



---

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CAMADAS SENSORAS EM SENSORES DE  
CANTILEVERES PARA DETECÇÃO DE SEMIOQUÍMICOS DE *Euschistus heros* E *Nezara  
viridula***

ILIZANDRA A. FERNANDES <sup>1\*</sup>, RAFAELA V. UTTEICH<sup>1</sup>, DOUGLAS A. DIAS<sup>1</sup>, SANDRA  
BALLEN<sup>1</sup>, JANINE MARTINAZZO<sup>1</sup>, MIGUEL BORGES<sup>2</sup>, MARIA C. BLASSIOLI-  
MORAES<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> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Laboratório de Semioquímicos – Brasília - DF  
\*e-mail: ilizandrafernandes@yahoo.com.br

**RESUMO** – Mediante toda tecnologia já desenvolvida na agricultura, ainda é comum a ocorrência de perdas na cultura da soja, entre as principais causas de perdas cita-se a presença de insetos-praga, como os percevejos, que vem despertando interesse pelo desenvolvimento de novas metodologias de manejo de pragas, como a utilização de feromônios. Desta forma, o objetivo desse estudo foi desenvolver nanossensores de cantilever utilizando diferentes camadas ativas (Polianilina, Prata e Grafeno) para detecção de 2,6,10-trimetiltridecanoato de etila, composto sintético análogo ao 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila do feromônio sexual do percevejo *Euschistus heros*, e os compostos *cis* e *trans* epóxi-bisaboleno componentes do feromônio do percevejo *Nezara viridula*. O nanossensor PANI.Ag (Polianilina e prata) apresentou resposta apenas para o composto 2,6,10-trimetiltridecanoato de etila. Com relação a camada PANI/OG (Polianilina/Oxido de grafeno) os compostos *cis* e *trans* epóxi-bisaboleno do *N. viridula* apresentou resposta. Os resultados mostraram a especificidade de resposta para cada funcionalização e ressaltando que a técnica de Layer-by-Layer ocorreu de forma eficiente.

Palavras chave: Semioquímicos, Oxido de Grafeno, polianilina, Frequência.

**ABSTRACT**- Through all the technology that has already been developed in agriculture, the occurrence of species in the soybean crop is still common, as the main causes of species cited the presence of insect pests, which has thus aroused interest in new methodologies for control pests, such as the use of pheromones as semiochemicals. Thus, the objective of this study was to develop cantilever nanosensors using different layers of layers (Polyaniline, Silver and Graphene) for detection of ethyl 2,6,10-trimethyltridecanoate, a synthetic compound analogous to methyl 2,6,10-trimethyltridecanoate of the sex pheromone of the stinkbug *Euschistus heros* and the *cis* and *trans* epoxy-bisabolene compounds of the pheromone of the stinkbug *Nezara viridula*. The PANI.Ag (Polyaniline and silver) nanosensor only responded to the compound ethyl-2,6,10-trimethyltridecanoate. With a PANI/OG (Polyaniline/Graphene Oxide) ratio or *N. viridula* response layer, highlighting that the Layer-by-Layer functionality is an efficient technique.

Keywords: Semiochemicals, Graphene Oxide, Polyaniline, Frequency,

### INTRODUÇÃO

As plantas e os insetos têm como principal meio de comunicação com o seu ambiente a interações físico-químicas, e para isto

possuem sistemas de reconhecimento das moléculas químicas extremamente sensíveis e específicos, sem os quais não sobreviveriam. Estas substâncias químicas que agem na

comunicação entre organismos são conhecidas como semioquímicos, e quando agem na mesma espécie são denominados feromônios (Magalhães *et al.*, 2020). A utilização de semioquímicos como um método direto de controle de pragas ou para o monitoramento de populações pode contribuir para reduzir o uso indiscriminado de inseticidas.

Neste contexto, a utilização de feromônios sexuais têm se tornado uma alternativa relevante, uma vez que apresentam inúmeras vantagens que justificam sua funcionalidade: o feromônio é um composto natural, utilizado em quantidades diminutas (ordem de nanogramas), são biodegradáveis, isto é, não permanecem na natureza por longos períodos, apresentando alta especificidade não agindo sobre organismos não alvos de forma negativa, e pode ser usado para a detecção do inseto no campo (Brezolin, 2018).

Desta forma, nanossensores de cantilever podem ser utilizados para detecção de moléculas voláteis ou adsorção de moléculas com extrema sensibilidade, uma vez que 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 (Manzolini *et al.*, 2010, Steffens *et al.*, 2014, Brezolin *et al.*, 2020). Recentemente, foi mostrado a viabilidade de usar os sensores com PANI.Ag para detecção do feromônio sexual sintético do percevejo *Euschistus heros* em laboratório (Martinazzo *et al.*, 2022). Assim, a utilização de sensores na detecção de compostos voláteis e a busca por novos materiais a serem utilizados como camada ativa para identificação desses compostos, vem gerando interesse para detecção de insetos no campo.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de sensores nanoestruturados de cantileveres com diferentes camadas sensoras (polianilina, prata e óxido de grafeno) para detecção de semioquímicos, utilizando os compostos voláteis dos *cis* e *trans* epóxi-bisaboleno feromônio do percevejo *Nezara viridula* e o 2,6,10-trimetiltridecanoato de

etila, composto sintético análogo ao feromônio sexual do percevejo *Euschistus heros*, o 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados cantileveres de silício (Si) obtidos comercialmente (Budget Sensors®) com frequência de ressonância de  $13 \pm 4$  kHz e constante de mola (K) de  $0,2 \text{ N.m}^{-1}$ , comprimento de  $450 \mu\text{m}$ , largura de  $50 \mu\text{m}$  e espessura de  $2 \mu\text{m}$ , revestido com uma camada de  $30 \text{ nm}$  de alumínio sendo esta refletora, a fim de aumentar a visibilidade do sinal do laser, como mostra a Figura 1.

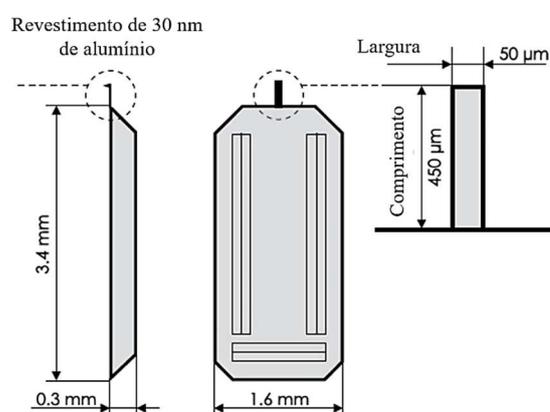


Figura 1: Imagem do cantilever de silício e suas dimensões.

Fonte: Adaptado de Budget Sensors® (2019).

### Preparo das camadas sensoras

Para servir como sensores, os cantileveres devem ser revestidos com uma camada sensora que seja altamente específica e capaz de reconhecer moléculas alvo.

**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 ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) 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 (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 de cantileveres**

A funcionalização foi realizada utilizando 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).

#### Técnica dip coating para PANI.Ag:

Inicialmente foi realizada a limpeza do cantilever em álcool isopropílico (Merck, Brasil, 99,5%) por 2 min em placa de Petri e seco em temperatura ambiente (25°C) por 30 min. Também em placa de Petri, o cantilever foi submerso em 100 µL da solução de PANI.Ag permanecendo em contato por 3 min. O corpo do cantilever foi coberto com fita Teflon® a fim de proteção para não alterar sua constante de mola. Em seguida, a solução de PANI.Ag foi retirada e inseridos 100 µL de HCl (pH 3) para lavagem durante 1 min. Após isso, a solução de HCl foi retirada e o cantilever foi seco durante 15 min a temperatura ambiente (25°C). Para armazenamento, o cantilever era colocado em dessecador em temperatura ambiente (25°C).

Técnica de automontagem LBL para PANI/OG: A deposição é alternada com polímeros de cargas opostas do poliânion (solução de OG) e polication (solução de Pani), em ambos os lados do cantilever (superfície superior e inferior) até a formação de sete bicamadas. As bicamadas de PANI/OG foram obtidas por meio da imersão do cantilever na solução de poliânion por 3 min, seguidas pela lavagem com HCl pH 3,0 por

1 min e secas por 15 min a temperatura de 25°C. Posteriormente o cantilever foi imerso em solução de polication por 3 min, novamente lavado por 1 min e seco por 15 min.

### Preparo das soluções dos compostos trimetiltridecanoato de etila e *cis* e *trans* epóxi-bisaboleno do *Nezara viridula*

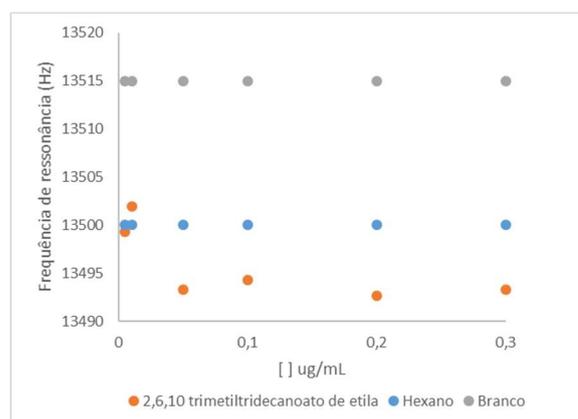
O composto 2,6,10-trimetiltridecanoato de etila, componente sintético análogo ao do feromônio sexual do *E. heros* (2,6,10-trimetiltridecanoato de metila) foi preparado em diferentes concentrações (0,005 – 0,01 – 0,05 – 0,1 – 0,2 – 0,3 µg/mL), sendo que as diluições foram realizadas com o solvente n-hexano (MERCK 99%) (PIRES *et al.*, 2006). Com relação ao feromônio *Nezara viridula* (concentração de 1,25mg/mL) obtido do próprio inseto e purificado em sílica gel para avaliação da resposta de frequência de ressonância foram preparadas diluições da solução mãe em hexano nas concentrações de 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 µg/mL em balões de vidro de 10 mL completando o volume com hexano.

Para avaliação da frequência de ressonância ( $f_{res}$ ) o cantilever foi inserido no suporte (canticlip), junto ao scanner do equipamento de Microscopia de força atômica (AFM-Nanosurf, C3000 Controller, Suíça). Primeiramente, foram realizadas medidas com ar sintético (White Martins 99%) por 2 min, tempo necessário para estabilização da frequência de ressonância. Os nanossensores também foram expostos ao n-hexano, solvente utilizado nas diluições dos compostos feromonais, com o intuito de avaliar se as respostas dos sensores poderiam estar sofrendo interferência do solvente. Posteriormente, uma alíquota de 20 µL de cada concentração do feromônio (da menor para maior concentração) sendo adicionada, com o auxílio de uma microseringa, depositada sobre um pedaço de papel filtro (Milipore 25 µm) que foi acoplado no fundo câmara.

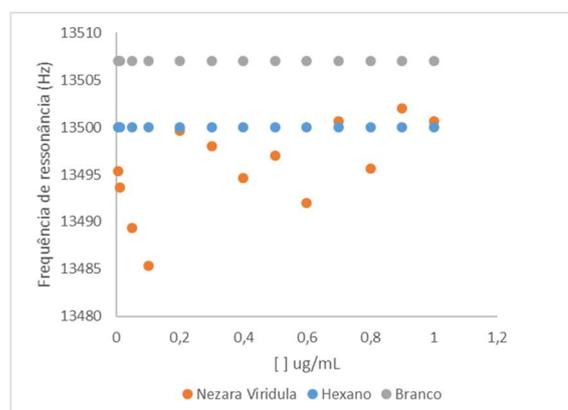
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A medida da frequência de ressonância (Hz) foi obtida no AFM, fazendo a varredura

de frequência de vibração das concentrações dos compostos voláteis 2,6,10 trimetiltridecanoato de etila e *cis* e *trans* epóxi-bisaboleno do *N. viridula*, ar sintético (branco) e o solvente hexano (para verificar se a interferência deste volátil na medida), utilizando as camadas sensoras PANI.Ag e PANI/OG, conforme apresentado nas Figuras 2 e 3.



(a)



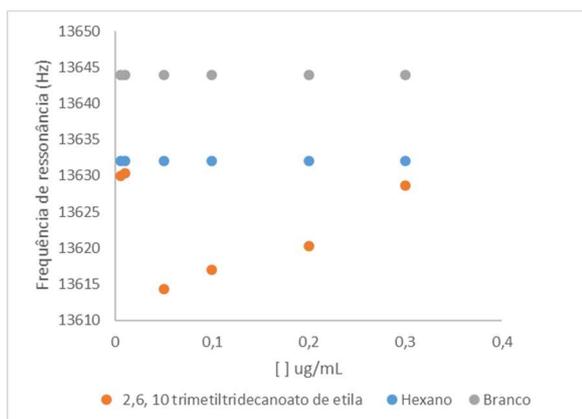
(b)

Figura 2: Resposta de  $f_{res}$  dos nanossensores de cantilever de PANI.Ag para os compostos 2,6,10 trimetiltridecanoato de etila (a) e *cis* e *trans* epóxi-bisaboleno do *N. viridula* (b).

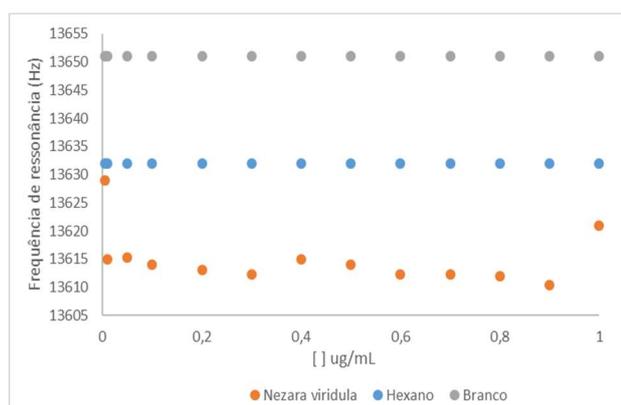
Conforme observado na Figura 2a o nanossensor de cantilever quando exposto ao ar sintético (branco) não apresentou variação na frequência de ressonância, mas em contato com o solvente hexano apresentou variação na frequência de ressonância. Com relação ao composto 2,6,10 trimetiltridecanoato de etila observou-se que houve diminuição da

frequência de ressonância com o aumento das concentrações.

De acordo com a Figura 2b os resultados sugerem que o nanossensor PANI.Ag não pode detectar o feromônio *cis* e *trans* epóxi-bisaboleno do *N. viridula* quantitativamente, pois a medida de frequência ficou próxima a do solvente hexano.



(a)



(b)

Figura 3: Resposta de  $f_{res}$  dos nanossensores de cantilever de PANI/OG para os compostos 2,6,10 trimetiltridecanoato de etila (a) *cis* e *trans* epóxi-bisaboleno do *N. viridula* (b).

Para o 2,6,10 trimetiltridecanoato de etila o nanossensor de cantilever PANI.OG quando exposto ao ar sintético (branco) não apresentou variação na frequência de ressonância, mas com relação ao solvente hexano apresentou variação na frequência de ressonância. Observou-se que não houve diminuição da frequência de ressonância com o aumento das concentrações do composto,

sendo os valores próximos ao do solvente hexano, conforme mostra a Figura 3a

O nanossensor de cantilever PANI/OG quando exposto ao ar sintético (branco) não apresentou variação na frequência de ressonância como mostra a Figura 3b. Por outro lado, o nanossensor de cantilever quando exposto ao solvente hexano apresentou variação na frequência de ressonância. Foi possível observar a redução da resposta  $f_{res}$  do nanossensor de cantilever nas concentrações de feromônio 0,01 – 0,05 – 0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,4 – 0,5 – 0,6 – 0,7 – 0,8 – 0,9 µg/mL. Esses resultados sugerem que o nanossensor pode detectar o feromônio quantitativamente, porém nas concentrações de 0,005 e 1,0 µg/mL a medida de frequência ficou próxima as do solvente hexano, esse fato deve-se a menor concentração estar abaixo do limite de detecção e a mais alta é devido a saturação. Através da medida da frequência de ressonância obtida no AFM, fazendo a varredura de frequência de vibração das concentrações do composto volátil *cis* e *trans* epóxi-bisaboleno do *N. viridula* e do ar sintético (branco), observou-se que houve redução da resposta  $f_{res}$  do composto.

## CONCLUSÃO

O nanossensor PANI.Ag apresentou resposta apenas para o composto 2,6,10 trimetiltridecanoato de etila. Para o feromônio do *N. viridula*, os compostos *cis* e *trans* epóxi-bisaboleno, a camada sensora de PANI/OG mostrou uma mudança na frequência de ressonância em relação ao controle constante de 15 Hz. Desta forma ressalta-se a importância de avaliar as camadas sensoras para garantir a sensibilidade e seletividade em um único dispositivo, sendo assim a escolha da camada sensível fundamental.

## NOMENCLATURA

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

Ag- Prata

AgNO<sub>3</sub>. Nitrato de prata

DMAc - N,N-dimetilacetamida  
 F<sub>res</sub> - Frequência de ressonância  
 HCl - Ácido Clorídrico  
 HNO<sub>3</sub> - Ácido Nítrico  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio  
 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido sulfúrico  
 LbL - Layer by Layer  
 K- constante de mola  
 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. (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.
- BUDGET SENSORS. AFM probe Model: ContAl-G. Disponível em: <[http://www.budgetsensors.com/downloads/ContAl-G\\_Datasheet.pdf](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.
- 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.
- 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.
- 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, 113804.
- 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.