

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ROBERT LUAN MEURER

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE VIDROS POLIFOSFATOS COM POTENCIAL
ANTIMICROBIANO PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA**

TOLEDO

2025

ROBERT LUAN MEURER

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE VIDROS POLIFOSFATOS COM POTENCIAL
ANTIMICROBIANO PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF POLYPHOSPHATE GLASSES WITH
ANTIMICROBIAL POTENTIAL FOR AGRICULTURAL APPLICATIONS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientador: Prof. Ricardo Schneider.

**TOLEDO
2025**



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

ROBERT LUAN MEURER

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE VIDROS POLIFOSFATOS COM POTENCIAL
ANTIMICROBIANO PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado
como requisito para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

20/fevereiro/2025

Ricardo Schneider (Orientador)
Doutor em Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Renato Eising
Doutor em Química Orgânica
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Gabrielle Caroline Peiter
Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

TOLEDO

2025

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o apoio emocional e financeiro ao longo dessa jornada.

Ao meu orientador, Ricardo Schneider, por todos os ensinamentos, apoio e disposição durante a realização deste trabalho.

À pesquisadora Gabrielle Peiter, por todo o apoio e disponibilidade de tempo para me auxiliar nos experimentos e esclarecimento de dúvidas.

Ao meu amigo moçambicano, Sérgio Sabão, pela ajuda, incentivo e pelos momentos vividos juntos no laboratório.

À UTFPR/PROREC pelo suporte financeiro para a realização dessa pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da UTFPR através do programa de bolsas TCC Inovação.

À UFPR - Toledo pelo suporte e infraestrutura.

“- Quem estará nas trincheiras ao teu lado?

- E isso importa?

- Mais do que a própria guerra.”

Ernest Hemingway

RESUMO

O aumento da resistência de microrganismos fitopatogênicos aos defensivos agrícolas convencionais têm impulsionado a busca por alternativas sustentáveis no controle de doenças em plantas. Entre essas alternativas, os vidros polifosfatos e borofosfatos têm se destacado visto suas propriedades antimicrobianas e potencial como fertilizantes de liberação controlada. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo a síntese e aplicação de vidros polifosfatos com e sem a adição de boro em diferentes microrganismos fitopatogênicos (*Rhizoctonia solani* e *Clavibacter michiganensis*), a fim de avaliar a atividade antimicrobiana desses materiais. Dois vidros foram testados: um polifosfato puro e um polifosfato com 10% de boro (m/m), ambos sintetizados pela técnica de *melting-quenching* a 400 °C por 1 hora. Os vidros foram avaliados por meio de ensaios microbiológicos, incluindo a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM). Além dos testes microbiológicos, os vidros foram aplicados em tomates (*Solanum lycopersicum* 'Roma') contaminados com *C. michiganensis*, demonstrando potencial na inibição da bactéria sem causar danos visíveis ao fruto. Os resultados dos testes microbiológicos foram satisfatórios e demonstraram que ambos os vidros utilizados possuem atividade contra os microrganismos testados, sendo o vidro borofosfato o que apresentou melhor desempenho. Esses achados sugerem uma possível aplicação desses vidros na agricultura na forma de compostos capazes de proteger culturas como o milho e o tomate contra pragas microbiológicas e, ao mesmo tempo, suprir a necessidade de micronutrientes para as plantas, como o fósforo e o boro, bem como o zinco e o molibdênio quando dopados com esses elementos.

Palavras-chave: fitopatogênicos; polifosfatos; *Clavibacter michiganensis*; *Rhizoctonia solani*; *Solanum lycopersicum* 'Roma'

ABSTRACT

The increasing resistance of phytopathogenic microorganisms to conventional agricultural pesticides has driven the search for sustainable alternatives to control plant diseases. Among these alternatives, polyphosphate and borophosphate glasses have stood out due to their antimicrobial properties and potential as controlled-release fertilizers. In this context, this work aimed to synthesize and apply polyphosphate glasses with and without the addition of boron in different phytopathogenic microorganisms (*Rhizoctonia solani* and *Clavibacter michiganensis*), in order to evaluate the antimicrobial activity of these materials. Two glasses were tested: a pure polyphosphate and a polyphosphate with 10% boron (w/w), both synthesized by the melting–quenching technique at 400 °C for 1 hour. The glasses were evaluated by microbiological tests, including the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC). In addition to microbiological tests, the glasses were applied to tomatoes (*Solanum lycopersicum* 'Roma') contaminated with *C. michiganensis*, demonstrating potential in inhibiting the bacteria without causing visible damage to the fruit. The results of the microbiological tests were satisfactory and demonstrated that both glasses used have activity against the microorganisms tested, with borophosphate glass being the one that showed the best performance. These findings suggest a possible application of these glasses in agriculture in the form of compounds capable of protecting crops such as corn and tomatoes against microbiological pests and, at the same time, meeting the plants' need for micronutrients, such as phosphorus and boron, as well as zinc and molybdenum when doped with these elements.

Keywords: phytopathogenic; polyphosphates; *Clavibacter michiganensis*; *Rhizoctonia solani*; *Solanum lycopersicum* 'Roma'

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comportamento do volume em função da temperatura para um líquido. T_{g2} representa a temperatura de transição vítrea para um líquido sob taxa de resfriamento maior e T_{g1} é a temperatura de transição vítrea sob menor taxa de resfriamento. T_f é a temperatura de fusão	14
Figura 2 - Resultados do teste de CIM para o fungo <i>Rhizoctonia solani</i>	24
Figura 3 - Resultados do teste de CFM para o fungo <i>Rhizoctonia solani</i>	25
Figura 4 - Resultados do teste de CIM para a bactéria <i>Clavibacter michiganensis</i>	26
Figura 5 - Resultados do teste de CBM para a bactéria <i>Clavibacter michiganensis</i>	27
Figura 6 - Diâmetro médio dos halos em função da concentração da solução	28
Figura 7 - Resultados do teste de difusão por poços	29
Figura 8 - Resultados do plaqueamento da solução de lavagem dos tomates	30
Figura 9 - Tomates após 72 horas da contaminação por <i>C. michiganensis</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de sementes e respectivos tratamentos realizados	18
Tabela 2 - Grupos de tratamento para o teste com os tomates	22
Tabela 3 - Diâmetro dos halos formados no teste de difusão por poços	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASTM	<i>American Society for Testing Materials</i>
T _g	Temperatura de transição vítrea
B ₂ O ₃	Óxido bórico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
NH ₄ H ₂ PO ₄	Fosfato de amônio monobásico
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
DO	Densidade óptica
MH	<i>Mueller Hinton</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CBM	Concentração bactericida mínima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivos específicos.....	14
3 HIPÓTESES E JUSTIFICATIVAS.....	15
4 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
4.1 Vidros.....	16
4.1.1 Síntese de vidros.....	17
4.1.2 Vidros baseados em fosfatos.....	18
4.2 Vidros enriquecidos com micronutrientes.....	19
4.3 Agentes fitopatogênicos e suas implicações na agricultura.....	19
4.3.1 Rhizoctonia solani: características e impacto agrícola.....	20
4.3.2 Clavibacter michiganensis: características e impacto agrícola.....	20
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.1 Síntese dos vidros polifosfatos.....	21
5.2 Diluição e solubilização dos vidros.....	22
5.3 Testes microbiológicos.....	22
5.3.1 Preparo dos inóculos.....	22
5.3.2 Ajuste de densidade dos inóculos.....	22
5.3.3 Microdiluição em placas para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	23
5.3.4 Testes de CFM e CBM.....	24
5.3.5 Teste de difusão por poços.....	24
5.4 Teste com o tomate Solanum lycopersicum 'Roma'.....	25
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6.1 Testes de atividade antimicrobiana in vitro.....	27
6.2 Teste de difusão por poços para a C. michiganensis.....	30
6.3 Aplicação dos vidros em tomates contaminados.....	33
7 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

A estimativa de crescimento populacional mundial será positiva até 2050 - especialmente em países emergentes como China, Índia e Brasil. Dessa forma, certamente haverá um acréscimo significativo na demanda por alimentos nas próximas 3 décadas com relação à demanda existente nos dias atuais ^[1]. O investimento em novas e melhores tecnologias visando o aumento no rendimento das culturas agrícolas faz-se essencial, principalmente frente às variações climáticas e catástrofes naturais que estão sendo vivenciadas em todo o mundo.

Fertilizantes e defensivos agrícolas são empregados há muito tempo na agricultura, o que possibilitou um aumento substancial na produtividade e controle de pragas ao longo dos anos. Contudo, uma grande desvantagem do uso desses produtos é sua toxicidade à vida humana e animal e a contaminação do solo e efluentes das regiões próximas às plantações.

Tendo em vista a importância e urgência do assunto, pesquisas que buscam por novas tecnologias capazes de reduzir ou até mesmo substituir os fertilizantes e defensivos agrícolas vêm ganhando notoriedade, entre elas, o desenvolvimento de materiais que sejam capazes de exercer as duas funções, aliando estudos nas áreas química e biotecnológica.

Os vidros são materiais com as mais variadas aplicações. A aplicação dos vidros fosfatos como antifúngicos e bactericidas, bem como compostos nutritivos para as sementes e plantas é relativamente simples e fácil de se obter. O ácido bórico é comprovadamente citotóxico para uma ampla variedade de fungos, incluindo aqueles que atacam as plantas em sua fase germinativa e pode ser facilmente adicionado à rede fosfato, assim como micronutrientes como molibdênio, cálcio, zinco e cobre, que suprem todas as necessidades de uma ampla gama de cultivares em seu estágio inicial.

Como a rede de vidros fosfato é baseada em uma estrutura tetraédrica PO_4 , suas ligações podem ser facilmente alteradas pela alteração da temperatura ou exposição à umidade, uma propriedade interessante para liberação contínua de compostos em um solvente inerte como a água ^[13].

Além disso, sua baixa durabilidade química facilita a adição de outros componentes à rede vítrea que além de beneficiar as características do próprio vidro, aumentam a aplicabilidade do mesmo, como é o caso do óxido bórico (B_2O_3). As estruturas BO_3 e BO_4 ligam-se ao grupo fosfato, conferindo uma maior estabilidade química ao arranjo tridimensional da rede ^[15].

Nesse contexto, com a finalidade de avaliar a potencial aplicação destes vidros no ramo agrícola, foram realizados testes microbiológicos com dois diferentes microrganismos fitopatógenos a fim de verificar a atividade antimicrobiana dos vidros, pois como já apresentado em diversos estudos, é esperado que os vidros polifosfato e borofosfato apresentem potencial antifúngico e antibacteriano.

Dessa forma, ao aplicar uma solução vítrea em um ambiente contaminado pelos microrganismos de estudo, espera-se que os mesmos sejam eliminados e/ou inibidos, de modo análogo ao que ocorre quando há a aplicação de fungicidas e bactericidas convencionais.

2 OBJETIVOS

A pesquisa tem como objetivo geral testar duas formulações vítreas (polifosfato e borofosfato) para aplicação na agricultura, avaliando a capacidade protetiva desses vidros em culturas como o milho e o tomate. O potencial nutritivo será avaliado tendo em vista a composição da matriz vítrea enquanto o potencial protetivo será avaliado através de testes de capacidade inibitória do crescimento de microrganismos que atacam as culturas citadas.

2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar os vidros polifosfatos e borofosfatos, avaliando sua composição química e estrutura;
- Investigar a solubilidade dos vidros em solução aquosa e sua capacidade de liberação controlada de compostos ativos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos vidros contra os fitopatógenos *Rhizoctonia solani* e *Clavibacter michiganensis* em diferentes concentrações;
- Testar a eficácia antimicrobiana dos vidros quando aplicados diretamente em tomates contaminados com *C. michiganensis*;
- Verificar o potencial de aplicação agrícola das soluções aquosas dos vidros, analisando sua ação antimicrobiana e possível efeito na nutrição das plantas.

3 HIPÓTESES E JUSTIFICATIVAS

O crescimento populacional global e as mudanças climáticas representam desafios significativos para a agricultura, aumentando a necessidade de soluções inovadoras que garantam a segurança alimentar e a sustentabilidade do setor. Além da crescente demanda por alimentos, eventos climáticos extremos, como secas e enchentes, têm impactado diretamente a produção agrícola, reduzindo a produtividade e comprometendo a qualidade dos cultivos.

Nesse contexto, o desenvolvimento de alternativas eficientes e sustentáveis para fertilização e controle microbiológico torna-se essencial. Os vidros polifosfatos e borofosfatos surgem como uma estratégia promissora, pois combinam ação antimicrobiana contra fitopatógenos e liberação controlada de micronutrientes essenciais para as plantas, reduzindo a necessidade do uso intensivo de defensivos químicos. Além disso, sua aplicação pode minimizar o impacto ambiental associado à contaminação do solo e dos ecossistemas aquáticos.

Portanto, este estudo busca avaliar a viabilidade do uso desses vidros na agricultura, explorando seu potencial como agentes antimicrobianos e fontes de nutrientes, contribuindo para práticas agrícolas mais sustentáveis.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Os tópicos abordados nesta seção visam explicar teoricamente e de forma detalhada assuntos relevantes para um melhor entendimento do que foi realizado neste trabalho.

4.1 Vidros

O vidro é um material muito presente no cotidiano da sociedade, tendo sua aplicação nas mais diversas áreas imagináveis, partindo desde a construção civil à indústria automobilística e até mesmo medicinal. No entanto, algo que não é tão trivial é sua definição, apesar de sua ampla utilidade.

Um vidro pode ser descrito, de maneira geral, como um material cuja viscosidade é extremamente alta, tendendo ao infinito, com forma definida, estrutura amorfa, ausência de ordem de longo alcance, propriedades isotrópicas e com propriedades mecânicas de um sólido. A partir dessa descrição, é possível observar que o vidro é um material com propriedades de sólidos e de líquidos ao mesmo tempo, o que o leva a ser considerado, por alguns autores, o quarto estado da matéria condensada ^[23].

Uma das propostas para a definição do vidro foi proposta pela *American Society for Testing Materials* (ASTM), que considera vidro “um produto obtido através de um material inorgânico fundido levado à condição de rigidez sem cristalização”. Entretanto, essa definição não engloba os vidros formados a partir de compostos orgânicos e polímeros, bem como não considera os vidros obtidos através das rotas químicas e técnicas sol-gel, que possibilitam a síntese de vidros a temperaturas relativamente baixas quando comparadas com as demais formas de obtenção ^[2-3].

Assim, é necessário buscar por uma característica comum e imutável a todos os tipos de materiais vítreos, que é a temperatura de transição vítrea (T_g). A transição vítrea - diferentemente da entalpia e entropia, que se referem a transições de fase em um ponto específico (primeira ordem), normalmente relacionado à temperatura - ocorre em uma faixa de temperatura entre 3 a 4 K ^[4-5].

Além disso, é possível verificar alterações nas características dos vidros em função da mudança da T_g . Em temperaturas abaixo da T_g , as propriedades físicas do vidro se comportam de maneira análoga a de um sólido e, acima da T_g , há uma diminuição de sua viscosidade, que acarreta um aumento da mobilidade atômica, gerando um gradual rompimento das cadeias atômicas ^[5]. Nessa condição, as propriedades do vidro assemelham-se com as de

materiais líquidos e sua viscosidade atinge 10^{13} poise, independentemente do material de formação [6].

Compreender o conceito de transição vítrea permite uma definição mais clara de vidros como substâncias não cristalinas que carecem de simetria, exibem uma transição vítrea e têm uma estrutura influenciada por seu estado líquido super-resfriado. Essa estrutura normalmente relaxa em temperaturas superiores a T_g e se solidifica em temperaturas mais baixas [7].

4.1.1 Síntese de vidros

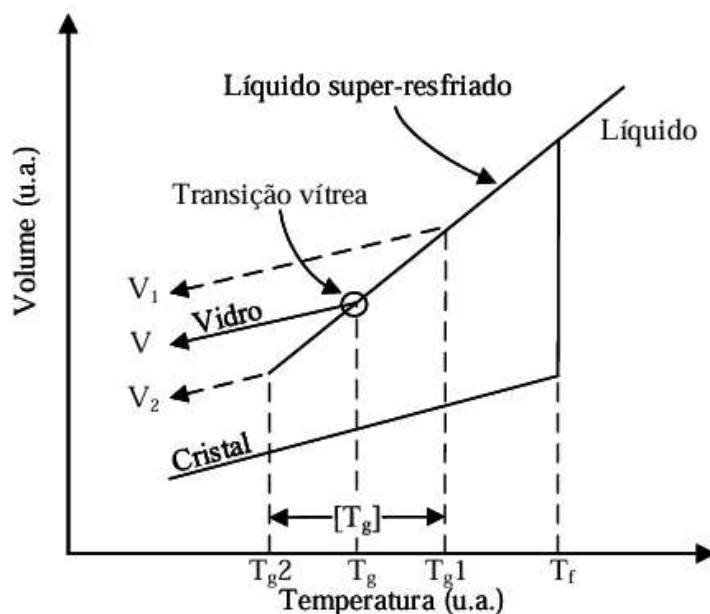
Quando um material ou substância é aquecido a uma temperatura superior ao seu ponto de fusão e posteriormente resfriado até a temperatura desse ponto, um equilíbrio é estabelecido entre o estado líquido e sua forma cristalina correspondente [8]. Assim sendo, a estrutura do material em seu estado líquido é determinada pela taxa na qual ele esfria. Uma análise da Figura 1 permite uma melhor compreensão desse processo, onde é possível observar que, em uma baixa taxa de resfriamento, há o favorecimento da formação de cristais, que só ocorre caso o material em questão apresente um número suficientemente grande de núcleos de cristalização, bem como uma alta taxa de crescimento, que também pode ser descrita como a velocidade de transporte de átomos do líquido para a interface líquido/cristal. Em casos onde ocorre a cristalização, é possível também observar que normalmente o volume é reduzido repentinamente [9-12].

Já em casos onde a taxa de resfriamento é elevada, o volume reduz lentamente, junto da redução da entalpia e aumento da viscosidade do líquido, culminando na perda de mobilidade atômica e, por consequência, impedindo a cristalização - já que com a baixa mobilidade, as moléculas não conseguem estabelecer uma configuração ordenada e equilibrada. Nessas condições, o material é considerado um líquido super-resfriado [10].

Por fim, a vitrificação é observada quando há a interrupção do processo de cristalização do líquido por meio de um rápido resfriamento do material. Nessa condição, as fases líquida e cristalina do material competem entre si. Com base nessas informações, é possível afirmar que qualquer material fundido pode formar um vidro se submetido a uma taxa de resfriamento suficiente para inibir sua cristalização [8-11].

Figura 1. Comportamento do volume em função da temperatura para um líquido. T_{g2} representa a temperatura de transição vítrea para um líquido sob taxa de resfriamento maior e

T_{g1} é a temperatura de transição vítrea sob menor taxa de resfriamento. T_f é a temperatura de fusão.



Fonte: Adaptado de (BELUSSO, 2019).

4.1.2 Vidros baseados em fosfatos

Os vidros de polifosfato e borofosfato são tipos de vidros relativamente parecidos, diferindo em sua composição estrutural e propriedades físico-químicas. Os vidros de polifosfato consistem em uma rede de tetraedros de fósforo (P) ligados por meio ponte de oxigênio (O_2), com possíveis adições de íons Al^{3+} e B^{3+} visando aumentar a durabilidade química, visto a alta solubilidade em água desses vidros ^[13]. Por outro lado, os borofosfatos possuem maior durabilidade e menor absorção de umidade e têm sua rede estrutural aumentada de acordo com a concentração de unidades boro-oxigênio (BO) na cadeia de fosfato, que resulta em maiores valores de T_g e menores coeficientes de expansão térmica ^[14]. Além disso, as taxas de dissolução dos vidros de borofosfato aumentam de acordo com a quantidade de óxido bórico (B_2O_3) em sua cadeia, o que impacta sua resistência química a depender do meio em que se encontra ^[15].

Ambos os vidros podem ser sintetizados por vias convencionais de fusão e resfriamento, de acordo com a T_g , o que torna esses compostos vítreos materiais valiosos para as mais variadas aplicações tecnológicas, dado a sua síntese relativamente simples e em temperaturas baixas quando comparado aos vidros silicatos convencionais, bem como suas propriedades químicas e físicas exclusivas, como a alta solubilidade.

A dissolução do vidro de fosfato em solução aquosa é influenciada pela hidrólise de cadeias de fosfato inteiras, indicando dissolução da cadeia intacta em vez de clivagem da ligação P-O ^[20]. As reações de hidrólise em borofosfatos levam à formação de grupos hidroxila e cadeias de polifosfatos com boro (B-O-P) em solução, que mantém a atividade antimicrobiana por mais tempo quando comparado aos polifosfatos tradicionais, dado que as cadeias fosfato (P-O-P) são tóxicas para microrganismos e a adição do boro nessas ligações reduz a solubilidade do vidro, fazendo com que a reação de hidrólise ocorra mais lentamente ^[21]. Essa característica indica uma potencial aplicação do vidro como fungicida e bactericida quando dissolvido em água. Além disso, foi constatado que o grau de polimerização em fosfatos condensados afeta sua degradação solvolítica, com curvas de titulação mostrando mudanças de pH com base no comprimento da cadeia, um fator a ser considerado, tendo em vista que um pH muito baixo inviabiliza o uso do vidro em certas aplicações ^[22].

4.2 Vidros enriquecidos com micronutrientes

Como já mencionado, os vidros fosfatos têm uma ampla aplicabilidade dados as suas propriedades resultantes da estrutura química e composição. Dentre elas, vale destacar seu uso como fertilizantes de liberação controlada com o objetivo de melhorar e acelerar o crescimento de culturas. Alguns estudos analisaram a influência de diferentes composições nas propriedades desses vidros, destacando a importância da relação $[K_2O/(CaO + MgO)]$ no controle da liberação de nutrientes ^[16-17].

Além disso, a incorporação de micronutrientes como zinco, boro, cobre, molibdênio, entre outros, na matriz vítrea demonstrou melhor conteúdo mineral do solo e desempenho nas culturas, superando, inclusive, os fertilizantes convencionais nas safras de trigo e tomate ^[18-19]. Essa incorporação pode ser feita no próprio processo de síntese do vidro, com a adição e mistura de baixas quantidades dos óxidos ou fosfatos dos micronutrientes de interesse junto dos materiais formadores da matriz vítrea, antes de serem levados ao forno.

4.3 Agentes fitopatogênicos e suas implicações na agricultura

Os microrganismos a serem utilizados como base para esse trabalho envolvem o fungo *Rhizoctonia solani* e a bactéria *Clavibacter michiganensis*.

4.3.1 *Rhizoctonia solani*: características e impacto agrícola

O *R. solani* é um fungo fitopatogênico transmitido pelo solo que causa várias doenças nas lavouras, principalmente a podridão da raiz da soja e a ferrugem da bainha do milho. Na soja, a doença leva à deterioração das raízes, ao crescimento atrofiado e à redução da produtividade, tornando a detecção e o manejo precoces essenciais para minimizar as perdas na lavoura [24]. No milho, esse fungo é responsável por causar a ferrugem da bainha do milho, caracterizada por lesões na bainha e no caule já no início do desenvolvimento da plântula, que acabam afetando o rendimento e a qualidade da planta e do grão, respectivamente [25]. Para combater ambas as doenças de modo eficaz, geralmente é necessário uma combinação de práticas culturais, fungicidas e desenvolvimento de cultivares resistentes por meio de tecnologias de melhoramento genético [26].

4.3.2 *Clavibacter michiganensis*: características e impacto agrícola

A *C. michiganensis*, por sua vez, é uma bactéria gram-positiva fitopatogênica que afeta principalmente as plantações de tomate, causando o cancro bacteriano. Sua transmissão é feita por sementes ou mudas contaminadas e pode infectar as plantas sem gerar sintomas imediatos, o que dificulta seu manejo. A doença gerada se manifesta como murchamento, cancro e descoloração dos tecidos vasculares, afetando de forma severa a produtividade da planta. Além disso, o cancro bacteriano do tomateiro apresenta elevada resistência climática, o que permite a manutenção da atividade dessa doença entre as estações de cultivo, tornando-se uma ameaça contínua ao cultivo de tomate, sendo inclusive categorizada como uma doença aguda [27-28].

Como medida de controle da doença, assim como no caso do *R. solani*, normalmente é necessário empregar um conjunto de práticas para eliminá-la da lavoura, como o uso de bactericidas, sementes de tomate geneticamente modificadas, escolha de áreas livres do patógeno e cuja vizinhança também esteja protegida. Complementarmente, é desejável que as mudas e sementes sejam adquiridas de fornecedores confiáveis, onde a produção seja realizada sob absoluto controle sanitário [28].

5 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado nos laboratórios de Microbiologia e do Grupo de Polímeros e Nanoestruturas (GPaN) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Toledo, bem como nos laboratórios de pesquisa da Universidade Federal do Paraná (UFPR), campus Toledo.

5.1 Síntese dos vidros polifosfatos

Os vidros utilizados foram sintetizados a partir da técnica de fusão/resfriamento - também conhecida por *melting/quenching*. As matrizes foram sintetizadas com o uso de KH_2PO_4 (Êxodo Científica), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Êxodo Científica) e H_3BO_3 (Neon) em duas diferentes misturas. Todos os reagentes utilizados para a síntese apresentavam grau de pureza mínima de 98%. O primeiro vidro - denominado vidro A - foi sintetizado utilizando apenas KH_2PO_4 e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ na proporção de 1:1,18 (m/m), sendo esse um vidro polifosfato. O segundo vidro testado - denominado vidro B - foi sintetizado utilizando KH_2PO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e H_3BO_3 em uma proporção aproximada de 10:8:1 (m/m), sendo a proporção de H_3BO_3 equivalente a 10% da composição do vidro após a síntese. Os compostos foram pesados, homogeneizados em almofariz de vidro, transferidos para cadinho de quartzo devidamente tampado e inseridos em forno tipo Mufla pré aquecido para fusão a 400 °C durante 1 hora. Passado o tempo de fusão, o cadinho foi retirado do forno e o líquido foi vertido em um recipiente de aço inox e deixado resfriar a temperatura ambiente. Após a solidificação do líquido, agora um vidro, as amostras foram fragmentadas em pequenos pedaços e armazenadas em frascos tipo *Schott*, que por sua vez foram deixados em dessecador até o uso.

Tabela 1. Amostras vítreas e sua composição, temperatura e tempo de fusão.

Amostra	Conteúdo	Temperatura de fusão (°C)	Tempo de fusão (minutos)
Vidro A	$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	400	60
Vidro B	$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{H}_3\text{BO}_3$	400	60

Fonte: Autoria própria, 2024.

5.2 Diluição e solubilização dos vidros

Para a solubilização dos vidros em água, pesou-se cerca de 1 g de cada uma das amostras em tubos tipo Falcon e acrescentou-se 9 mL de água destilada. As amostras foram submetidas a agitação em vórtex durante 5 minutos. Em seguida, foram deixadas em repouso por, no mínimo, 1 hora.

5.3 Testes microbiológicos

A cepa fúngica *Rhizoctonia solani* (ATCC 10182) foi fornecida por professores da UTFPR campus Dois Vizinhos e a cepa bacteriana *Clavibacter michiganensis* (ATCC 10202) foi fornecida por pesquisadores da UFPR campus Palotina.

5.3.1 Preparo dos inóculos

Ambos os microrganismos foram cultivados em placas de petri, com ágar, sendo utilizado meio Batata Dextrose Ágar (BDA) (Kasvi K25-1022) para o fungo e o meio Peptona de Carne (MP) (Himedia RM635-500G) e *Mueller Hinton* (MH) (Kasvi K25-1058) para a bactéria. Amostras microbianas foram coletadas com o uso de alças descartáveis estéreis, espalhando a cultura em toda a superfície da placa. As placas foram incubadas em uma estufa BOD a 26 ± 1 °C para o fungo e para a bactéria tendo em vista a maior facilidade da *C. michiganensis* para crescer em menores temperaturas do que a usual para esse tipo de microrganismo.

5.3.2 Ajuste de densidade dos inóculos

As densidades das suspensões do fungo foram lidas e ajustadas para uma densidade óptica (DO) variando de 0,09 a 0,11 (transmitância de 80 a 82%). Essas suspensões foram diluídas na proporção de 1:50 no meio padrão. As diluições de inóculo 1:50 eram equivalentes a $2 \times$ a densidade necessária de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL, aproximadamente ^[29]. Para a bactéria a densidade do inóculo foi ajustada de acordo com a solução padrão a 0,5 da escala *McFarland*. Para verificar o ajuste, foi utilizado um espectrofotômetro ajustado para o

comprimento de onda de 625 nm, com a absorbância entre 0,08 e 0,10 - valor correspondente a uma suspensão com $1,5 \times 10^8$ UFC/mL ^[30-31].

5.3.3 Microdiluição em placas para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O método de microdiluição em placas aplicado foi o descrito em ^[32], com algumas modificações específicas. Foi escolhido o uso desse método devido sua robustez e sensibilidade quando comparado aos demais métodos existentes, bem como é possível realizá-lo com pequenas quantidades de amostras. Foi utilizada uma placa de 96 poços onde foram realizadas microdiluições seriadas com o objetivo de determinar a concentração mínima inibitória das amostras.

Como corante revelador, foi utilizado a resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-10-óxido), que é um componente ativo de coloração azul comumente utilizado como revelador de oxirredução. Na sua forma reduzida, é conhecido por resorufina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-1) e apresenta coloração rosa fluorescente. Por isso, a resazurina é bastante utilizada para identificação de células ativas nos testes de CIM, pois quando há a presença de células metabolicamente ativas, ocorre a redução da resazurina em resorufina e posterior excreção no meio, ou seja, quando não há crescimento a amostra permanece azul, pois não há microrganismos interagindo com o corante ^[33].

Tanto a análise do fungo como da bactéria foram feitas da mesma maneira, seguindo o mesmo procedimento, variando apenas o meio de cultivo dos microrganismos. A temperatura de incubação foi mantida a mesma para ambos os microrganismos (26 ± 1 °C) tendo em vista a facilidade da bactéria em crescer em temperaturas menores do que a usual. Para o fungo, foi preparado o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) seguindo o passo a passo descrito no rótulo da embalagem. O meio foi esterilizado por filtração, uma vez que o mesmo é sensível à temperatura (calor úmido) e radiação (luz UV). Já para a bactéria, o meio utilizado para seu crescimento foi o caldo Mueller Hinton (MH), também em condições estéreis.

Foram preparados dois tubos tipo Falcon de 50 mL, contendo 45 mL do meio específico para cada um dos microrganismos. Em seguida, foi feito o inóculo em um dos tubos e este foi incubado em *Shaker* em agitação orbital a 100 rpm por 12 horas. Após a incubação, foi feito o ajuste dos inóculos como descrito anteriormente.

Posteriormente, foi feita a identificação da placa estéril de 96 poços de modo que as três primeiras linhas correspondem a uma amostra vítrea, pois o experimento foi realizado em triplicata, as três linhas seguintes correspondem a uma segunda amostra e as duas últimas

referem-se aos controles. Como controle positivo, foi utilizado o fungicida *Infinito* (Bayer™) - ajustado para concentração inicial de 10% (v/v) em água - para o fungo e o antibiótico sulfato de neomicina (Legrand™) para a bactéria.

Em cada um dos poços foi pipetado 100 µL de meio estéril (RPMI para o fungo e MH para a bactéria). Nos poços correspondentes à primeira coluna, das seis primeiras linhas, pipetou-se 100 µL de uma solução vítrea em uma concentração de 10% de vidro (m/v). Em seguida, após homogeneização do conteúdo dos primeiros poços com a pipeta, transferiu-se 100 µL de amostra da primeira coluna para a segunda coluna de modo a obter uma proporção de 2,5% de material vítreo e assim por diante até o décimo segundo poço da mesma linha.

Logo após, pipetou-se 20 µL da suspensão do inóculo em todos os poços (exceto em um dos grupos controle para a bactéria). Ao final desse procedimento, as placas foram incubadas a 26 °C durante 24 h para ambos os microrganismos. Passado esse período, pipetou-se 20 µL de resazurina a 0,01% em cada um dos poços e incubou-se novamente as placas a 26 °C durante 1 h. Em seguida, realizou-se uma leitura visual das placas, a qual indica que nos poços de coloração rosa houve crescimento microbiano e nos de coloração azul, não.

5.3.4 Testes de CFM e CBM

O teste consiste em coletar amostras dos poços utilizados para a determinação da CIM e transferi-las para placas estéreis para posterior análise visual da presença ou ausência de colônias presentes no volume de amostra do poço.

Para a realização dessa análise, foi realizado o teste de CIM, conforme descrito previamente, porém, antes da aplicação da resazurina, foi coletada uma alíquota de 10 µL de cada poço e transferido para uma placa de Petri estéril contendo o meio (MH para bactéria e BDA para o fungo) com ágar. Em seguida, a placa foi incubada em estufa a 26 °C por 48 h. A detecção do crescimento do microrganismo foi avaliada a partir da presença ou ausência de colônias na superfície do meio presente na placa. Esse teste serve como uma segunda análise para validar o resultado obtido no teste de CIM.

5.3.5 Teste de difusão por poços

O teste de difusão por poços é semelhante ao teste de difusão por discos (disco-difusão) e foi realizado com base no que é descrito no protocolo *The Clinical &*

Laboratory Standards Institute (CLSI) ^[34], com modificações específicas de acordo com as necessidades do experimento. A diferença é que em vez de utilizar discos, são feitos poços no próprio ágar, que são preenchidos com a solução a ser testada. O ajuste da densidade do inóculo bacteriano foi realizado a partir da diluição do mesmo em caldo MH, conforme item 5.3.2. Uma vez ajustada a absorbância, foi espalhado 100 µL do inóculo em placas de Petri contendo meio ágar MH com o auxílio de um *swab*. Em seguida, pipetou-se 100 µL da solução vítrea em cada um dos poços, sendo as concentrações das soluções vítreas testadas: 10%, 5% e 2% (m/v). Como controle positivo, foi utilizado o antibiótico sulfato de neomicina (Legrand).

Em seguida, as placas foram incubadas a 26 °C por 24 horas e a dimensão dos halos formados foi aferida com auxílio do *software Image J*. Os testes foram realizados em triplicata.

5.4 Teste com o tomate *Solanum lycopersicum* 'Roma'

O teste foi realizado no mesmo dia em que os tomates foram colhidos. Inicialmente, foram removidos os talos e folhas das frutas e, em seguida, os tomates foram lavados com água corrente e deixados em repouso em uma solução aquosa com 2% de hipoclorito de sódio (v/v) por 15 minutos. Posteriormente, foram lavados novamente com água corrente e colocados para secar em uma bandeja à temperatura ambiente por 1 hora.

Passado esse período, os tomates foram separados em grupos de 5 unidades para cada tratamento (Tabela 2), sendo utilizado um becker para cada grupo. Em seguida, foram preparadas as soluções vítreas na concentração de 10% (m/v), água destilada e o grupo controle (suspensão bacteriana em caldo MH com DO ajustada) para borrifar nos tomates.

Em um ambiente asséptico, foram borrifadas as soluções preparadas para cada um dos respectivos grupos de modo que todos os frutos fossem atingidos pela solução. Logo após, os frascos contendo os tomates foram deixados em repouso por 72 horas.

Após esse período, cada grupo de tomates foi lavado com 10 mL de água destilada autoclavada. Em seguida, foi coletada uma alíquota de 100 µL da solução de lavagem de cada um dos grupos e transferida para tubos tipo Eppendorf para posterior diluição. Essas alíquotas foram diluídas 4 vezes. Após a diluição, foi espalhado uma alíquota de 10 µL da solução diluída em placas de Petri contendo meio ágar MH com o auxílio de um *swab*. As placas foram levadas para estufa BOD a 26 °C por 24 horas. Em seguida, foi realizada a contagem

das colônias presentes em cada uma das placas. A ausência de colônias indica a inibição total da bactéria pela solução vítrea.

Tabela 2 - Grupos de tratamento para o teste com os tomates.

Grupo	Tratamento
A	Solução vítrea do vidro A borrifada na fruta
B	Solução vítrea do vidro B borrifada na fruta
C	Água destilada borrifada na fruta
D	Solução bacteriana borrifada na fruta

Fonte: Autor, 2024.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ordem dos resultados apresentados nesta seção seguem a ordem cronológica dos experimentos realizados.

6.1 Testes de atividade antimicrobiana *in vitro*

Para o teste realizado com o fungo *Rhizoctonia solani*, a CIM foi determinada na sétima diluição (concentração de 0,039% de vidro) para ambos os vidros, conforme a Figura 2. A revelação da CIM foi feita com o uso do corante conhecido por resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-10-óxido), composto ativo de cor azul não fluorescente comumente empregado como indicador de oxirredução. Na forma reduzida, é denominado resorufina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-1) e sua coloração é rosa fluorescente. Dentre suas variadas aplicações, a resorufina é utilizada para identificar células ativas em testes de determinação de CIM, uma vez que acredita-se que em células metabolicamente ativas, ocorre a redução da resazurina em resorufina ^[35], que é posteriormente excretada no meio. Essa reação indica que, quando a coloração do poço migra do azul inicialmente para o rosa fluorescente, há crescimento do microrganismo. Já quando não há crescimento, a amostra permanece com a coloração azul, visto que não existem microrganismos presentes para reagir com a resazurina. O teste foi realizado em triplicata tanto para o vidro A (polifosfato sem boro) quanto para o vidro B (borofostato com 10% de boro). Além disso, as últimas linhas indicam os resultados dos controles. Para o controle positivo foi utilizado o fungicida *Infinito* (Bayer™) na mesma concentração dos vidros e, como controle negativo, o meio RPMI contaminado com o fungo, apenas.

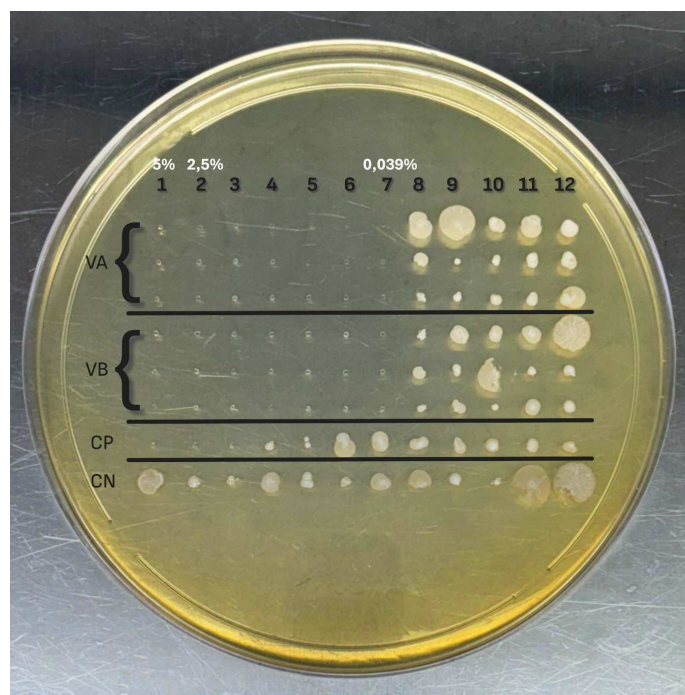
Juntamente da determinação da CIM, foi realizado o teste da Concentração Fungicida Mínima (CFM). O CFM foi feito antes da aplicação do corante para revelação da CIM, uma vez que ele interfere diretamente no resultado do teste. O resultado do CFM foi determinado também na sétima diluição (concentração de 0,039% de vidro), isto é, os vidros apresentaram ação fungicida até a 7ª diluição e, da 8ª diluição em diante, sua ação passou a ser fungistática, inibindo o desenvolvimento do microrganismo, porém sem causar sua morte. A Figura 3 apresenta os resultados obtidos. A ordem das linhas segue a mesma legenda da CIM (Figura 2), onde também pode ser observado a ausência de contaminações externas, visto que houve o crescimento apenas do fungo em estudo (*R. solani*).

Figura 2 - Resultados do teste de CIM para o fungo *Rhizoctonia solani*



Legenda: VA – triplicata vidro A (polifosfato sem boro); VB – triplicata vidro B (polifosfato com 10% de boro); CP – controle positivo (*Infinito*); CN - controle negativo (meio RPMI + fungo). Fonte: Autor, 2024.

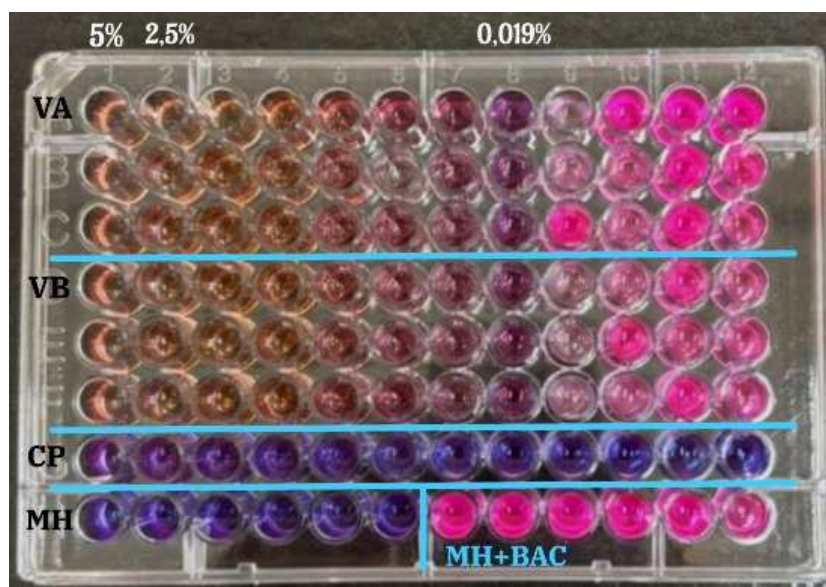
Figura 3 - Resultados do teste de CFM para o fungo *Rhizoctonia solani*.



Fonte: Autor 2024.

Após a realização dos testes com o fungo, os mesmos experimentos foram repetidos, agora para avaliar a ação dos vidros contra a bactéria *Clavibacter michiganensis*. A CIM para a bactéria foi levemente superior em comparação ao fungo, sendo determinado na oitava diluição (concentração de 0,019% de vidro) para ambos os vidros. A revelação do teste também foi feita utilizando o corante resazurina, dado seu mecanismo de reação. O teste foi realizado em triplicata tanto para o vidro A quanto para o vidro B. Como controle positivo, foi empregado o antibiótico de amplo espectro sulfato de neomicina (Legrand™) e, com o objetivo de avaliar a presença de contaminantes no meio ou na colônia da bactéria, foi adicionado em alguns poços apenas o caldo Mueller Hinton (MH) e em um outro conjunto de poços foi adicionado o caldo mais a bactéria (Figura 4).

Figura 4 - Resultados do teste de CIM para a bactéria *Clavibacter michiganensis*.

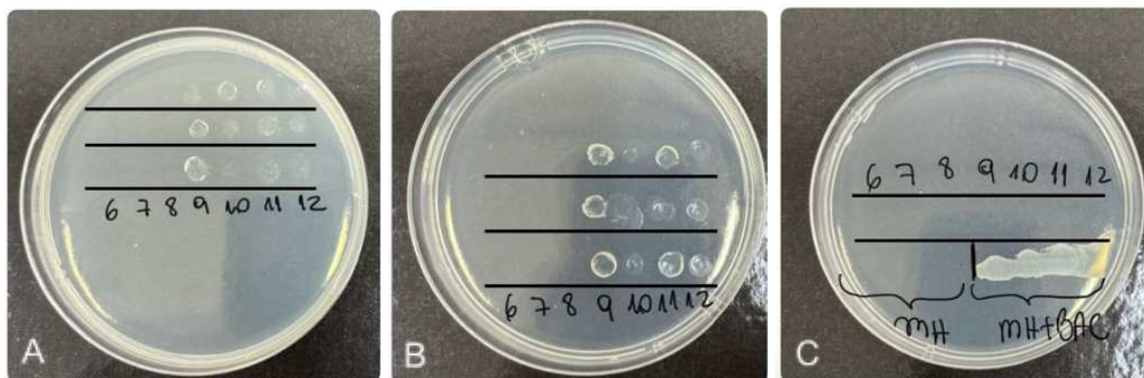


Legenda: VA – triplicata vidro A (polifosfato sem boro); VB – triplicata vidro B (polifosfato com 10% de boro); CP – controle positivo (sulfato de neomicina); MH - 1 a 6 somente caldo Mueller Hinton; MH+BAC - 7 a 12 caldo MH mais bactéria. Fonte: Autor, 2024.

Para a *C. michiganensis* também foi realizado o teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM) a partir das diluições da CIM antes da aplicação do corante. Como não haviam placas de Petri grandes disponíveis, o CBM foi feito em placas de Petri descartáveis de tamanho padrão. Assim como na CIM, o CBM foi determinado na oitava diluição para ambos os vidros, o que indica que os vidros apresentam propriedade bactericida até a concentração de 0,019% e, abaixo disso, passam a ter ação bacteriostática, inibindo o

crescimento bacteriano, mas sem causar sua morte. O controle positivo teve ação em todas as 12 diluições realizadas, o que já era esperado por se tratar de um antibiótico de uso humano e animal. Os demais grupos controle também apresentaram resultados esperados: o caldo não apresentou indícios de contaminação, assim como a colônia de bactérias utilizada para a realização do experimento. Os resultados do teste são apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Resultados do teste de CBM para a bactéria *Clavibacter michiganensis*.



Legenda: A – vidro A (polifosfato sem boro); B – vidro B (polifosfato com 10% de boro); C – controle positivo (sulfato de neomicina), caldo Mueller Hinton e caldo MH mais bactéria. Fonte: Autor, 2024.

6.2 Teste de difusão por poços para a *C. michiganensis*

O experimento complementar à CIM e ao CFM realizado somente para a bactéria (teste de discos-difusão) mostrou resultados condizentes. As concentrações de vidro em solução escolhidas para o teste foram: 10%, 5% e 2% para ambos os vidros. Essas concentrações são significativamente maiores do que a obtida pela revelação da CIM para *C. michiganensis*, mas ainda assim são percentuais relativamente baixos de composto ativo quando comparado aos produtos de ação semelhante existentes no mercado ^[39].

O resultado do teste mostrou que tanto o vidro A quanto o vidro B foram capazes de formar halos de inibição em todas as 3 concentrações avaliadas (Figura 7). No entanto, é possível observar que o vidro B (borofosfato com 10% de boro) teve ação superior, visto que o diâmetro dos halos formados foi superior em comparação ao vidro A e ao antibiótico utilizado como controle positivo (Tabela 3). Acredita-se que tal fato tenha ocorrido devido à presença do boro em sua composição - que reduz sua solubilidade - uma vez que, quando em solução, o vidro desencadeia o processo de hidrólise e ocorre a liberação de íons, grupos

hidroxila e cadeias de polifosfatos com boro (B-O-P). Os grupos fosfato são tóxicos para microrganismos e possivelmente a adição de boro retarda a reação de hidrólise, fazendo com que a ação antimicrobiana perdure por mais tempo quando comparada aos vidros polifosfatos convencionais ^[21].

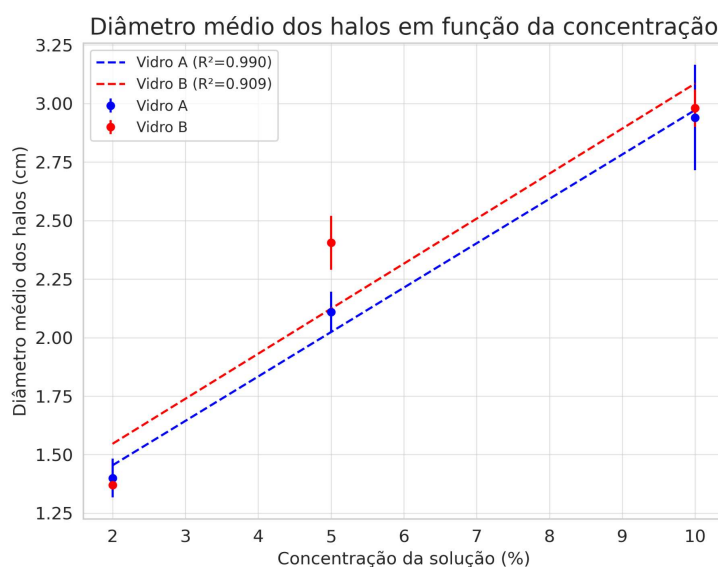
Tabela 3 - Diâmetro dos halos formados no teste de difusão por poços.

Tratamento	Concentração da solução	Diâmetro médio dos halos (cm)
Vidro A	10%	$2,94 \pm 0,28$
	5%	$2,11 \pm 0,1$
	2%	$1,40 \pm 0,1$
Vidro B	10%	$3,02 \pm 0,11$
	5%	$2,38 \pm 0,12$
	2%	$1,41 \pm 0,07$
Sulfato de neomicina	-	2,58

Fonte: Autor, 2024.

A Figura 6 apresenta o gráfico do ajuste linear dos resultados de cada um dos tratamentos (vidro A e vidro B) a partir da concentração da solução vítrea em função do diâmetro dos halos, juntamente do desvio padrão para cada tratamento.

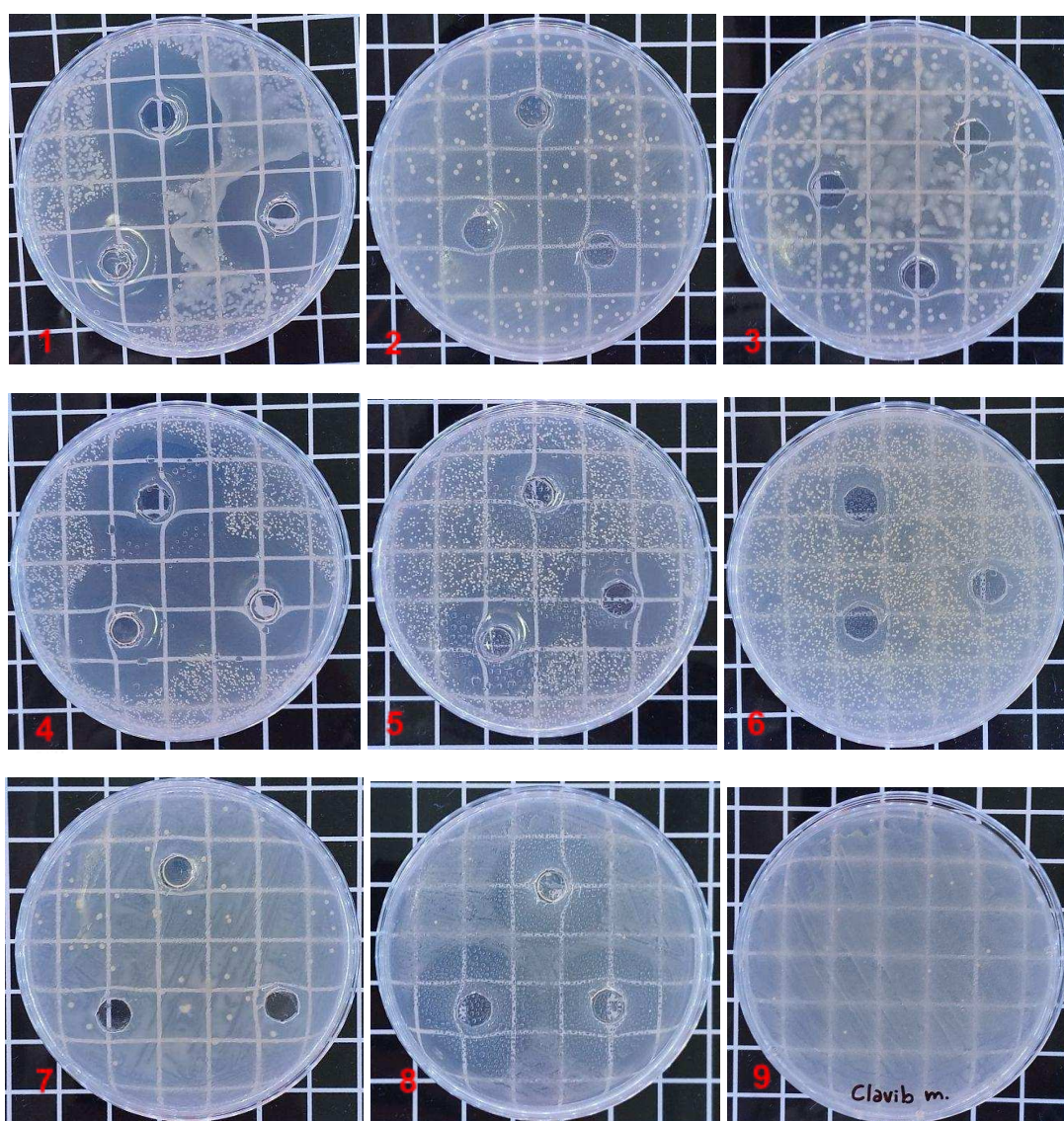
Figura 6 - Diâmetro médio dos halos em função da concentração da solução.



Legenda: Em azul - experimentos com o vidro A; em vermelho - experimentos com o vidro B. Fonte: Autor, 2024.

É importante citar que, com o vidro A, o mesmo processo de hidrólise também acontece, mas por não conter boro em sua composição, a reação ocorre de forma mais acelerada e a citotoxicidade é reduzida. Além disso, a redução do pH não é uma propriedade observada exclusivamente nos vidros borofosfato, uma vez que os vidros polifosfatos, por apresentarem fósforo em sua composição, também possuem essa característica quando solubilizados em água, sendo ela a principal propriedade contra a atividade microbiana.

Figura 7 - Resultados do teste de difusão por poços.



Legenda: 1 – vidro A a uma concentração de 10% (m/v); 2 – vidro A a uma concentração de 5% (m/v); 3 - vidro A a uma concentração de 2% (m/v); 4 - vidro B a uma concentração de 10% (m/v); 5 – vidro B a uma concentração de 5% (m/v); 6 - vidro B a uma concentração de 2% (m/v); 7 - Controle negativo (água destilada); 8 - Controle positivo (sulfato de neomicina); 9 - Controle (apenas bactéria). Fonte: Autor, 2024.

6.3 Aplicação dos vidros em tomates contaminados

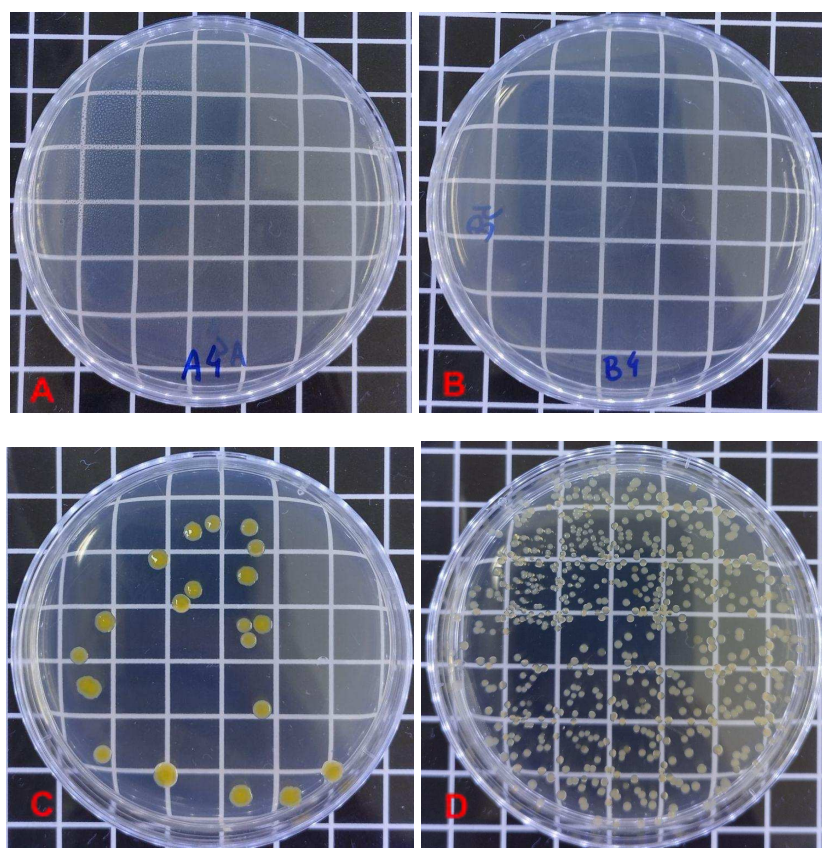
Tendo em vista os resultados obtidos tanto para o fungo quanto para a bactéria, foi realizado um último teste com tomates tipo Roma (*Solanum lycopersicum* 'Roma') propositalmente infectados com a *C. michiganensis* e posteriormente foi borrifado uma solução aquosa a uma concentração de 10% de vidro (tanto para o vidro A quanto para o vidro B) nos tomates. O motivo da escolha dessa variedade de tomate foi principalmente pelo fato da disponibilidade e custo de aquisição, dado que os tomates foram cedidos para a realização deste estudo. Além disso, o cancro bacteriano do tomateiro, doença causada pela bactéria *C. michiganensis*, afeta todas as variedades de tomate conhecidas, portanto, a escolha dessa variedade não causa impactos significativos na pesquisa ^[36].

Tanto o vidro A quanto o vidro B apresentaram igual potencial de ação antibacteriano na concentração testada, pois não houve crescimento microbiano nas placas referentes às lavagens dos tomates passadas 72 horas (3 dias) da contaminação (Figura 8). Esses resultados evidenciam a eficácia de ambos os tratamentos em inibir o crescimento bacteriano. No grupo de tomates em que foi borrifada apenas água destilada, observou-se uma carga bacteriana estimada em 2×10^6 UFC/mL. Já o grupo não tratado (sem borrifamento de solução, apenas lavagem após contaminação) apresentou um valor de $5,96 \times 10^7$ UFC/mL, evidenciando o crescimento desse microrganismo. Esses achados reforçam a importância dos tratamentos testados, uma vez que, na ausência de intervenção, a carga microbiana mantém-se em níveis elevados.

Visualmente, os tomates não apresentaram drásticas alterações passadas as 72 horas da contaminação (Figura 9), com exceção do grupo controle (grupo D), que não passou por nenhum tipo de tratamento após a contaminação. A falta de alteração visual aparente nos tomates que passaram pelos tratamentos com os vidros pode ser associada à inibição total do microrganismo, como foi apresentado na Figura 8.

No entanto, alterações visuais no fruto isolado da planta (tomateiro) normalmente demoram a aparecer, sendo os principais sintomas as lesões no fruto, também conhecidas por “olho de passarinho” ^[36]. Apesar dos indícios visuais demorarem a aparecer, testes laboratoriais - como o plaqueamento realizado neste experimento - conseguem identificar a doença logo no início da contaminação.

Figura 8 - Resultados do plaqueamento da solução de lavagem dos tomates.



Legenda: A – vidro A (polifosfato sem boro); B – vidro B (polifosfato com 10% de boro); C – controle (borrifado apenas água destilada); D - controle sem borrifar nada. Fonte: Autor, 2024.

Figura 9 - Tomates após 72 horas da contaminação por *C. michiganensis*.



Legenda: A – tomates borrifados com vidro A (polifosfato sem boro); B – tomates borrifados com vidro B (polifosfato com 10% de boro); C – controle, tomates borrifados com água destilada; D - controle sem borrifar. Fonte: Autor, 2024.

Portanto, dados os resultados previamente apresentados, a ausência de colônias nas placas referentes às lavagens dos tomates tratados com os vidros A e B em comparação aos demais grupos é um forte indicativo de que os vidros apresentam ação bactericida contra a *C. michiganensis*.

Em um estudo realizado por Raja ^[37], foram sintetizados vidros fosfatos dopados com diferentes metais para avaliar seu potencial citotóxico. Todas as formulações vítreas utilizadas no experimento apresentaram atividade antimicrobiana determinada pelos testes de CIM, CFM, CBM, dentre outros. Os vidros testados apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, variando a intensidade da ação de acordo com o metal adicionado na matriz vítrea.

Além disso, em uma análise realizada nesse mesmo estudo para avaliar o efeito dos vidros sob células humanas, foi observado que o vidro à base de fosfato sem dopagem não apresentou efeito citotóxico significativo.

Nesse contexto, apesar dos microrganismos utilizados no estudo não serem os mesmos testados neste trabalho, é possível observar que as mesmas propriedades para esses vidros foi encontrada a partir da realização de testes semelhantes, além do indício de que os vidros fosfatos sem dopagem metálica não apresentam risco algum à saúde humana.

O fato da solução vítrea ter sido borrifada diretamente no tomate não impede o consumo da fruta nem afeta sua estrutura física, apesar de ter apresentado atividade antimicrobiana contra a *C. michiganensis*.

De modo geral, os testes realizados foram bem sucedidos e apresentaram resultados promissores, confirmando o potencial fungicida e bactericida dos vidros polifosfatos sintetizados a baixas temperaturas. Além disso, a solução vítrea borrifada nos tomates não gerou danos físicos na estrutura das frutas, o que também é um resultado positivo, pois aumenta as expectativas de sucesso de desenvolvimento futuro de produtos protetivos a base de vidros solúveis.

Em uma segunda análise, um estudo publicado por Said Khourchi ^[38] é comentado sobre o uso de polifosfatos como fertilizantes, pois são solúveis em água e, no processo de hidrólise, liberam fósforo (P) no solo, um importante nutriente para a grande maioria das culturas. Além disso, como o P é um elemento de baixa mobilidade no solo, o fato dos

polifosfatos estarem dispostos em uma solução no momento da aplicação facilita o transporte e distribuição uniforme do nutriente no solo. Essa propriedade também é observada nos vidros utilizados neste trabalho, dado que são sintetizados à base de polifosfato, ou seja, além da sua toxicidade para microrganismos fitopatogênicos, podem atuar como fertilizantes para o solo e fornecer microrganismos para variadas culturas.

Essas propriedades ainda podem ser bastante exploradas com uma gama maior de microrganismos, visando avaliar sua ação e viabilidade no desenvolvimento de defensivos agrícolas sustentáveis e que podem, ao mesmo tempo, servir como fonte de micronutrientes para diferentes culturas, uma vez que a matriz vítrea é composta por elementos químicos essenciais para o bom desenvolvimento das plantas bem como pode ser facilmente dopada com outros compostos como o zinco (Zn) e o molibdênio (Mo), que também apresentam propriedades nutritivas para o solo e determinadas culturas. Aliando essas características com a solubilidade em água e a liberação controlada de compostos via hidrólise, esses vidros possuem um grande potencial a ser explorado no ramo da agricultura.

7 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos, esse trabalho possibilitou verificar que os vidros polifosfatos testados apresentam atividade antimicrobiana mesmo em baixas concentrações. Essa propriedade pode ser atribuída ao processo de hidrólise desencadeado quando o vidro encontra-se solubilizado em água, liberando fósforo e, conseqüentemente, reduzindo o pH da solução. Além disso, como ocorre uma liberação controlada do fósforo ao longo do tempo devido a essa reação, esses vidros também apresentam potencial de uso na agricultura como fertilizantes menos agressivos à fauna e à flora. Para o desenvolvimento de um produto com ambas as propriedades (fungicida/bactericida e fertilizante), ainda são necessárias investigações adicionais, abrangendo uma maior gama de microrganismos e realizando testes com diferentes células animais para avaliar seu grau de toxicidade em cada uma desses grupos. De modo geral, a proposta inicial deste trabalho foi alcançada com sucesso, mas os resultados ainda são preliminares, apesar de coincidirem com resultados já observados em outros estudos com materiais semelhantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 World Population Prospects 2022. Revisão de 2022. Disponível em: <<https://population.un.org/wpp/>>.
- 2 SCHNEIDER, R. **Desenvolvimento de materiais para nanodispositivos híbridos baseados em filmes nanoestruturados obtidos por processo bottom-up**. 166 f. p. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Química Fundamental, Programa de Pós- Graduação em Química, Recife, 2012.
- 3 VARSHNEYA, A. K. **Introduction. In: Fundamentals of Inorganic Glasses**. Elsevier BV, 1994. p. 1–11. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-057150-8.50006-9>>.
- 4 EDIGER, M. D.; *et al.* **Supercooled liquids and glasses**. The Journal of Physical Chemistry, American Chemical Society (ACS), v. 100, n. 31, p. 13200–13212, jan 1996. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp953538d>>.
- 5 EDIGER, M. D.; HARROWELL, P. **Perspective: Supercooled liquids and glasses**. The Journal of Chemical Physics, AIP Publishing, v. 137, n. 8, p. 080901, aug 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.4747326>> .
- 6 ZACHARIASEN, W. H. **The atomic arrangement in glass**. Journal of the American Chemical Society, American Chemical Society (ACS), v. 54, n. 10, p. 3841–3851, oct 1932. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ja01349a006>> .
- 7 ZANOTTO, E. D.; MAURO, J. C. **The glassy state of matter: Its definition and ultimate fate**. Journal of Non-Crystalline Solids, Elsevier BV, v. 471, p. 490–495, sep. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2017.05.019>>.
- 8 LU, Z. P.; LIU, C. T. **Glass formation criterion for various glass-forming systems**. Physical Review Letters, American Physical Society (APS), v. 91, n. 11, sep 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.91.115505>>.

- 9 DEBENEDETTI, P. G.; STILLINGER, F. H. **Supercooled liquids and the glass transition**. Nature, Springer Nature America, Inc, v. 410, n. 6825, p. 259–267, mar 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/35065704>>.
- 10 VARSHNEYA, A.; MAURO, J. C. **Fundamentals of inorganic glasses**. Boston: Academic Press, ed. 3, 2019. ISBN 978-0-08-057150-8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/C2017-0-04281-7>>.
- 11 DU, X. H.; HUANG, J. C. **New criterion in predicting glass forming ability of various glass-forming systems**. Chinese Physics B, IOP Publishing, v. 17, n. 1, p. 249–254, jan 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1088%2F1674-1056%2F17%2F1%2F043>>.
- 12 BELUSSO, L. C. S. **Síntese e caracterização de materiais vítreos com capacidade biocida**. Tese (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Toledo, 2019.
- 13 KOUDELKA, L.; MOSNER, P. **Borophosphate glasses of the ZnO-B₂O₃-P₂O₅ system**. Materials Letters 42 (200) 194-199, jan 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(99\)00183-4](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(99)00183-4)>.
- 14 SHAH, K. V.; *et al.* **Surface degradation behaviour of sodium borophosphate glass in aqueous media: Some studies**. Indian Academy of Sciences, v. 32, n. 3, p. 329-336, jun 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12034-009-0047-3>>.
- 15 KREIDL, N. J.; WEYL, W. A. **Phosphates in ceramic ware: IV, phosphate classes**. Journal of The American Ceramic Society, 24 (11) p. 372-377, 1941.
- 16 LABBILTA, T.; *et al.* **Controlled-release fertilizers from phosphate glass-matrix: A new ecological approach to match nutrients release with plants demand**. Boletín De La Sociedad Espanola De Cerámica Y Vidrio, v. 62 n. 6, p. 571-587, dez 2023. Disponível em: <[doi: 10.1016/j.bsecv.2022.12.004](https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2022.12.004)>.
- 17 LABBILTA, T.; *et al.* **Innovative Formulations of Phosphate Glasses as Controlled-Release Fertilizers to Improve Tomato Crop Growth, Yield and Fruit**

Quality. v. 26 n. 12, jun 2021. Disponível em:
<<https://doi.org/10.3390/molecules26133928>>.

18 AZOOZ, M. A.; *et al.* **Preparation and application of some phosphoborosilicate glasses containing micronutrients as plant fertilisers**. Glass Technology - European Journal of Glass Science and Technology, v. 47, n. 6, p. 164-166, dez 2006. Disponível em:
<<https://www.ingentaconnect.com/content/sgt/gta/2006/00000047/00000006/art00002>>.

19 ROBERTS, G. J. **Micronutrient metal-containing phosphate glasses**. Google Patents. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US3930833A/en>>.

20 BUNKER, B. C.; ARNOLD, G. W.; WILDER, J. A. **Phosphate glass dissolution in aqueous solutions**. Journal of Non-Crystalline Solids, v. 64, n. 3, p 291-316, mai 1984. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0022-3093\(84\)90184-4](https://doi.org/10.1016/0022-3093(84)90184-4)>.

21 SARACINI, J. *et al.* **Borophosphate glasses as active agents for antimicrobial hydrogels**. International Journal of Pharmaceutics, v. 644, p. 123323–123323, 18 ago. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123323>>.

22 ODAGIRI, S.; NICKERSON, T. A. **Chain length determination of polyphosphates**. Journal of Dairy Science, v. 47, n. 8, p 920-921, jun 1965. Disponível em:
<[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(64\)88803-2/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(64)88803-2/pdf)>.

23 GUTZOW, I. S.; SCHMELZER, J. W. **The Vitreous State: Thermodynamics, structure, rheology, and crystallization**. Springer Science Business Media, 2013. Disponível em:
<<https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-34633-0>>.

24 AL-ANI, R. A. *et al.* **Rhizobium japonicum as a biocontrol agent of soybean root rot disease caused by Fusarium solani and Macrophomina phaseolina**. Plant Protection Science, v. 48, n. No. 4, p. 149–155, 6 nov. 2012. Disponível em:
<<https://pps.agriculturejournals.cz/pdfs/pps/2012/04/03.pdf>>.

25 MANASHI DEBBARMA; DUTTA, P. **Pathogenic Variability of Isolates of Rhizoctonia solani of Different Agricultural Crops**. International Journal of Current

Microbiology and Applied Sciences, v. 10, n. 01, p. 765–776, 10 jan. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1001.094>>.

26 RAY, A.; KUMAR P. **Evaluation of bio-agents against *Rhizoctonia solani* Kuhn the cause of aerial blight of soybean**. ResearchGate, v. 60, n. 4, p. 532–534, 2007. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/305223313_Evaluation_of_bio-agents_against_Rhizoctonia_solani_Kuhn_the_cause_of_aerial_blight_of_soybean>.

27 DIMITRIS MALLIARAKIS *et al.* **Phylogenetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates causing bacterial canker of tomato in Greece**. Journal of Plant Pathology, v. 105, n. 4, p. 1403–1419, 27 maio 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42161-023-01375-4>>.

28 CARLOS, F.; LOPES, A. **Cancro bacteriano do tomateiro**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1082589/1/DOC154FINAL.pdf>>.

29 APROVADA, N. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos**. v. 22, n. 3, [s.d.]. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo1.pdf>.

30 NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 1898 USA, 2003.

31 NCCLS. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard—Second Edition. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238 469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.

32 ANTONELO, F. A. *et al.* **Bioactive compounds derived from Brazilian Myrtaceae species: Chemical composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 48, p. 102629, mar. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102629>>.

33 O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity**. European journal of biochemistry, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>>.

34 CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard – Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. Disponível em: <https://clsi.org/media/1631/m02a12_sample.pdf>.

35 O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity**. European journal of biochemistry, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

36 CARLOS, F.; LOPES, A. **Cancro bacteriano do tomateiro**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1082589/1/DOC154FINAL.pdf>>.

37 RAJA, F. N. S. et al. **Synergistic Antimicrobial Metal Oxide-Doped Phosphate Glasses; a Potential Strategy to Reduce Antimicrobial Resistance and Host Cell Toxicity**. ACS Biomaterials Science & Engineering, v. 8, n. 3, p. 1193–1199, 24 fev. 2022. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.1c00876>>.

38 SAID KHOURCHI; DELAPLACE, P.; ADNANE BARGAZ. **Polyphosphate fertilizer use efficiency strongly relies on soil physicochemical properties and root-microbial activities**. Geoderma, v. 429, p. 116281–116281, 26 nov. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.116281>>.

39 CANCRO. **Cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*)**. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/problemas/cancro-bacteriano_2050.html#:~:text=O%20tratamento%20pode%20ser%20efetuado,50%20mL%20de%20espalhante%20adesivo.>>.