0,0125%). Já na placa contendo *Saccharomyces* o ácido peracético diluído apresentou CIM de 1/8 (0,05%). Para a placa contendo *Brettanomyces* nem mesmo o ácido peracético pode inibir completamente o crescimento do microrganismo, mas foi possível observar uma redução na turbidez nos primeiros poços.

Após a incubação dos microrganismos em placas de elisa, foi feito o repique do cultivo de alguns poços para um meio de cultura sólido da placa contendo *Saccharomyces*. Selecionou-se uma das linhas da placa na qual foi aplicada a PAW. Para critério de comparação, o mesmo procedimento foi realizado para a linha onde o ácido peracético foi aplicado. A figura 10 apresenta o resultado do cultivo sólido dos microrganismos da placa de elisa contendo *Saccharomyces cerevisiae*. A imagem foi editada para melhor compreensão dos dados. Na legenda sobreposta é possível ver a coordenada na placa de elisa de onde foi retirado o inóculo do cultivo sólido (canto superior esquerdo dos espaços), o local de aplicação dos inóculos que não apresentaram crescimento e o reagente que foi utilizado na fileira da placa de elisa.

A placa de petri contendo o cultivo sólido foi marcada com círculos na parte posterior. Em cada um dos círculos foi transferido uma alíquota de 10 µL de poços pré-selecionados. Após a secagem das gotas, o cultivo foi incubado por 48 horas a 30°C. O critério de seleção dos poços teve em vista o objetivo de verificar visualmente a redução na capacidade de crescimento dos microrganismos (formação de colônias maiores em concentrações mais baixas de reagentes). Em teoria, à medida que a concentração do reagente utilizado fosse menor, seria possível ver pequenas colônias sendo formadas até se aglutinarem em um halo formado por microrganismos. Porém houve pouca ou nenhuma diferença entre o crescimento das *Saccharomyces* no cultivo sólido.

Figura 10: Resultado do cultivo sólido dos microrganismos da placa de elisa contendo *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: Fotografia registrada pelo autor com um telefone portátil e editada no aplicativo Paint. (2024)

5.2 Exposição direta dos microrganismos ao plasma

Ao final do experimento, utilizou-se um pHmetro multifunção para medir o pH, a ORP e a temperatura das soluções de microrganismos. Além de um termômetro digital, o pHmetro contava com um eletrodo de vidro específico para aferições de pH e um eletrodo da marca Instrutherm modelo ORP- 897 (específico para aferições de ORP) que pode ser acoplado no lugar do eletrodo de pH após a medida do mesmo. Os valores relacionados às propriedades físico-químicas das soluções ao final do experimento estão na tabela 3 juntamente com o valor aproximado das mesmas propriedades analisadas por GRETTTER, C. (2023). Ao serem comparados com a literatura, os valores obtidos confirmam que as soluções presentes nos reatores atingiram o estado de ativação esperado.

Tabela 3: Valores de pH, ORP e temperatura das soluções contendo microrganismos ao final do tempo total de exposição

Microrganismo presente no reator	pH	ORP (mV)	T (°C)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3,30	542	39,2
<i>Lactobacillus brevis</i>	3,42	549	36,0
Dados da PAW coletados por GRETTER, C. (2023) após 30 minutos de exposição ao plasma (aproximado)	2,27	581	—

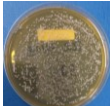
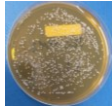
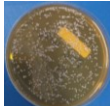
Fonte: Dados coletados pelo autor. (2024)

Os *Lactobacillus* se mostraram mais sensíveis ao plasma que as leveduras. Com menos de 10 minutos de exposição os *Lactobacillus* presentes na solução do reator perderam totalmente a sua capacidade de multiplicação. As bactérias, em geral, costumam apresentar menos resistência a agentes químicos ou adversidades do meio em que estão inseridas em comparação às leveduras. Isso ocorre, pois as bactérias possuem barreiras mais frágeis separando o meio do seu citoplasma ou do seu material genético.

A parede celular de uma levedura, como a *Saccharomyces cerevisiae*, é composta por uma camada interna estruturada por glucanos e quitina e uma camada externa de manoproteínas ligadas a camada interna (SANTOS, 2013). Dessa forma a parede celular das leveduras se torna uma robusta estrutura capaz de proteger a célula de agentes de superfície danosos. Esta é uma possível explicação para a *Saccharomyces* apresentar maior resistência ao plasma e a água ativada.

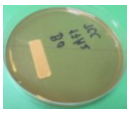
Os dados dos cultivos sólidos feitos a partir de inócuos expostos ao plasma são apresentados nas tabelas 4 e 5, sendo elas respectivamente relativas aos microrganismos *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus brevis*. Nas imagens presentes na tabela 4, é possível observar a redução gradual da quantidade de colônias de *Saccharomyces cerevisiae* (pontos brancos dentro da placa) ao decorrer do tempo de exposição. Porém, também é possível observar que houve uma ocorrência significativa de sobreposição das colônias, o que impede uma relação direta do número de colônias com o número de unidades formadoras de colônia e dificulta a contagem. Este fato pode explicar porque não houve redução na contagem de colônias nos tempos de exposição de 5 para 10 minutos e de 15 para 20 minutos. Já nas imagens da tabela 5 pode-se observar que a sensibilidade da cepa de *Lactobacillus brevis* ao plasma foi alta o bastante para inibir o crescimento de colônias maiores e mais visíveis no mesmo tempo de cultivo que foi usado para a *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 4: Dados da contagem visual de colônias dos cultivos sólidos feitos a partir de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* exposto ao plasma

Tempo de exposição (minutos)	0	5	10	15	20	25
Contagem das colônias	2839	1993	2035	1014	1089	511
Imagem das placas						

Fonte: Dados coletados pelo autor e fotografias registradas pelo autor com um telefone portátil

Tabela 5: Dados da contagem visual de colônias dos cultivos sólidos feitos a partir de inóculo de *Lactobacillus brevis* exposto ao plasma

Tempo de exposição (minutos)	0	5	10	15	20	25
Contagem das colônias	258	20	0	0	0	0
Imagem das placas						

Fonte: Dados coletados pelo autor e fotografias registradas pelo autor com um telefone portátil

6 CONCLUSÃO

O estudo analisou a eficácia da Água Ativada por Plasma (PAW) como agente antimicrobiano na indústria cervejeira. O trabalho incluiu a produção de um sanitizante à base de PAW utilizando um reator de plasma híbrido gás-líquido que operou com ar atmosférico e água deionizada. Além disso, foram realizadas exposições diretas dos microrganismos ao plasma em uma solução salina, utilizando nitrogênio como gás plasmogênico. A avaliação do poder sanitizante do plasma e da PAW no combate de microrganismos degradadores seguiu através das duas metodologias citadas: CIM utilizando PAW contra os microrganismos estudados e exposição direta dos mesmos ao plasma sobre uma solução salina.

Embora a PAW, na concentração máxima do teste de CIM, tenha demonstrado sucesso na inativação de *Lactobacillus brevis*, o ácido peracético teve uma eficiência significativamente maior. O ácido peracético teve sucesso em inibir o crescimento de *Lactobacillus brevis* e *Saccharomyces cerevisiae* com maior eficiência contra as *Lactobacillus brevis*.

As leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* e *Brettanomyces bruxellensis* demonstraram maior resistência aos testes de CIM. Além disso, a *Saccharomyces cerevisiae* sofreu apenas inibição parcial quando exposta diretamente ao plasma. Essa resistência pode ser atribuída à robustez da parede celular das leveduras, que oferece uma proteção adicional contra agentes antimicrobianos.

A metodologia utilizando exposição direta foi mais elucidativa com relação às propriedades antimicrobianas do plasma. Já os testes de CIM mostraram que a PAW teve uma eficiência menor que a de um sanitizante comercial. A baixa eficiência da PAW em inibir o crescimento dos microrganismos nos testes de CIM pode ter relação com 3 fatores: baixa concentração de compostos oxidantes e acidificantes na PAW produzida, diluição inicial da PAW muito alta e reações imprevistas dos compostos oxidantes com a matéria orgânica do próprio meio de cultivo.

Em estudos futuros da PAW, novos testes microbiológicos podem ser aplicados com enfoque na descontaminação de superfícies. Um destes estudos pode ser realizado utilizando análises de diluição de uso. Este tipo de análise se baseia na introdução de cilindros carreadores, previamente contaminados com microrganismos, em tubos de ensaio contendo o sanitizante. Posteriormente os cilindros são transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultura adequado para a incubação. Outras linhas de estudo também podem envolver a aplicação direta do plasma a outros materiais de importância microbiológica (como mosto cervejeiro ou meios de cultura contaminados) e a análise dos compostos formados após a aplicação. Uma destas futuras linhas de pesquisa utilizando exposição direta de materiais ao plasma pode consistir em produzir lotes de cerveja utilizando plasma para descontaminação da água ou do mosto, seguida de análises microbiológicas e posteriormente uma análise sensorial.

6 REFERÊNCIAS

Anuário da Cerveja 2022 — Ministério da Agricultura e Pecuária. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/anuario-da-cerveja-2022/view>>.

Anuário da Cerveja 2023 — Ministério da Agricultura e Pecuária. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/com-1-847-ervejarias-registradas-no-brasil-setor-cresce-6-8-em-2023/anuario-da-cerveja>>.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**, v. 4. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

AQUILANI, B. et al. Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. **Food Quality and Preference**, v. 41, p. 214–224, abr. 2015.

BENETOLI, L. O. B. Desenvolvimento e aplicação de reator de plasma frio na degradação do corante azul de metileno em meio aquoso. 2011. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.902, de 08 de julho de 2019. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 5 jun. 2009. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2019-2022/2019/Decreto/D9902.htm#art1> . Acesso em: 11/11/2023.

BRUGGEMAN, P. J. et al. Plasma–liquid interactions: a review and roadmap. **Plasma Sources Science and Technology**, v. 25, n. 5, p. 053002, 30 set. 2016.

CAPECE, A. et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, p. 22– 30, nov. 2018.

CHU, P. K.; LU, X. **Low Temperature Plasma Technology**. [s.l.] CRC Press, 2013.

CUBAS, A. L. V.; FERREIRA, F. M.; GONÇALVES, D. B.; MACHADO, M. M.; DEBACHER, N. A.; MOECKE, E. H. S. Influence of non-thermal plasma reactor geometry and plasma gas on the inactivation of *Escherichia coli* in water. **CHEMOSPHERE**, v. 277, p. 130255, 2021.

CUBAS, A. L. V.; MACHADO, M. M.; SANTOS, J. R.; ZANCO, J. J. ; RIBEIRO, D. H. B.; MOECKE, E. H. S.; DEBACHER, N. A. Effect of chemical species generated by different geometries of air and argon non-thermal plasma reactors on bacteria inactivation in water. **SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY**, v. 222, p. 68-74, 2019.

DAS GRAÇAS GOMES, M. et al. UV-visible spectrum of nitrous acid in solution: pKa determination and analytical applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 282, n. 1, p. 29 81–85, out. 1993.

DIAS, D. R.; PANTOJA, L.; SCHWAN, R.F. “Fermentados de Frutas”. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas Alcoólicas – Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Blucher. v. 1. 2010. p. 85-111.

Dragone, Giuliano & Mussatto, Solange & Nogueira, Alvaro & de Almeida e Silva, João. (2007). Produção de cerveja: microrganismos deteriorantes e métodos de detecção. **Brazilian Journal of Food Technology**. 10. 240-251.

DRAGONE, G.; ALMEIDA E SILVA, J.B.. “Cerveja”. In: VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas Alcoólicas – Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Blucher, v. 1, 2010, p. 15-50.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança de Alimentos**, 2 ed., Artemed, Porto Alegre, 2013.

FRIDMAN, Alexander. **Plasma Chemistry**. New York, USA: Cambridge University Press, 2008.

GABRIEL GERBER HORNINK. **Princípios da produção cervejeira e as enzimas na mosturação** - 2a ed. 2024. [s.l.] Gabriel Gerber Hornink, 2024.

GRETTER, C. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS DEPARTAMENTO DE QUÍMICA **DEGRADAÇÃO DE RESINA AGLUTINANTE EM RESÍDUO DE MADEIRA MDF INDUZIDA POR PLASMA FRIO**. 2023. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/248421/TCC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 22 jan. 2025.

HERIANTO, S. et al. Nonthermal plasma- activated water: A comprehensive review of this new tool for enhanced food safety and quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 583–626, 23 nov. 2020.

Hungary, August 1997.1. **Journal of Biotechnology**, v. 65, n. 2-3, p. 85–98, out. 1998.

JACKSON, M.. Cerveja. Traduzido por Marina Slade Oliveira. 2ª edição- Rio de Janeiro: Jorge Zahar Ed., 2010.

Laroussi, M. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma, **IEEE Trans. Plasma Sci.** 24 (1996) 1188–1191.

LINKO, M. et al. Recent advances in the malting and brewing industry. Based on a lecture held at the symposium 'Biotechnology in advanced food and feed processing', at the 8th European Congress on Biotechnology (ECB8) in Budapest,

LÓPEZ, M. et al. A Review on Non-thermal Atmospheric Plasma for Food Preservation: Mode of Action, Determinants of Effectiveness, and Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2 abr. 2019.

Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/76442/1/bot049-092013.pdf>>.

MUNROE, J.H. "Fermentation". In: HARDWICK, W.A. **Handbook of Brewing**. New York: Marcil Dekker, 1994, p. 323-362.

MUXEL, A. A. **Química da cerveja: Uma abordagem química e bioquímica das matérias-primas, processo de produção e da composição dos compostos de sabores da cerveja**. 1a edição ed. [s.l.] Appris Editora, 2022.

OLIVEIRA, M. et al. Plasma-activated water: A cutting-edge technology driving innovation in the food industry. **Food Research International**, v. 156, p. 111368, 1 jun. 2022.

RICHARDS, K. **A Elaboração de Cerveja - Para o Principiante**. [s.l.] Babelcube Inc., 2017.

ROBERTO, O. et al. Caracterização de leveduras selvagens para a produção de cerveja. **Ciências agrárias: Debates emblemáticos e situação perene**. Atena editora. v. 3. 2013. Disponível em:<<https://atenaeditora.com.br/catalogo/download-post/80514>>.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance.

International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 105-124, 2003.

SANTOS, R. Influência dos carboidratos e da expressão de genes relacionados à parede celular na floculação de *Saccharomyces cerevisiae* **UFES**. 2013. Disponível em:

<https://sappg.ufes.br/tese_drupal/tese_6398_Disserta%E7%E3o_Renan%20Vasconcelos%20Santos_2013.pdf> Acesso em: 30/01/2025.

SILVA, A. F. F. Análise da performance oxidativa de um reator de plasma frio e sua relação com os parâmetros químicos. **Ufsc.br**, 2019.

SOUZA, G. P. D. Elaboração de cervejas tipo lager a partir de farinha de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) como adjunto, em bioprocessos conduzidos com leveduras livres e imobilizadas. **UEA**. 2010. Disponível em:

<<https://ri.uea.edu.br/handle/riuea/2185>>. Acesso em: 4 jun. 2024.

THIRUMDAS, R. et al. Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. **Trends in Food Science & Technology**, v. 77, p. 21–31, 1 jul. 2018.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Bebidas: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Ed. Acribia, v. 2, 1997, p. 289-29

VAUGHAN, A.; O'SULLIVAN, T.; SINDEREN, D. Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer - A Review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, n. 4, p. 355–371, 2005.

WENZEL, Guido Edgar. **Bioquímica experimental dos alimentos** [recurso eletrônico] / Guido E. Wenzel - 2. Ed. - São Leopoldo, RS: Ed. UNISINOS, 2023.

WETTERS, J. H.; UGLUM, K.L. Direct spectrophotometric simultaneous determination of nitrite and nitrate in the ultraviolet. **Analytical Chemistry**, v. 42, n. 263, p. 335–340, 1 mar. 1970.

WHITE, C.; JAMIL ZAINASHEFF. **Yeast : the practical guide to beer fermentation**. Boulder, Co: Brewers Publications, 2010