



DETECÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE PERCEVEJOS *Euschistus heros*, *Diceraeus melacanthus* e *Nezara viridula* UTILIZANDO NANOSSENSOR FUNCIONALIZADO COM PANI.AG

ILIZANDRA A. FERNANDES^{1*}, RAFAELA V. UTTEICH¹, DOUGLAS A. DIAS¹ JANINE MARTINAZZO¹, MIGUEL BORGES², MARIA C. BLASSIOLI-MORAES², CLARICE STEFFENS¹, JULIANA STEFFENS¹

¹Universidade de Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões, Campus Erechim- Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos

² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Laboratório de Semioquímicos, Brasília - DF
*e-mail: ilizandrafernandes@yahoo.com.br

RESUMO – A utilização de diferentes técnicas para o controle de pragas na agricultura tem buscado uma maior segurança e preservação ambiental. Nesse sentido, os sensores têm se tornado uma alternativa promissora e eficiente para a detecção de compostos voláteis. Em estudos prévios mostramos que o nanosensor cantilever PANI.Ag (polianilina e prata) tem sua frequência alterada quando exposto ao feromônio sexual do percevejo marrom, o composto 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila. O presente trabalho teve como objetivo avaliar se voláteis emitidos pelas ninfas de quinto instar dos percevejos também alterariam a frequência de ressonância do nanosensor de cantilever recoberto com PANI.Ag. Os percevejos foram mantidos em ambiente que mimetizava a cultura da soja, sendo que o nanosensor de cantilever quando exposto aos voláteis das ninfas não apresentou redução na frequência de ressonância. Ressalta-se que a resposta foi similar ao controle indicando que não houve interação da camada sensora com os feromônio. Como trabalhou-se com insetos vivos, pode ter ocorrido que os insetos não liberaram voláteis, ou que os compostos liberados não interagiram com a camada de PANI.Ag. Os compostos liberados pelas ninfas são majoritariamente aldeídos de cadeia curta como (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-octenal, (*E*)-2-decenal, 4-oxo-(*E*)-2-hexenal, e hidrocarbonetos lineares como o undecano e tridecano.

Palavras chave: Frequência, sensores, feromônio, instares.

ABSTRACT- The use of different techniques for pest control in agriculture has sought greater safety and environmental preservation, in this sense sensors have become a promising and efficient alternative for the detection of volatile compounds. In previous studies, we showed that the PANI.Ag (polyaniline and silver) cantilever nanosensor has its frequency altered when exposed to the sex pheromone of the brown stinkbug, the compound 2,6,10-methyltrimethyltridecanoate. The present work aimed to evaluate whether volatiles emitted by the fifth instar nymphs of stinkbugs would also alter the resonant frequency of the cantilever nanosensor coated with PANI.Ag. The stinkbugs were inspired by an environment that mimicked the soybean culture, and the cantilever nanosensor when exposed to the volatiles of the nymphs did not present a reduction in the resonance frequency, it was worth that the response was similar to the control indicating that there was no interaction of the layer sensor with pheromones. As it worked with live insects, it may have occurred that the insects did not release volatiles, or that the released compounds did not interact with the PANI.Ag layer. The compounds released by the nymphs are mostly short-chain aldehydes such as (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-octenal, (*E*)-2-decenal, 4-oxo-(*E*)-2-hexenal and linear hydrocarbons such as undecane and tridecane. Keywords: Frequency, sensors, pheromone, instars.

INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos o crescimento populacional e a preocupação com a elevada demanda de alimentos têm aumentado o interesse em manter os grãos e as sementes colhidos nas lavouras com o mínimo de perdas até o consumo final. Com o propósito de assegurar a preservação de alimentos de culturas agrícolas para seu consumo direto ou após a transformação industrial, garantindo a segurança alimentar da humanidade (Lorini *et al.*, 2015; Hodaifa *et al.*, 2018; Martinazzo *et al.*, 2022). Dentre estes grãos, a soja (*Glycine max* (L.) Merrill), é uma das culturas de maior importância alimentar e econômica no Brasil e no mundo.

Durante o cultivo da soja, diversos insetos e pragas atacam as lavouras, dentre eles estão besouros, percevejos e lagartas, específicos para cada fase de desenvolvimento da planta (Perry *et al.*, 2016). Segundo Degrande e Vivan (2012), quando o ataque dos percevejos ocorre no desenvolvimento das vagens da soja, por exemplo, as perdas podem chegar a 30%, com surgimento de vagens malformadas e secas. Se o ataque acontecer na formação dos grãos, podem aparecer deformações, murchamentos e manchas nos grãos e, quando ocorre nos grãos já formados, há perda na qualidade das sementes.

Os percevejos *Euschistus heros* machos liberam um feromônio sexual (2,6,10-trimetiltridecanoato de metila) para atração das fêmeas com o objetivo de acasalamento. Estudos recentes demonstram que nanossensores tem se tornado eficientes na detecção de feromônios de percevejos apresentando identificação na ordem de ppq (partes por quatrilhão) com alto limite de detecção e alta sensibilidade (Martinazzo, 2021).

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi a utilização do nanossensor de cantilever funcionalizado com uma camada nanohíbrida de polianilina e prata (PANI.Ag) para detectar compostos voláteis produzidos e liberados por ninfas dos percevejos *Euschistus heros*, *Diceraeus melacanthus* e *Nezara viridula*. Estudos prévios mostraram que as ninfas destes percevejos produzem majoritariamente aldeídos insaturados como (*E*)-2-hexenal, (*E*)-

2-octenal, (*E*)-2-decenal e 4-oxo-(*E*)-2-hexenal, e hidrocarbonetos lineares como o undecano e tridecano (Borges e Aldrich, 1992, Moraes *et al.*, 2008).

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenvolvimento e funcionalização do nanossensor de cantilever PANI.Ag

Os cantileveres de silício (Si) foram adquiridos comercialmente (Budget Sensors®, Bulgária) e utilizados para o desenvolvimento do nanossensor, devido a sua estabilidade ao longo do tempo. Para a funcionalização do nanossensor de cantilever foi utilizada a técnica *dip coating* conforme Cho *et al.* (2005), utilizando PANI.Ag nanohíbrido (Martinazzo *et al.*, 2022). A PANI.Ag foi obtida por síntese *in situ*, em seguida solubilizado em N,N dimetilacetamida (DMAc) e dopado com ácido clorídrico (HCl 1 M). O filme fino do nanohíbrido foi obtido por imersão da superfície do cantilever em 100 µL de solução de PANI.Ag, permanecendo em contato por 3 min. Posteriormente, lavado com 100 µL de HCl (1 mol/L) pH 3 e seco por 15 min à temperatura ambiente (25°C). Um cantilever de controle sem funcionalização também foi usado nos experimentos

Testes *in vivo*

Os ovos de percevejos *Euschistus heros*, *Diceraeus melacanthus* e *Nezara viridula* foram fornecidos pelo Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, de Brasília/DF.

As placas com os ovos foram alojadas em sala climatizada (25°C) e permaneceram nas placas até o 3º instar, pois durante seu ciclo biológico, os percevejos passam pelas fases de ovo, ninfa (composta de cinco instares), conforme apresentado na Figura 1.

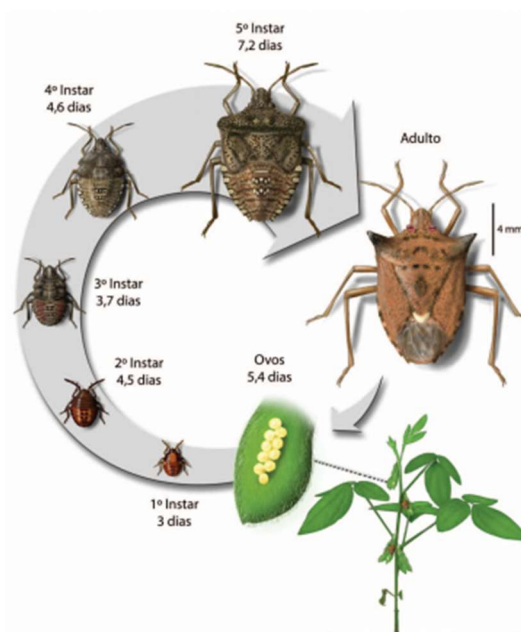


Figura 1: Ilustração do desenvolvimento do percevejo-marrom, *E. heros*.

Fonte: Cividanes, 1992.

Posteriormente foram transferidos para as gaiolas (caixas herméticas de 10L) com dieta natural consistindo de sementes de amendoim cru, soja e girassol e vagem fresca de feijão. Para o percevejo *D. melacanthus* além da dieta natural foi adicionado as caixas um buquê de boldo falso. A troca dos alimentos era realizada na segunda, quarta e sexta-feira e para o controle da umidade utilizaram-se potes descartáveis de 100 mL com água destilada. Na tampa foi feito um furo de 1,0 cm de diâmetro onde um pavio de algodão foi introduzido. As caixas foram fechadas em sua parte superior com uma tela para troca de ar com o meio ambiente. Os insetos permaneceram no período de adaptação no ambiente por 3 dias antes de iniciar a coleta dos voláteis e avaliação pelo nanossensor de cantilever PANI.Ag. Os insetos foram mantidos em uma foto período, 14h de luz (7h às 21h) e 10h de escuro (21h às 7h) (Zhang *et al.*, 2003).

Avaliação das medidas de frequência de ressonância

Quanto a análise das respostas do nanossensor de cantilever, foi utilizada uma câmara de polipropileno de 6,38 cm³, sendo

que a mesma possui um orifício central superior com 25 mm de diâmetro e 13 mm de altura para o encaixe no scanner do AFM, Microscopia de força atômica (Atomic Force Microscope), e dois orifícios laterais para a entrada e saída dos compostos voláteis. Dois anéis com vedação de borracha também foram utilizados na parte superior a fim de garantir total proteção durante o encaixe no equipamento.

Para avaliação da frequência de ressonância (f_{res}) em AFM (Nanosurf, C3000 Controller, Suíça), o cantilever foi colocado no suporte (canticlip), inserido junto ao scanner do equipamento AFM, apresentado na Figura 2. O laser foi ajustado, ou seja, posicionado na extremidade final da haste do cantilever e na posição central do fotodetector, conforme mostra a Figura 3, seguido da verificação da intensidade do sinal (65-68%). Para iniciar o procedimento de medida de f_{res} foram configuradas as medidas em ar, em modo dinâmico para o modelo de cantilever utilizado. A câmara foi colocada no equipamento e o cantilever ficou encaixado dentro da câmara para as análises.

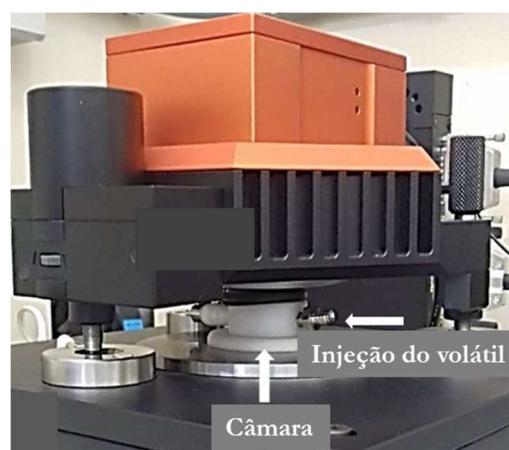


Figura 2: Câmara de gás conectada ao scanner para avaliar a frequência de ressonância.

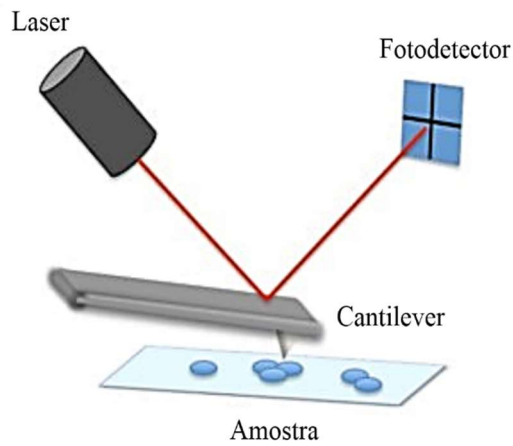


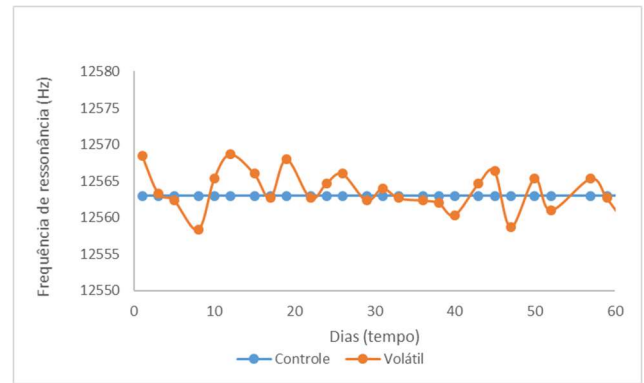
Figura 3: Ilustração do cantilever com feixe de laser incidindo sobre o cantilever e sua reflexão para o fotodetector. Fonte: Adaptado de Aguayo e Bozec (2016).

Uma hora antes da análise, as caixas foram fechadas com filme policloreto de vinila (PVC), para concentrar os compostos voláteis, posteriormente 20 μL de voláteis foram coletados com uma microseringa de gás (Hamilton, EUA), perfurando o filme plástico da caixa, que permaneceu próximo à câmara volátil. Imediatamente, a amostra coletada foi inserida na câmara para medida da frequência de ressonância. Uma caixa idêntica também foi avaliada, mas sem a presença de insetos, apenas com alimentos (vagem, grãos de soja, amendoim e girassol), algodão embebido em água para avaliar a interferência dos voláteis liberados.

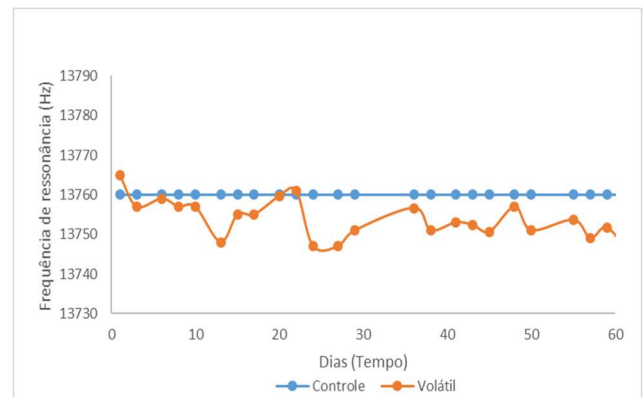
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Respostas do nanossensor cantilever aos feromônios

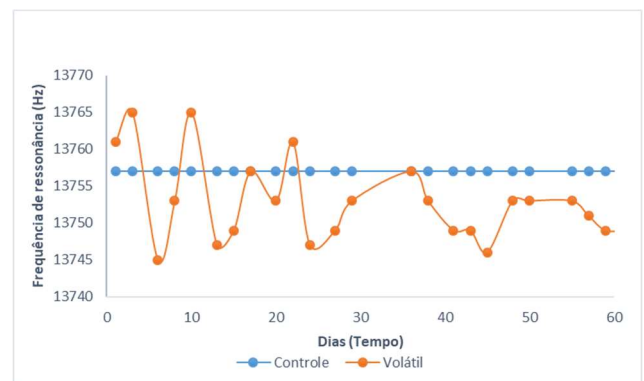
As medidas da f_{res} foram obtidas no AFM, fazendo a varredura de frequência de vibração na presença das concentrações dos compostos voláteis das ninfas dos percevejos *E. heros*, *D. melacanthus* e *N. viridula* em ar sintético (Controle), como apresentado na Figura 4.



(a)



(b)



(c)

Figura 4: Resposta dos nanossensores de cantilever PANI. Ag expostos aos compostos “in vivo” de *E. heros* (a), *D. melacanthus* (b), *N. viridula* (c).

Cabe ressaltar que o nanossensor de cantilever PANI. Ag quando exposto ao ar sintético (Controle) não apresentou variação na frequência de ressonância (Hz).

O nanossensor de cantilever quando exposto aos compostos voláteis de *E. heros*, *D. melacanthus*, *N. viridula* (Figuras 4a, 4b e 4c) não apresentou redução na frequência de

ressonância, ressalta-se que a resposta foi similar ao controle indicando que não houve interação da camada sensora com a alíquota contendo os voláteis liberados pelos insetos. Isso pode ter ocorrido ou porque não há interação dos aldeídos e hidrocarbonetos liberados com a camada de PANI.Ag, ou devido as baixas quantidades liberadas, ou os insetos não liberaram os compostos. Estudos serão conduzidos com os compostos sintéticos para certificarmos que o sensor modificado com PANI.Ag não detectam esses compostos. A não resposta aos compostos do estágio ninfal é interessante, pois pode indicar que estes não interferirão no caso de um sensor para detectar o feromônio sexual dos adultos, como o composto 2,6,10 trimetiltridecanoato de metila, que é liberado pelos machos adultos de *E. heros*.

CONCLUSÃO

Através dos experimentos realizados in vivo, foi possível verificar que não houve interação entre o nanosensor PANI.Ag e os voláteis, capturados pela microseringa de gás, dos percevejos *E. heros*, *D. melacanthus* e *N. viridula* não apresentando redução da frequência de ressonância quando comparado ao controle.

NOMENCLATURA

AFM - Microscopia de força atômica (do inglês, Atomic Force Microscope)
 Ag- Prata
 DMAc - n, n-dimetilacetamida
 F_{res} - Frequência de ressonância
 HCl - Ácido Clorídrico
 PANI - Polianilina
 PVC- Policloreto de vinila
 Ppq- Partes por quadrilhão
 Si- Silício

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Laboratório de Semioquímicos, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio

Grande do Sul - Brasil (FAPERG), Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (SIGFAPDF) Projeto no 00193.00001056/2021-68, Financiadora de Estudos e Projeto (FINEP) e a URI-Erechim.

REFERÊNCIAS

- AGUAYO, S., BOZEC, L. (2016). Mechanics of bacterial cells and initial surface colonisation. In: LEAKE, M. C. Biophysics of infection, advances in experimental medicine and biology. London: Springer International Publishing Switzerland, p. 245-260.
- BORGES, M. ALDRICH, J. R. (1992). Instar-Specific Defensive Secretions of Stink Bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Experientia*, Vol 48, p. 893-896.
- BREZOLIN, A. N., MARTINAZZO, J., STEFFENS, J., STEFFENS, C. (2020). Polyaniline-graphene oxide nanocomposite microelectromechanical sensor for stink bugs pheromone detection. *Sensors e Actuators: B. Chemical*, Vol 305, p. 127426.
- CHO, J. H.; YU, J. B.; KIM, J. S.; SOHN, S. O.; LEE, D. D.; HUH, J. S. (2005). Sensing behaviors of polypyrrole sensor under humidity condition. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol 108, p. 389-392.
- CIVIDANES, F.J. (1992). Determinação das exigências térmicas de *Nezara viridula* (L., 1758), *Piezodorus guildinii* (West., 1837) e *Euschistus heros* (Fabr., 1798) (Heteroptera: Pentatomidae) visando ao seu zoneamento ecológico. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, Piracicaba, 100 f. (Tese Doutorado em Ciências).
- DEGRANDE, P. E.; VIVAN, L. M. (2012). Pragas da Soja, n. 66, p. 155-206.
- HODAIFA, G.; NIETO, L. M.; SEYEDSALEHI, M. (2018). Relevance and legal frame in novel food preservation approaches for improving food safety and risks assessment. In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. Food safety and preservation - Modern biological approaches to

- improving consumer health. London: Academic Press, p. 521-563.
- LORINI, I.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A.; HENNING, F. A. (2015). Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF, p. 1-84.
- MARTINAZZO, J. (2021), Detecção de feromônio de *Euschistus heros* (F.) utilizando nanossensores de cantilever, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim-RS, 107p. (Tese (doutorado)).
- MARTINAZZO, J. MORAES, M. C. B.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C. (2022). Application of gas nanosensor for detection pheromone and its interferents compounds in vivo *Euschistus heros* (F.) stink bugs insects, Sensors and Actuators A: Physical, Vol 345, p.113804.
- MORAES, MARIA C.B.; PAREJA, MARTÍN; LAUMANN, RAÚL A.; BORGES, M. (2008). The chemical volatiles (Semiochemicals) produced by neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). Neotropical Entomology (Impresso), Vol 37, p. 1-10.
- ZHANG, A.; BORGES, M.; ALDRICH, J. R.; CAMP, M. (2003). Stimulatory male volatiles for the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae), Neotrop. Entomol. Vol 32 (4), p.713-717.
- PERRY, E. D.; CILIBERTO, F.; HENNESY, D.A.; MOSCHINI, G.; QAIM, M.; ZIBERMAN, D.; KATHAGE, J.; BARROWS, G.; SEXTON, S. (2016). Genetically engineered crops and pesticide use in U.S. maize and soybeans. Science Advances, Vol 2 (8), p. 900-902.