
APLICAÇÃO DE CAMADAS SENSORAS PANI. AG E PANI/OG NA DETECÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE PERCEVEJOS

ILIZANDRA A. FERNANDES ^{1*}, RAFAELA V. UTTEICH¹, ELIEL P. MACHADO¹,
DOUGLAS A. DIAS¹, 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 - Os percevejos (Pentatomidae) são considerados as principais pragas na agricultura e têm importância econômica significativa, esses insetos são responsáveis por causar danos às lavouras a partir da alimentação, o que resulta em redução na qualidade e no rendimento. Os Pentatomídeos produzem uma mistura de compostos químicos que servem tanto como feromônios de alarme quanto como defesa contra predadores. Nesse sentido, a utilização de sensores tem se tornado uma alternativa promissora e eficiente na detecção destes compostos voláteis. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar se os nanossensores de cantilever com as camadas ativas polianilina, prata e grafeno seriam capazes de detectar os compostos defensivos dos percevejos, *Euschistus heros*, *Nezara viridula* *Diceraeus melacanthus*. O nanossensor PANI.Ag (polianilina e prata) apresentou resposta para todos os compostos, mas para a camada PANI/OG (polianilina/óxido de grafeno) não houve redução da frequência de ressonância.

Palavras chave: Pentatomidae, nanossensores, frequência, cantilever.

ABSTRACT - Stink bugs (Pentatomidae) are considered the main pests in agriculture and have significant economic importance. These insects are responsible for causing damage to food activities, which results in a reduction in quality and yield. Pentatomids produce a mixture of chemical compounds that serve both as alarm pheromones and as defense against predators. In this sense, the use of sensors has become a promising and efficient alternative for detecting these volatile compounds. Therefore, the objective of this study was to evaluate whether cantilever nanosensors with polyaniline, silver and graphene active layers would be capable of detecting the defensive compounds of bedbugs, *Euschistus heros*, *Nezara viridula* *Diceraeus melacanthus*. The PANI.Ag nanosensor (polyaniline and silver) showed a response for all compounds, but for the PANI/OG layer (polyaniline/graphene oxide) there was no reduction in the resonance frequency.

Keywords: Pentatomidae, nanosensors, frequency, cantilever.

INTRODUÇÃO

Os pentatomídeos produzem uma mistura de compostos químicos que servem tanto como feromônios de alarme ou defesa contra predadores. Os percevejos são uma família de insetos que pertencem à ordem Hemiptera. Caracterizam-se pelo corpo em forma de escudo e pelo odor forte, que pode ser emitido quando mexido ou esmagado. Quando perturbados, liberam compostos de defesa de suas glândulas odoríferas que podem ser ofensivos (Moraes *et al.*, 2008; Fávoro e Zarbin, 2012).

Nesse sentido, o desenvolvimento de novos métodos de monitoramento baseados em interações semioquímicas, tem se tornado uma alternativa viável para o monitoramento de insetos-praga no campo (Martinazzo *et al.*, 2022).

Uma ferramenta promissora e eficiente para detecção de moléculas voláteis com extrema sensibilidade tem sido os nanossensores de cantilever, pois apresentam a capacidade de mudar a frequência vibracional ou sofrer deflexão devido a adsorção de moléculas sobre a superfície, tornando-os excelentes transdutores e aptos para serem utilizados como sensores químicos, físicos ou biológicos (Manzoli *et al.*, 2010, Steffens *et al.*, 2014, Brezolin *et al.*, 2020). Assim, a utilização de sensores na detecção de compostos voláteis e a busca por novos materiais a serem utilizados como camadas ativas na identificação e monitoramento desses compostos, vem despertando interesse para detecção de insetos no campo.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi a avaliação de sensores nanoestruturados de cantileveres com diferentes camadas sensoras (polianilina, prata e óxido de grafeno) para detecção de semioquímicos, utilizando os compostos voláteis Octenyl acetate, E-2 Octenal, E-2 Hexenal e-2 Decenal obtidos dos percevejos *Euschistus heros*, *Diceraeus melacanthus* e *Nezara viridula*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados cantileveres de silício (Si) obtidos comercialmente (Budget Sensors®) com frequência de ressonância de

17±4 kHz e constante de mola (K) de 0,2 N.m⁻¹, comprimento de 445 μm, largura de 48 μm e espessura de 2,8 μm, revestido com uma camada de 30 nm de alumínio sendo esta refletora, a fim de aumentar a visibilidade do sinal do laser.

Preparo das camadas sensoras

Os cantileveres devem ser revestidos com uma camada sensora que seja altamente específica e capaz de reconhecer moléculas alvo, para que possam atuar como sensores.

Solução PANI: A solução de PANI foi preparada utilizando 10 mg do pó diluído em 1 mL de N, N-dimetilacetamida (DMAc) e mantido em ultrassom (Unique modelo USC-1800) por 1 h. Após, foi adicionado solução de HCl (1 mol. L⁻¹) pH 3,0, até completar 10 mL, deixando a mesma agitando em agitador magnético overnight antes da sua utilização.

Solução PANI.Ag: Para a síntese do nanohíbrido de PANI.Ag (polianilina e prata), foi utilizada a metodologia de Braga (2012), inicialmente 0,25 g do monômero anilina foi dispersado em 15 mL de N, N-dimetilacetamida (Merck, Brasil, 99%) e disposta em ultrassom (Unique, USC-1800, Brasil) por 15 min para solubilização. Posteriormente adicionou-se 10 mL de ácido clorídrico (HCl 1 mol/L). Foi adicionado à solução acidificada do monômero 25 mL de uma solução aquosa 0,08g/mL de nitrato de prata (AgNO₃, Synth, Brasil, 99%) e mantida sob (Fisaton, 752^a, Brasil) por 24 h em temperatura ambiente (25°C). Após agitação, a solução foi filtrada à vácuo (bomba de vácuo TE-058, Tecnal, Brasil), sendo lavada com água destilada e seca em dessecador com sílica por 24 h. Sendo que 10 mg do pó resultante foram dispostos em balão volumétrico de 10 mL e solubilizado com 2 mL de DMAc sob agitação. O volume do balão foi completado com HCl (1 M), obtendo uma solução com concentração final de 1 mg. mL⁻¹.

Solução de OG: o óxido de grafeno (OG) foi sintetizado através de um processo de esfoliação utilizando um método de Hummers

modificado (Lima *et al.*, 2017) e foi gentilmente cedido para nossos experimentos pelo Instituto de Física da USP, São Carlos/SP. Para síntese do grafeno, Lima *et al.* (2017) utilizaram 5 g de grafite misturado a 3,75 g de nitrato de sódio (NaNO_3) mantendo em agitação em banho de gelo. Em seguida adicionaram 375 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e 22,5 g de permanganato de potássio (KMnO_4), mantendo a mistura em agitação (em banho de gelo) por 2 h e após este período mantido em agitação a temperatura ambiente por 5 dias, até a formação de um líquido viscoso castanho escuro, que indicam que o grafite foi oxidado com sucesso. Em seguida, para a segunda oxidação adicionou-se à mistura 700 mL de solução aquosa de H_2SO_4 (5%), que foi mantida em agitação e aquecimento (80°C) por 1h, passando para cor amarelo escuro e indicando alta oxidação das folhas de grafite. Após a temperatura foi mantido em 98°C favorecendo a formação de grupos carbonila e epóxi. Em seguida iniciou-se os processos de lavagem, para tanto a temperatura foi reduzida para 60°C e adicionou-se 15 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e mantido por 2h em ultrassom, e após este período mantido por 12 h em repouso. Esta etapa foi conduzida para reduzir materiais residuais presentes na amostra. Para remoção de impurezas inorgânicas foi adicionado ao OG 2 L de H_2SO_4 (3%) e H_2O_2 (0,5%) e mantido em agitação por 10 min e mais 15 min em ultrassom (promovendo a formação de mais grupos carbonila e epóxi). Após a mistura foi centrifugada e o precipitado foi lavado com H_2SO_4 e H_2O_2 , seguindo com agitação e centrifugação, e por último lavado mais 3 vezes com solução de HCl. Na sequência o material foi lavado com água deionizada e centrifugado, o sobrenadante foi deixado em dessecador até estar seco, originado o pó de grafeno (Brezolin *et al.*, 2020). O OG foi disperso em água (acidificada com HCl até pH 3) na concentração de $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$.

Funcionalização do nanossensores de cantileveres

Para funcionalização foi utilizada a técnica interfacial (dip coating) que consiste na imersão de um substrato em uma solução de polimerização química, onde parte do polímero será depositado em sua superfície sendo espessura do filme controlada pelo tempo de imersão, conforme Cho *et al.* (2005) e a técnica de automontagem Layer-by-Layer (LbL) que permite a montagem de materiais na escala nanométrica, com simplicidade e qualidade, resultando em estruturas organizadas, de acordo com a metodologia de Raposo *et al.* (1997).

Preparo dos compostos para avaliação no AFM

Os compostos voláteis, Octenyl acetate, E- 2 Octenal, E- 2 Hexenal e E- 2 Decenal, obtidos dos percevejos *E. heros*, *N. viridula* e *D. melacanthus* foram fornecidos pelo Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, de Brasília/DF. Foram preparadas diferentes concentrações (0,005 – 0,01 – 0,05 - 0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,4 – 0,5 – 0,6 – 0,7 – 0,8 – 0,9 – 1,0 $\mu\text{g/mL}$), em balões de vidro de 10 mL onde completou-se o volume com o solvente n-hexano (99%) (Pires *et al.*, 2006, Martinazzo, 2021).

Avaliação das medidas de frequência de ressonância

Para a análise das respostas do nanossensor de cantilever, com as camadas sensoras PANI/AG e PANI/OG, foi utilizada uma câmara de polipropileno de $6,38 \text{ cm}^3$, 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) (Figura 1), o cantilever foi colocado no suporte (canticlip), inserido junto ao scanner do equipamento AFM. A câmara foi colocada no equipamento e o cantilever ficou encaixado dentro da câmara para as análises. Os dados obtidos foram tabulados e tratados através do software Microsoft Excel.



Figura 1: Equipamento AFM utilizado para avaliar a frequência de ressonância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A medida da f_{res} foi obtida no AFM, fazendo a varredura de frequência de vibração, que foi avaliada na presença das concentrações dos compostos Octenyl acetate, E- 2 Octenal, E- 2 Hexenal e- 2 Decenal, solvente hexano (para verificar se ocorre interferência deste volátil na medida), e ar sintético (branco), em triplicata, utilizando as camadas sensoras PANI.Ag e PANI/OG, conforme apresentado nas Figuras 2 e 3.

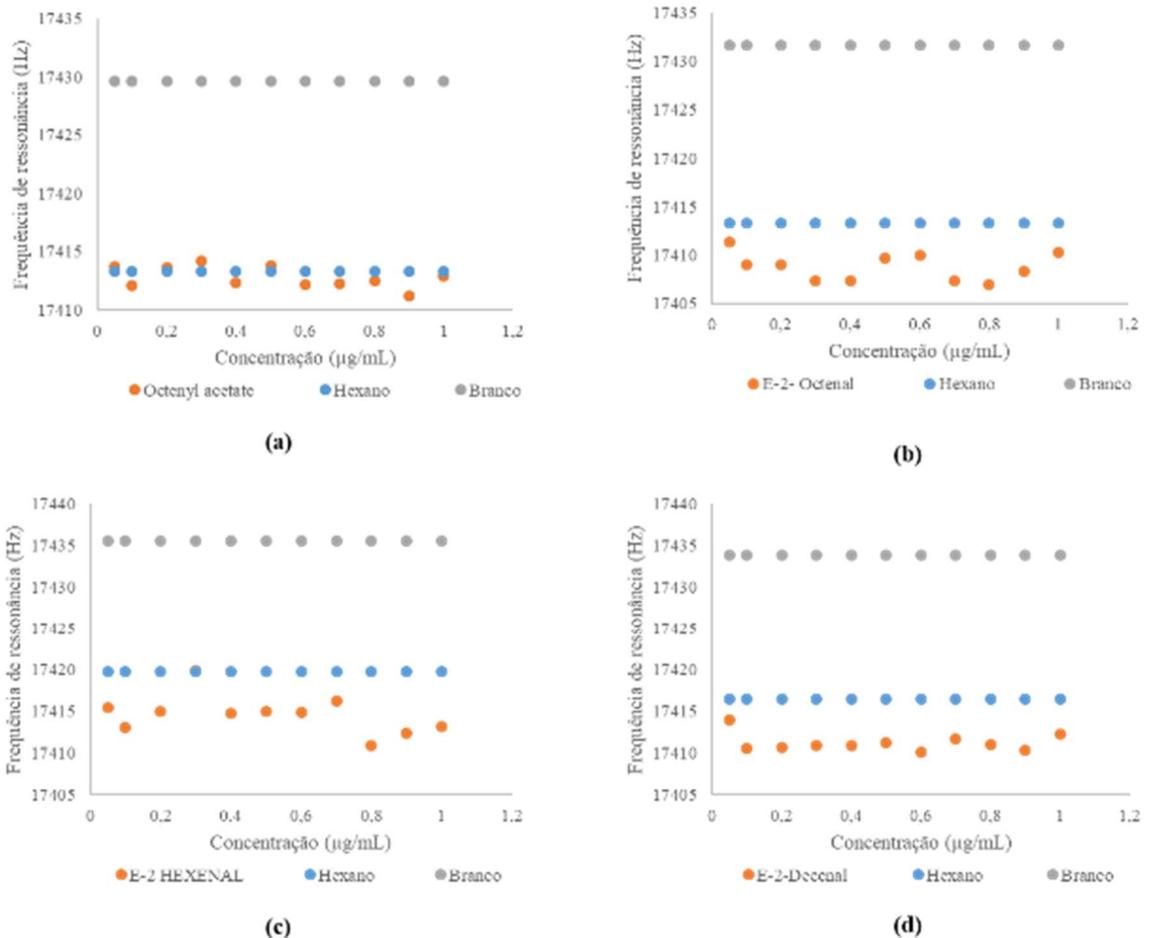


Figura 2: Resposta de f_{res} dos nanossensores de cantilever de PANI.Ag para os compostos Octenyl acetate (a), E- 2 Octenal (b), E- 2 Hexenal (c) e E- 2 Decenal (d).

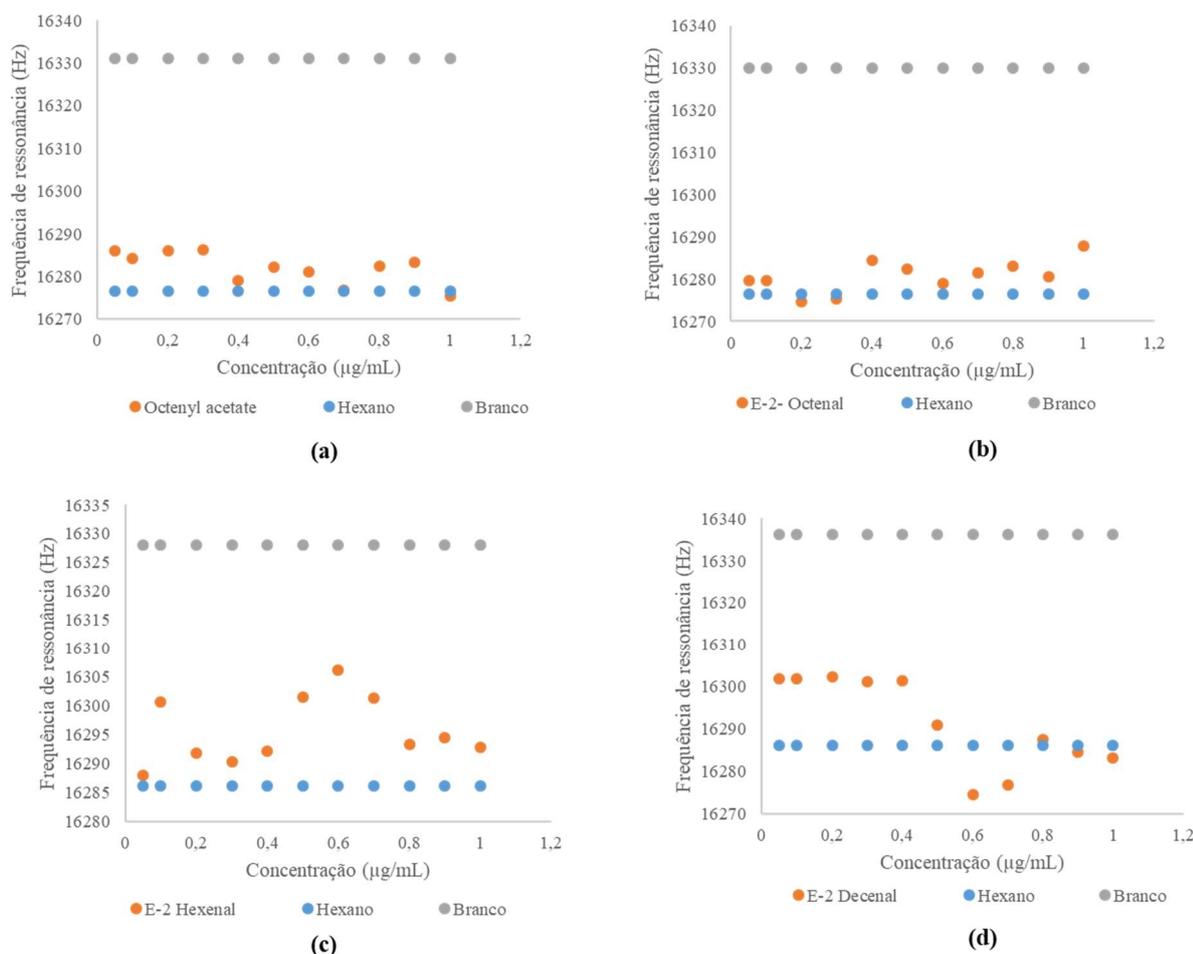


Figura 3: Resposta de f_{res} dos nanossensores de cantilever de PANI/OG para os compostos Octenyl acetate (a), E- 2 Octenal (b), E- 2 Hexenal (c) e E- 2 Decenal (d).

Com relação aos nanossensores de cantilever PANI/AG e PANI/OG quando expostos ao ar sintético (branco) não apresentaram variação na frequência de ressonância, mas com relação ao solvente hexano apresentaram variação. Observou-se que para todos os compostos houve diminuição da frequência de ressonância, com o aumento das concentrações dos compostos, utilizando a camada sensora PANI. Ag (Figuras 2a, 2b, 2c e 2d).

Quanto ao nanossensor de cantilever PANI/OG, observou-se que para os compostos Octenyl acetate, E- 2 Octenal, E- 2 Hexenal (Figuras 3a, 3b e 3c) não houve diminuição da frequência de ressonância com o aumento das concentrações dos compostos, sendo os valores próximos ao do solvente hexano. Para

o composto E- 2 Decenal (Figura 3d) nas concentrações de 0,6 e 0,7 $\mu\text{g/mL}$ houve uma pequena diminuição da f_{res} .

CONCLUSÃO

O nanossensor PANI/Ag apresentou resposta para os todos compostos defensivos, porém a camada sensora PANI/OG não mostrou mudança na frequência de ressonância em relação ao controle. Desta forma, ressalta-se a importância da avaliação das camadas sensoras para garantir a sensibilidade e seletividade em um único dispositivo, sendo assim a escolha da camada sensível é fundamental.

NOMENCLATURA

AFM - Microscopia de força atômica (do inglês, Atomic Force Microscope)

Ag- Prata

AgNO₃- Nitrato de prata

DMAc - N,N-dimetilacetamida

F_{res} - Frequência de ressonância

HCl - Ácido Clorídrico

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

LbL - Layer by Layer

K- constante de mola

KMnO₄ - Permanganato de Potássio

NaNO₃ - Nitrato de sódio

Nm - Nanômetro

OG - Óxido de Grafeno

PANI - Polianilina

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

- BRAGA, P.C.O. (2012). Síntese e caracterização de nanohíbridos de polianilina e nanopartículas de prata, Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 93 f. (Dissertação de mestrado).
- 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.
- BUDGET SENSORS. AFM probe Model: ContAl-G. Disponível em: <http://www.budgetsensors.com/downloads/ContAl-G_Datasheet.pdf>. Acesso em: 14 out 2022.
- 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.
- FÁVARO, C. F., & ZARBIN, P. H. G.. (2012). Identificação dos compostos defensivos encontrados nas glândulas metatorácica e abdominais dorsais dos percevejos *Loxa deducta* e *Pellaea stictica* (Heteroptera: Pentatomidae). *Química Nova*, Vol 35(8), p. 1582–1586.
- LIMA, A. H.; MENDONÇA, J.P.; DUARTE, M.; STAVALE, F.; LEGNANI, C.; DE CARVALHO, G. S.G.; MACIEL, I. O.; SATO, F.; FRAGNEAUD, B.; QUIRINO, W. (2017). Reduced graphene oxide prepared at low temperature thermal treatment as transparent conductors for organic electronic applications. *Organic Electronics*, Vol 49 (7), p. 165-173.
- MARTINAZZO, J. (2021). Detecção de feromônio de *Euschistus heros* (F.) utilizando nanossensores de cantilever. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim-RS, 107 f. (Tese de doutorado).
- MARTINAZZO, J.; BALLEEN, S. C.; STEFFENS, J.; STEFFENS, C. (2022) Sensing of pheromones from *Euschistus heros* (F.) stink bugs by nanosensors, *Sensors and Actuators Reports*, Vol 4, p. 100071.
- MANZOLI, A.; STEFFENS, C.; PASCHOALIN, R. T.; OLIVEIRA, J. E.; MATTOSO, L. H. C.; HERRMANN, P. S. P. (2010). Funcionalização da superfície de microcantilevers utilizados em microscopia de força atômica com biomoléculas. *Circular Técnica*. EMBRAPA.

- MORAES, M. C. B., PAREJA, M., LAUMANN, R. A., & BORGES, M. (2008). The chemical volatiles (Semiochemicals) produced by neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology*, Vol 37(5), p.489–505.
- PIRES, C. S. S.; SUJII, E. R.; SCHMIDT, F. G. V.; ZARBIN, P. H. G.; ALMEIRA, J. R. M. de; BORGES, M. (2006). Potencial de uso de armadilhas iscadas com o feromônio sexual do percevejo marrom, *Euschistus heros* (Heteroptera : Pentatomidae), para o monitoramento populacional de percevejos praga da soja. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia*, Vol 7, p. 70–77.
- RAPOSO, M.; OLIVEIRA JR, O. N. (1998). Adsorption mechanisms in layer-by-layer films. *Brazilian Journal of Physics*, Vol 28 (4).
- STEFFENS, C.; MANZOLI, A.; OLIVEIRA, J. E.; LEITE, F. L.; CORREA, D. S.; HERRMANN, P. S. P. (2014). Bio inspired sensor for insect pheromone analysis based on polyaniline functionalized AFM cantilever sensor. *Sensors and Actuators*, Vol 191, p. 643-649.