

---

**AVALIAÇÃO DE SEMIOQUÍMICOS DOS PERCEVEJOS *Nezara viridula* e *Diceraeus melacanthus* EM AMBIENTE CONTROLADO**

ILIZANDRA A. FERNANDES<sup>1\*</sup>, RAFAELA V. UTTEICH<sup>1</sup>, THAIS FEIDEN<sup>1</sup>, ROSICLER COLET<sup>2</sup>, CLARICE STEFFENS<sup>1</sup>, JULIANA STEFFENS<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Instituto Federal de Santa Catarina - Campus São Miguel do Oeste

\*e-mail: ilizandrafernandes@yahoo.com.br

**RESUMO** - A constante busca por diferentes técnicas para o controle de pragas na agricultura tem sido baseada na segurança e preservação ambiental. Sendo que, o desenvolvimento de medidas de controle eficazes e sustentáveis para monitoramento dos percevejos tem sido amplamente pesquisada visando a continuidade da produtividade e rentabilidade da agricultura. Nesse sentido, os sensores têm se tornado uma alternativa promissora e eficiente para a detecção dos compostos voláteis, sendo que estudos prévios demonstraram que os nanossensores de cantilever PANI.Ag (polianilina e prata) e PANI/OG (polianilina e grafeno) tem sua frequência alterada quando expostos aos feromônios. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se os voláteis emitidos pelos percevejos *Nezara viridula* e *Diceraeus melacanthus* na soja, também alterariam a frequência de ressonância do nanossensor de cantilever com as camadas PANI.Ag e PANI/OG. O nanossensor de cantilever com a camada PANI/OG apresentou resposta para os voláteis liberados pelos percevejos.

Palavras chave: Frequência, polianilina, defensivos, soja.

**ABSTRACT** - The constant search for different techniques for controlling pests in agriculture has been based on safety and environmental preservation. Therefore, the development of effective and sustainable control measures for monitoring bedbugs has been widely researched with a view to maintaining agricultural productivity and profitability. In this sense, sensors have become a promising and efficient alternative for the detection of volatile compounds, and previous studies have demonstrated that the cantilever nanosensors PANI.Ag (polyaniline and silver) and PANI/OG (polyaniline and graphene) have their frequency altered when exposed to pheromones. Thus, the present work aimed to evaluate whether the volatiles emitted by the stink bugs *Nezara viridula* and *Diceraeus melacanthus* in soybeans would also alter the resonance frequency of the cantilever nanosensor with the PANI.Ag and PANI/OG layers. The cantilever nanosensor with the PANI/OG layer showed a response to the volatiles released by bedbugs.

Keywords: Frequency, polyaniline, pesticides, soy.

## INTRODUÇÃO

O setor do agronegócio desempenha um papel cada vez mais importante na produção global de alimentos. Entre várias culturas, a

soja emergiu como uma atividade agrícola significativa devido à sua versatilidade e cultivo generalizado, impulsionada pela crescente procura para consumo humano, matéria-prima animal e produção de biocombustíveis (MAPA, 2017).

No entanto, o cultivo da soja é suscetível ao ataque de diversos insetos-praga, notadamente os percevejos (Perry *et al.*, 2016). Estes possuem um olfato que está intimamente ligado ao desempenho das suas funções comportamentais, sendo o sentido mais importante, a frente da audição e visão. Sinais químicos são utilizados para definir locais de oviposição, acasalamento, localização de presas e defesa (Birch e Haynes, 1984; Vickers *et al.*, 2001; Brezolin, 2018).

Sendo assim, o principal meio de comunicação entre as plantas e os insetos são as interações físico-químicas, para isto, os insetos possuem sistemas de reconhecimento das moléculas químicas extremamente sensíveis e específicos, sem os quais não sobreviveriam. As substâncias químicas que agem na comunicação entre organismos são denominadas semioquímicos, e quando agem na mesma espécie são chamadas de feromônios (Magalhães *et al.*, 2020).

Nesse contexto o desenvolvimento de sensores para detecção dos semioquímicos na cultura da soja, se tornam cada vez mais interessantes. Os nanossensores baseados em cantileveres tem sido utilizado, uma vez que por apresentam-se minaturizados, e dependendo da camada ativa desenvolvida, são capazes de detectar quantidades diminutas de analitos (Brezolin, 2018).

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi a utilização dos nanossensores de cantilever polianilina e prata (PANI/Ag) e polianilina e grafeno (PANI/OG) para detectar compostos voláteis de defesa liberados pelos percevejos *Euchistus heros*, *Nezara viridula*, *Diceraeus melacanthus* na soja.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 12 mudas de soja na fase R1 (início do florescimento) da variedade Delta no dia 27/03/2023 na cidade de Barão de Cotegipe/RS. As mudas de soja foram transplantadas para vasos, conforme a Figura 1 e monitoradas até a fase R4 (vagens desenvolvidas) para realização dos testes com os percevejos.



Figura 1: Mudanças de soja transplantadas nos vasos.

### Testes in vivo

Os ovos *Nezara viridula* e *Diceraeus melacanthus* e foram fornecidos pelo Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, de Brasília/DF. 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 foram mantidos em uma foto período, 14h de luz (7h às 21h), 10h de escuro (21h às 7h) e sala climatizada a 25°C (Zhang *et al.*, 2003).

## Preparo das camadas sensoras

Os cantileveres devem ser revestidos com uma camada sensora que seja altamente específica e capaz de reconhecer moléculas alvo, sendo assim a utilização de diferentes camadas é aplicada para identificar os compostos voláteis.

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<sup>-1</sup>) 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 (AgNO<sub>3</sub>, Synth, Brasil, 99%) e mantida sob (Fisaton, 752<sup>a</sup>, 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<sup>-1</sup>.

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<sub>3</sub>) mantendo em agitação em banho de gelo. Em seguida adicionaram 375 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e 22,5 g de permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>), 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3%) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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 mg. mL<sup>-1</sup>.

## Funcionalização do nanossensores

A funcionalização foi realizada utilizando a técnica interfacial (dip coating) onde é efetuada a imersão do substrato em uma solução de polimerização química, onde parte do polímero é 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).

### Medida de frequência de ressonância

Quanto a análise das respostas do nanossensores de cantilever, foi utilizada uma câmara de polipropileno de 6,38 cm<sup>3</sup>, 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, conforme Figura 2.

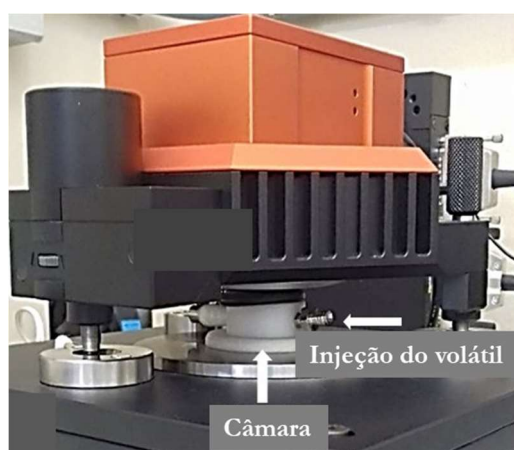


Figura 2: Câmara de gás conectada ao scanner para avaliação da frequência de ressonância.

Para as análises selecionados 3 vasos e montadas estruturas de arame recozido, recobertos com sombrite de nylon, para envolver nas mudas de soja de modo a não

permitir a saída dos percevejos. No vaso 1 estava a soja controle (sem percevejo) utilizada para identificar se algum interferente poderia influenciar na frequência e nos vasos 2 e 3, foram colocados um dia antes de iniciar a análise 13 percevejos *N. viridula* (5 fêmeas e 8 machos) e 10 *D. melacanthus* (5 fêmeas e 5 machos), respectivamente.

Uma hora antes da análise, os vasos foram vedados com um plástico transparente, com o intuito de concentrar os compostos voláteis. Posteriormente 20 µL de voláteis foram coletados com uma microseringa de gás (Hamilton, EUA), perfurando o plástico, que permaneceu próximo à câmara. Imediatamente, a amostra coletada foi inserida na câmara para medida da frequência de ressonância.

Foram avaliadas as respostas dos nanossensores de cantilever aos compostos voláteis dos percevejos *Nezara viridula* e *Diceraeus melacanthus* em ambiente contendo machos e fêmeas durante 4 dias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Monitoramento das mudas de soja

Durante os primeiros 10 dias as mudas foram mantidas em ambiente fechado com incidência de luz natural, recebendo água a cada 2 dias. No dia 05/04/2023 foram colocadas no ambiente externo pois já estavam adaptadas e bem desenvolvidas, mas no dia 20/04/2023 as mudas voltaram para o ambiente coberto pois havia previsão de geada. As mudas começaram a desenvolver as vagens (Figura 3).



Figura 3: Desenvolvimento das vagens nas mudas de soja.

## Avaliação da frequência

Para as análises foram montadas nos vasos 1, 2 e 3 estruturas de arame recozido e recobertas com sombrite de nylon (Figura 4), para envolver nas mudas de soja de modo a não permitir a saída dos percevejos. No vaso 1 estava a soja controle (sem percevejo) utilizada para identificar se algum interferente poderia influenciar na frequência e nos vasos 2 e 3, os percevejos *N. viridula* e *D. melacanthus*, respectivamente.



Figura 4: Mudas de soja recobertas com sombrite.

As análises de frequência foram iniciadas em 09/05/23, pois os percevejos permaneceram em sala climatizada (22°C) por 24 horas. Antes da análise um saco plástico transparente foi colocado em volta dos vasos para concentrar os compostos voláteis permanecendo por 1 hora. Posteriormente o ar foi coletado e inserido no AFM para medida da frequência de ressonância.

Primeiramente foram realizadas análises da soja sem a presença dos percevejos e do ar sintético (Controle) e posteriormente do *N. viridula* e *D. melacanthus*, utilizando as camadas sensoras PANI.Ag e PANI/OG. As leituras foram realizadas diariamente até 12/05/23. As Figuras 5 e 6 apresentam as respostas de  $f_{res}$  dos compostos voláteis utilizando as camadas PANI.Ag e PANI/OG.

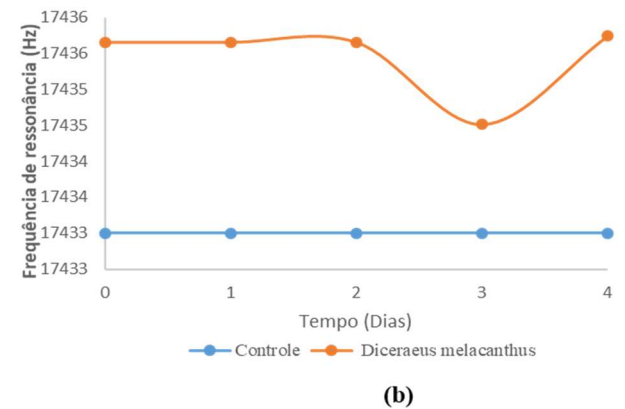
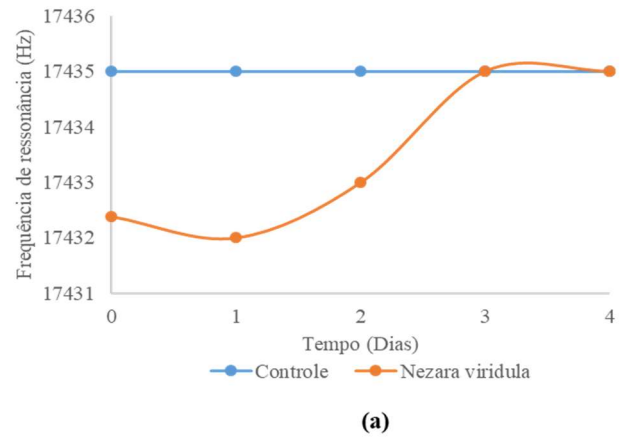


Figura 5: Resposta dos nanossensores de cantilever PANI.Ag expostos aos compostos “in vivo” de *N. viridula* (a) e *D. melacanthus* (b).

Quanto aos nanossensores de cantilever PANI.Ag e PANI/OG quando expostos ao ar sintético (Controle) não apresentaram variação na frequência de ressonância (Hz). Na Figura 5 pode-se observar que o nanossensor de cantilever PANI.Ag só apresentou redução na frequência de ressonância, quando exposto ao composto volátil de *N. viridula*.

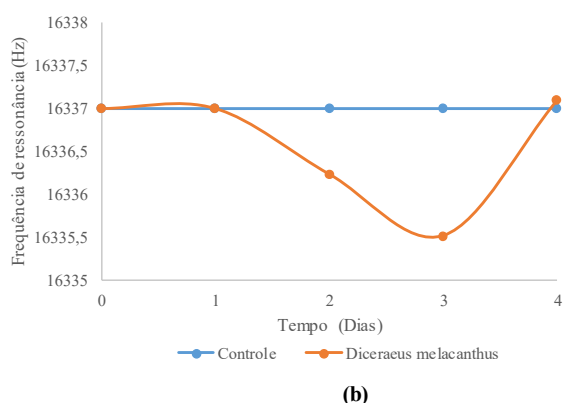
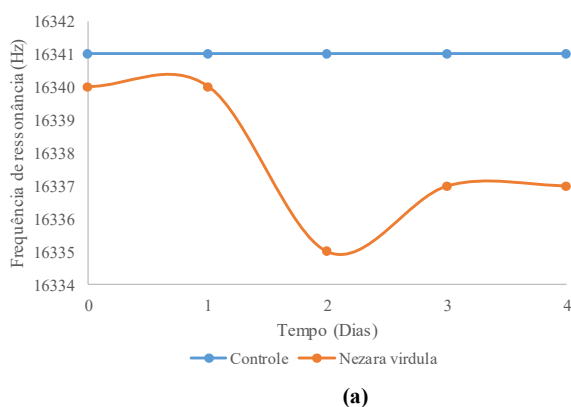


Figura 6: Resposta dos nanossensores de cantilever PANI/OG expostos aos compostos “in vivo” de *N. viridula* (a) e *D. melacanthus* (b).

Com relação ao nanossensor de cantilever PANI/OG (Figura 6a e 6b) apresentou redução na frequência de ressonância, quando exposto aos compostos voláteis do *N. viridula* e *D. melacanthus*.

As mudas de soja após 5 dias com a presença dos percevejos começaram a degradar, desta forma as análises foram realizadas durante 4 dias.

## CONCLUSÃO

Através dos testes realizados com os percevejos “in vivo” na soja, foi possível verificar que o AFM é uma ferramenta eficiente na medida dos semioquímicos, com resultados relevantes no controle de pragas nas lavouras. Cabe ressaltar que a camada sensora PANI/OG foi eficiente na obtenção dos sinais de frequência para ambos os feromônios liberados pelos percevejos.

## NOMENCLATURA

AFM - Microscopia de força atômica (do inglês, Atomic Force Microscope)  
 Ag- Prata  
 $\text{AgNO}_3$ - Nitrato de prata  
 DMAc - n, n-dimetilacetamida  
 $F_{\text{res}}$  - Frequência de ressonância  
 HCl - Ácido Clorídrico  
 $\text{HNO}_3$  - Ácido Nítrico  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  - Peróxido de hidrogênio  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$  - Ácido sulfúrico  
 LbL - Layer by Layer  
 K- constante de mola  
 $\text{KMnO}_4$  - Permanganato de Potássio  
 $\text{NaNO}_3$  - Nitrato de sódio  
 Nm - Nanômetro  
 OG - Óxido de Grafeno  
 PANI - Polianilina  
 PVC- Policloreto de vinila  
 Ppq- Partes por quadrilhão  
 PANI - Polianilina  
 Si- Silício

## AGRADECIMENTOS

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

- BIRCH, K. F.; HAYNES, E. A. (1984). Insect Pheromones. *Journal of Chemical Ecology*, Vol 10 (1), p. 189-191.
- 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. (2018). Desenvolvimento de sensor nanoestruturado de cantilever para detecção do feromônio sexual do percevejo marrom (*Euschistus heros* F.), Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, URI-Erechim- RS, 152 f. (Tese de doutorado).
- 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.
- 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.
- MAGALHÃES, D. M.; LAUMANN, R.A.; BORGES, M. CAUFIELD, J.; BIRKETT, M A.; BLASSIOLI-MORAES, M. C. (2020). Inefficient weapon-the role of plant secondary metabolites in cotton defence against the boll weevil. *Planta*, Vol 1, p.1-10.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil projeções do agronegócio 2016/2017 a 2026/2027 (2017). Disponível em: <[http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/informe\\_estatistico/Proj\\_Agro\\_negocio\\_2017\\_2027.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/informe_estatistico/Proj_Agro_negocio_2017_2027.pdf). Acesso em: 12 de novembro de 2023.
- 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.
- RAPOSO, M.; OLIVEIRA JR, O. N. (1998). Adsorption mechanisms in layer-by-layer films. *Brazilian Journal of Physics*, Vol 28 (4).
- VICKERS, N. J.; CHRISTENSEN, T. A.; BAKER, T. C.; HILDEBRAND, J. G. (2001). Odour-plume dynamics influence the brain's olfactory code. *Nature*, Vol 410 (6827), p. 466-470.
- 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.