UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO CÂMPUS DE ERECHIM DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALEXANDRA NAVA BREZOLIN

DESENVOLVIMENTO DE SENSOR NANOESTRUTURADO DE CANTILEVER PARA DETECÇÃO DO FEROMÔNIO SEXUAL DO PERCEVEJO MARROM

(Euschistus heros F.)

ERECHIM, RS 2018

ALEXANDRA NAVA BREZOLIN

DESENVOLVIMENTO DE SENSOR NANOESTRUTURADO DE CANTILEVER PARA DETECÇÃO DO FEROMÔNIO SEXUAL DO PERCEVEJO MARROM

(Euschistus heros F.)

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim.

Orientadora: Dra. Juliana Steffens Orientadora: Dr. Clarice Steffens

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, Autor da minha vida, por me dar oportunidade de iniciar o doutorado e me manter firme, feliz e determinada em todos os momentos.

A minha família - pais, irmãos, sogros, e a todos que torcem por mim. Obrigada pelo carinho, apoio e incentivo constantes, pelos exemplos de persistência e dedicação, por estarem sempre por perto apoiando minhas decisões e comemorando minhas pequenas conquistas.

Ao meu amor, Thiago Brezolin, principalmente pelo companheirismo e incentivo. Obrigada por entender que me realizo lendo, escrevendo e estudando, por me incentivar sempre, pelos chás, cafezinhos, por cuidar da casa e dos nossos peques! Mil vezes obrigada! Amo você!

Gabriel e Júlia! Os melhores filhos do mundo! Mesmo sem saberem (ou sabendo) me incentivaram dia a dia, aquele sorriso, abraço, carinho me fazem levantar e seguir com fé! Amo vocês!

Aos amigos! Com o passar dos anos descobri que as coisas mais importantes que conquistamos na vida são os amigos... e posso dizer que sou privilegiada, tenho os melhores amigos do mundo! Obrigada pelo incentivo, ajuda e carinho.

As minhas colegas de trabalho. Obrigada pelos "quebra-galhos", pela amizade e carinho.

Aos amigos que o doutorado me presenteou, Dani, Glaci, Mari, Aline, Alana, Ane.... Obrigada pelas horas de estudo, mas principalmente pela amizade e companheirismo que tenho certeza, serão eternos.

Aos colegas e funcionários dos Laboratórios, principalmente a Sandi. Agradeço pelo acolhimento, pelo incentivo e também pelos momentos de descontração.

A minha amiga e nutri preferida, Janine! Sem você não teria conseguido! Obrigada pelas horas de conversas e risadas, choros e pinturas de cabelo...a vida se encarrega de colocar as pessoas certas no nosso caminho!!!

A professora Silvane Roman, minha eterna orientadora e incentivadora! Obrigada pela amizade, pela disponibilidade e pelo auxílio nas imagens dos sensores.

Ao Jasan, obrigada pelas análises de DRX e pelas horas no laboratório, no AFM;

Ao professor Flávio Makoto, por disponibilizar o grafeno para nossos testes e auxiliar em todas etapas do projeto, ao professor Sergio Mortari por disponibilizar os MWNTs, a Elsa Materon por realizar as análises de ângulo de contato, ao professor Claudio pelo auxilio no desenvolvimento no sistema de resfriamento do AFM e ao Carlos, pelo auxilio no AFM. A vida não tem sentido sem as parcerias e amizades que vamos construindo durante a vida. Obrigada pela disponibilidade e incentivo. Ao professor Rogério Dallago pelo auxilio nos cálculos e a Alexandra Manzoli pela disponibilidade e auxílio na realização dos experimentos, imagens e pelos momentos de descontração, conselhos e amizade. Obrigada pela disponibilidade e pelo grande auxílio no trabalho.

A EMBRAPA, principalmente a Maria Carolina, que mesmo sem conhecer pessoalmente, foi fundamental para realização deste trabalho, colaborando com os compostos utilizados, ideias e sugestões. Esse auxilio foi fundamental para realização destes experimentos.

A todos os professores do doutorado pelos ensinamentos transmitidos e amizade;

As minhas orientadoras (e amigas), Clarice e Juliana, sincero agradecimento não apenas as orientações, mas a presença humana e cientifica. Agradeço pelo incentivo e ensinamentos!

Á coordenação pelo auxilio e incentivo durante esta etapa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI – Erechim, pela estrutura ofertada e por possibilitar a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos os professores, colegas, funcionários, pessoal da Central de Materiais e Embrapa Instrumentação de São Carlos-SP que colaboraram diretamente ou indiretamente neste trabalho.

À banca avaliadora, por fazerem parte da mesma.

Muito Obrigada!

Não existe cedo ou tarde, não existe tempo certo ou errado. As coisas acontecem quando tem que acontecer, cada uma no seu tempo e nada por acaso!

RESUMO

Apesar de toda tecnologia já desenvolvida na agricultura, ainda ocorrem muitas perdas, e na cultura da soja, entre as causas de perdas cita-se a presença de insetos-praga, como o percevejo marrom -Euschistus heros, despertando interesse por novas metodologias, como a utilização de feromônios. Sendo assim, o objetivo desse estudo é desenvolver um sensor nanoestruturado de cantilever utilizando diferentes camadas ativas (Polianilina, Nanotubos de Carbono e Grafeno) para detecção de 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, principal componente do feromônio sexual do percevejo marrom Euschistus heros. Além da caracterização das camadas ativas e dos sensores funcionalizados por espectroscopia de infravermelho de reflexão e absorção de modulação por polarização (PM-IRRAS), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia óptica, microscopia de força atômica (AFM), espectroscopia no ultravioleta - visível (UV-Vis) e difratometria de raio-X (DRX), foi avaliado a resposta dos sensores em relação a frequência de ressonância, sensitividade, limite de detecção, repetibilidade, reversibilidade, tempo de resposta, histerese e durabilidade frente ao feromônio sintético e também em experimento in vivo. Os resultados obtidos mostram que a funcionalização dos sensores por LbL foi eficiente, evidenciado pela redução da frequência de ressonância a cada bicamada depositada, e pelas imagens de morfologia e rugosidade que demostram um aumento da rugosidade a cada bicamada depositada. Todos os sensores conseguiram detectar o feromônio sintético em diferentes concentrações, obtendo-se um limite de detecção de 1,44 fg/mL, 2,18 fg/mL e 0,91 fg/mL para as camadas sensoras de polianilina/poli (estireno sulfonato de sódio) (Pani/PSS), polianilina/nanotubos de carbono de paredes múltiplas (Pani/MWNT) e polianilina/óxido de grafeno (Pani/OG), respectivamente. Os sensores nanoestruturados também apresentaram baixa histerese (máximo de 0,03%) com estabilidade na resposta (durabilidade) após 30 dias de armazenamento com limite de detecção e sensitividade na ordem de fentograma. Os sensores nanoestruturados de Pani/PSS e Pani/OG apresentam repetibilidade por 8 ciclos e reversibilidade superior a 90%, com tempo de resposta de 12,6 s e 37,8 s, respectivamente, enquanto o sensor de Pani/MWNT apresentou repetibilidade por 2 ciclos e reversibilidade de 80%, com tempo de resposta de 50,4 s. Nos experimentos in vivo, realizado com 39 percevejos, todos os sensores responderam aos voláteis presentes no recipiente do confinamento. Essas características permitem concluir que os sensores nanoestruturados desenvolvidos foram eficazes para detecção do feromônio sintético e aos liberados naturalmente por percevejos E. heros

Palavras-chave: Polianilina. Nanotubos de Carbono. Grafeno. Fentograma. Sensores.

ABSTRACT

Even with all the technology developed in the last decades in agriculture, around 40% of the total production is lost each year. In the soy bean crop, the causes of losses include the presence of pest insects, such as the brown bug - Euschistus heros, arousing interest in new methodologies, such as the use of pheromones. Thus, the objective of this study is to develop a nanostructured cantilever sensor for use in AFM (Atomic Force Microscopy) using different active layers (Polyaniline, Carbon Nanotubes and Graphene) deposited by the Layer by Layer technique to detect 2,6,10 methyltrimethyltridecanoate, the main component of the sexual pheromone of the brown stink bug - Euschistus heros. In addition to the characterization of active layers and sensors functionalized by infrared spectroscopy of reflection and absorption of polarization modulation (PM-IRRAS), scanning electron microscopy (MEV), optical microscopy, atomic force microscopy (AFM), Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis) and X-ray diffractometry (XRD), the response of the sensors was evaluated in terms of resonance frequency, sensitivity, detection limit, repeatability, reversibility, response time, hysteresis and durability against synthetic pheromone and also in vivo experiment. The results obtained so far show that the functionalization of the sensors by LbL was efficient, evidenced by the reduction of the resonance frequency to each deposited bilayer, as well as by the morphology and roughness images performed in the AFM, which show an increase in roughness to each bilayer Deposited. All sensors were able to detect the synthetic pheromone in different concentrations, obtaining a detection limit of 1.44 fg/mL, 2.18 fg/mL and 0.91 fg/mL, for the Pani/PSS, Pani /MWNT and Pani/OG, respectively. The sensors also presented low hysteresis, maximum of 0.03%, and the durability evaluation showed that even after 30 days of storage the sensors still had a limit of detection and sensitivity in the order of femtogram. Pani/PSS and Pani / OG sensors presented repeatability over 8 cycles and reversibility over 90%, with a response time of 12.6s and 37.8s, respectively, while the Pani/MWNT sensor showed repeatability for 2 cycles and Reversibility of 80%, with response time of 50.4s. In the in vivo experiments, performed with 39 bugs, all the sensors responded to the volatiles present in the containment vessel. These characteristics allow to conclude that the sensors developed were effective for detecting the synthetic pheromone and those released naturally by E. heros.

Keywords: Polyaniline. Carbon Nanotube. Graphene. Femtogram. Sensors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Percevejo marrom, <i>E heros</i> , principal praga da soja
Figura 2 - Classificação geral dos semioquímicos de insetos
Figura 3 - Estrutura química do éster (2S, 6R, 10S) -trimetiltridecanoato de metila, principa
componente do feromônio de percevejo marrom, <i>E. heros</i>
Figura 4 - Esquema do funcionamento de um AFM
Figura 5 - Principais modos de operação dos sensores de microcantileveres. (a) modo estático que
explora as mudanças de deflexão. (b) modo dinâmico que explora as mudanças de massa 36
Figura 6 - Esquema do mecanismo de detecção utilizando cantileveres no AFM, modo dinâmico
evidenciando a redução da frequência de ressonância quando ocorre uma deposição de analitos no
sensor
Figura 7 - Desenho esquemático da interação específica entre a camada sensitiva depositada sobre
o cantilever e o analito de interesse
Figura 8 - Representação esquemática do processo de deposição do filme utilizando a técnica LbL
Os passos A e C representam a adsorção de um poliânion e de um policátion, respectivamente, e
os passos B e D são as soluções de lavagem
Figura 9 - Representação esquemática das principais formas de NTCs: (A) NCPS e (B) MWNT
Figura 10 - Estrutura básica do grafeno
Figura 11 - Esquema geral da reação de esfoliação química do grafite bulk para obtenção do
grafeno
Figura 12 - Representação esquemática da deposição dos filmes de Pani/PSS por meio da técnica
de LbL
Figura 13 - Diagrama esquemático (a) e imagem real (b) da câmara desenvolvida para detecção
dos voláteis com suas medidas
Figura 14 - Sistema de resfriamento do equipamento de microscopia de força atômica desenvolvido
para controle de temperatura e minimização de ruídos68
Figura 15 - Difratograma de raios X da Pani dopada com HCl obtida por síntese interfacial 72
Figura 16 - Espectro de absorção (200 a 600 nm) no UV-Vis do filme de Pani/PSS a cada bicamada
formada (a) e crescimento das bicamadas de Pani/PSS em 241 nm (b)

Figura 17 - Espectros de PM-IRRAS dos filmes desenvolvidos com Pani/PSS sobre superfícies de
silício
Figura 18 - Micrografia dos filme de Pani/PSS sob superfície de silício, com aumento na escala de
5000 vezes
Figura 19 - Frequência de ressonância a cada bicamada de Pani/PSS depositada sobre os
cantileveres
Figura 20 - Imagens de AFM em 3D dos filmes de Pani/PSS obtidos com as técnicas LbL após a
1ª bicamada, 3ª bicamada, 5ª bicamada e 7ª bicamada
Figura 21 - Perfil do ângulo de contato nos ensaios de molhabilidade, realizados com água, dos
filmes de Pani/PSS
Figura 22 - Imagens de microscopia óptica das superfícies dos cantileveres funcionalizados com
Pani/PSS e não funcionalizados (branco) (Imagens com aumento de 100X) 80
Figura 23 - Teste preliminar para avaliar a resposta dos sensores de Pani/PSS frente ao composto
feromonal 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila
Figura 24 - Resposta do sensor com funcionalização de Pani/PSS e sem funcionalização (branco)
ao composto 2,6,10 trimetiltridecanoato de metila
Figura 25 - Resposta do sensor com funcionalização de Pani/PSS ao ar e ao hexano
Figura 26 - Avaliação da histerese dos sensores de Pani/PSS
Figura 27- Avaliação da resposta do sensor de Pani/PSS durante 30 dias de armazenamento 84
Figura 28 - Tempo de resposta dos sensores de Pani/ PSS
Figura 29 - Repetibilidade dos sensores nanoestruturados de Pani/PSS
Figura 30 - Avaliação de interferentes na resposta dos sensores de Pani/PSS
Figura 31 - Espectro de UV-Vis da dispersão em meio aquoso dos MWNT
Figura 32 - Difratograma de raios X dos MWNT após funcionalização ácida
Figura 33 - Espectros de absorção no UV-Vis do filme de Pani/MWNT a cada bicamada formada
(a) e crescimento das bicamadas de Pani/MWNT em 260nm (b) 100
Figura 34 - Frequência de ressonância e massa do cantilever a cada bicamada de Pani/MWNT
depositada sobre os microcantileveres 101
Figura 35 - Imagens de AFM em 3D dos filmes de Pani/MWNT obtidos com as técnicas LbL após
a 1ª bicamada, 3ª bicamada, 5ª bicamada e 7ª bicamada102

Figura 36 - Perfil do ângulo de contato nos ensaios de molhabilidade, realizados com água, dos
filmes de Pani/MWNT 103
Figura 37 - Valor do ângulo de contato do substrato de silício funcionalizado com Pani/MWNT e
não funcionalizado 104
Figura 38 - Micrografias das amostras de filmes de Pani/MWNT sobre superfícies de silício. 104
Figura 39 - Resposta do sensor funcionalizado de Pani//MWNT ao composto 2,6,10
trimetiltridecanoato de metila e do não funcionalizado (Branco) frente ao composto feromonal.
Figura 40 - Resposta do sensor funcionalizado de Pani//MWNT ao ar e ao hexano 106
Figura 41 - Avaliação da histerese dos sensores de Pani/MWNT 108
Figura 42 - Durabilidade dos sensores de Pani/MWNT 108
Figura 43 - Tempo de resposta dos sensores de Pani/ MWNT 109
Figura 44 - Repetibilidade dos sensores de Pani/MWNT durante 8 ciclos 109
Figura 45 - Avaliação de interferentes na resposta dos sensores de Pani/MWNT 110
Figura 46 - Espectro de PM-IRRAS dos filmes de Pani/OG desenvolvidos sobre a superficie de
silício
Figura 47 - Micrografias das amostras de filmes de Pani/OG sob superfície de silício, com aumento
de 5000 vezes
Figura 48 - Imagens de microscopia óptica das superfícies dos cantileveres funcionalizados com
PANI/OG e não funcionalizados (silício) (Imagens com aumento de 100X) 123
Figura 49 - Valor do ângulo de contato do substrato de silício funcionalizado com Pani/OG e não
funcionalizado 123
Figura 50 - Resposta do sensor funcionalizado de Pani/OG ao composto 2,6,10 trimetiltridecanoato
de metila e do não funcionalizado (Branco) frente ao composto feromonal 124
Figura 51 - Resposta do sensor funcionalizado de Pani/OG ao composto 2,6,10 trimetiltridecanoato
de metila, ao ar e ao hexano e do não funcionalizado (Branco) frente ao composto feromonal. 125
Figura 52 - Avaliação da histerese dos sensores Pani/OG 126
Figura 53 - Avaliação da resposta do sensor de Pani/OG durante 30 dias 127
Figura 54 - Tempo de resposta dos sensores de Pani/ OG 127
Figura 55 - Reversibilidade dos sensores de Pani/OG ao feromônio 128
Figura 56 - Avaliação de interferentes na resposta dos sensores de Pani/OG 129

Figura 57 - Percevejo marrom, E. heros, selecionados para o experimento in vivo 134
Figura 58 - (a) Experimento in vivo, com 39 percevejos Euschistus heros (fêmeas e machos),
vagens de soja, amendoim, água (seta preta) e sensor de umidade e temperatura (seta vermelha),
(b) detalhe dos percevejos
Figura 59 - Coleta dos voláteis presentes no ambiente de confinamento com o auxílio de uma
seringa de 10 mL
Figura 60 - Experimento in vivo. (a) detalhe do scanner piezoelétrico do AFM. (b) sensor fixado
no canticlipe e acoplado ao AFM. (c) câmara para injeção dos voláteis para avaliação da frequência
de ressonância. (d, e, f) Acoplamento da câmara com o scanner do AFM. (g) seringa acoplada a
mangueira para carrear os voláteis até a câmara
Figura 61 - Resposta do sensor de Pani/PSS (a) Pani/MWNT (b) e Pani/OG (c) em experimento in
<i>vivo</i>
Figura 62 - Frequência de ressonância inicial e final dos sensores de Pani/PSS, Pani/MWNT e
Pani/OG expostos a concentração de 0,005 µg/mL do feromônio sintético
Figura 63 - Resposta do sensor de Pani/PSS (a) Pani/MWNT (b) e Pani/OG (c) em experimento.
Figura 64 - Esquema do experimento in vivo. Simulação das condições ambientais do H. heros,
com presença de alimentos (vagem de soja e amendoim) e água, temperatura e umidade
controladas, com o objetivo de avaliar a eficiência dos diferentes sensores
Figura 65 - Gráficos de PCA (a) dos sensores nanoestruturados aos voláteis coletados na câmara
sem e com a presença de insetos durante 7 dias

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração do composto feromonal, 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, no
interior da câmara, para cada concentração inserida67
Tabela 2 - Valores de constante de mola (k) e variação de massa para as etapas de construção
do sensor de cantilever com Pani/PSS76
Tabela 3 - A raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) dos filmes LbL de Pani/PSS78
Tabela 4 - Resposta de sensitividade e limite de detecção dos sensores nanoestruturados de
Pani/PSS durante a estocagem
Tabela 5 - Valores da frequência de ressonância (fres), constante de mola (k) e variação de
massa para as etapas de construção do sensor de microcantilever com e Pani/OG122

LISTA DE ABREVIATURAS

- AFM Microscopia de força atômica (do inglês, Atomic Force Microscope)
- CC Corrente contínua
- CG Cromatografia Gasosa
- DMAc n, n-dimetilacetamida
- DRX Difratograma de raios X
- EAG Eletroantenografia
- MEV Microscopia eletrônica de varredura
- Fg Fentograma
- HCl Ácido Clorídrico
- HNO3 Ácido Nítrico
- H₂O₂ Peróxido de hidrogênio
- H₂SO₄ Ácido sulfúrico
- HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry
- K Constante de mola
- LbL Layer by Layer
- LD Limite de detecção
- Nm Nanômetro
- MCQ Microbalança de cristal de quartzo
- MEMs Microeletromecânico
- MIP Manejo integrada de pragas
- MWNT Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas (do inglês, Multi Walled Carbon
- Nanotubes)
- MWNT_COOH Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas Carboxilados
- NTC Nanotubos de Carbono
- OG Óxido de Grafeno
- PM-IRRAS Espectroscopia de infravermelho de reflexão e absorção de modulação por polarização (do inglês, *Polarization-Modulated Infrared Reflection Absorption Spectroscopy*)
- Pani Polianilina
- PPM Partes por milhão
- PPB Partes por bilhão
- Ppt Partes por trilhão

Ppq - Partes por quadrilhão

PSS - Poli (estireno sulfonato de sódio)

SOA - sensor de onda acústica

SPME - Microextração em fase sólida

UV-Vis - Espectroscopia no Ultravioleta - Visível

Rms - Desvio médio quadrático da altura

 λ - Comprimento de onda

SUMÁRIO

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO19
1.1 INTRODUÇÃO GERAL
1.2 OBJETIVOS
1.2.1 Objetivo geral
1.2.2 Objetivos específicos
1.3 REFERÊNCIAS
CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
2.1 PRAGAS DA SOJA
2.2 FEROMÔNIOS DE INSETOS
2.2.1 Moléculas feromonais
2.2.2 Moléculas feromonais dos pentalmídeos e sua aplicação na agricultura29
2.3 SENSORES PARA DETECÇÃO DE MOLÉCULAS QUÍMICAS
2.3.1 Sensores de cantileveres
2.3.2 Funcionalização da superfície dos sensores nanoestruturados de cantileveres40
2.3.2.1 Polímeros Condutores
2.3.2.2 Nanotubos de Carbono
2.3.2.3 Grafeno
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS
2.5 REFERÊNCIAS
CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DE SENSOR DE PANI/PSS PARA DETECÇÃO DO
FEROMÔMIO SEXUAL DO PERCEVEJO MARROM
3.1 INTRODUÇÃO
3.2 MATERIAL E MÉTODOS61
3.2.1 Cantileveres
3.2.2 Síntese Interfacial da Pani
3.2.3 Preparo da solução de Pani
3.2.4 Preparo da solução de PSS62
3.2.5 Funcionalização das superfícies dos cantileveres
3.2.6 Caracterização dos filmes depositados sobre os cantileveres

3.2.7 Avaliação dos sensores nanoestruturados de cantilever	5
3.2.7.1 Caracterização da resposta dos sensores frente ao composto 2,6,10	-
trimetiltridecanoato de metila69)
3.2.7.2 Avaliação de interferentes na resposta dos sensores nanoestruturados71	L
3.2.7.3 Análise Estatística71	L
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO71	L
3.3.1 Caracterização da Pani71	L
3.3.2 Caracterização dos filmes de Pani/PSS72	2
3.3.3 Resposta dos sensores funcionalizados com Pani/PSS ao composto feromonal 2,6,10	-
trimetiltridecanoato de metila80)
3.4 CONCLUSÕES	7
3.5 REFERÊNCIAS	3
CAPÍTULO IV	3
DETECÇÃO DE FEROMÔNIO SEXUAL DO E. heros UTILIZANDO SENSOR	ł
NANOESTRUTURADO FUNCIONALIZADO COM MWNT/PANI93	3
4.1 INTRODUÇÃO94	ŀ
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	ŀ
4.2.1 Desenvolvimento das camadas sensitivas	ļ
4.2.2 Funcionalização das superfícies dos cantileveres95	5
4.2.3 Caracterização dos filmes Pani/MWNT95	5
4.2.4 Avaliação dos sensores nanoestruturados de cantilever	5
4.2.4.1 Preparação das soluções do composto feromonal 2,6,10-trimetiltridecanoato de	9
metila96	5
4.2.4.2 Medida de frequência de ressonância em microscópio de força atômica (AFM).96	5
4.2.4.3 Caracterização da resposta dos sensores de Pani/MWNT ao feromônio97	7
4.2.4.4 Avaliação de interferentes na resposta dos sensores nanoestruturados97	7
4.2.4.5 Análise Estatística	7
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO98	3
4.3.1 Caracterização dos filmes	3
4.3.2 Caracterização dos filmes de Pani/MWNT)
4.3.3 Resposta dos sensores nanoestruturados funcionalizados com Pani/MWNT ao feromônio)
	5
4.3.4 Avaliação de interferentes na resposta do sensor110)
4.4 CONCLUSÕES111	L

4.5 REFERÊNCIAS11	2
CAPÍTULO V	4
DETECÇÃO DE FEROMÔNIO DE PERCEVEJO COM SENSORES D	E
CANTILEVER FUNCIONALIZADOS COM PANI/OG11	4
5.1 INTRODUÇÃO11	5
5.2 MATERIAL E MÉTODOS11	6
5.2.1 Cantileveres	6
5.2.2 Desenvolvimento das camadas sensitivas	6
5.2.2.1 Preparo da solução de OG para formação dos filmes LbL11	6
5.2.2.2 Preparo da solução de Pani para formação dos filmes LbL11	7
5.2.2.3 Funcionalização das superfícies dos cantileveres11	7
5.2.3 Caracterização dos filmes11	8
5.2.3.1 Espectroscopia de Infravermelho de Reflexão e Absorção de Modulação po	r
Polarização (PM-IRRAS)11	8
5.2.3.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)11	8
5.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e por emissão de campo (MEV)11	8
5.2.3.4 Microscopia Óptica11	8
5.2.3.5 Ângulo de Contato11	8
5.2.4 Avaliação dos sensores nanoestruturados de cantilever11	8
5.2.4.1 Câmara para detecção dos feromônios e interferentes11	8
5.2.4.2 Preparação das soluções do composto feromonal 2,6,10-trimetiltridecanoato d	le
metila11	9
5.2.4.3 Medida de frequência de ressonância em microscópio de força atômica (AFM	[)
	9
5.2.4.4 Caracterização da resposta dos sensores frente ao composto 2,6,10)-
trimetiltridecanoato de metila11	9
5.2.4.5 Avaliação de interferentes12	0
5.2.4.6 Análise Estatística12	0
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO12	0
5.3.1 PM-IRRAS	0
5.3.2 MEV	1
5.3.3 Microscopia de Força Atômica12	2
5.3.3.1 Avaliação da deposição das bicamadas de Pani/OG12	2
5.3.4 Microscopia Óptica	2

5.3.5 Ângulo de Contato	123
5.3.6 Resposta dos sensores funcionalizados com Pani/OG frente ao composto fere	omonal
2,6,10-trimetiltridecanoato de metila	124
5.3.7 Interferentes	128
5.4 CONCLUSÕES	129
5.5 REFERÊNCIAS	130
CAPÍTULO VI	132
EXPERIMENTO in vivo PARA DETECÇÃO DE COMPOSTOS FEROMO	ONAIS
LIBERADOS PELO PERCEVEJO E. Heros POR SENS	ORES
NANOESTRUTURADOS DE CANTILEVERES	132
6.1 INTRODUÇÃO	133
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	134
6.2.1 Ambiente de teste com percevejo marrom Euschistus heros	134
6.2.1.4 Resposta dos sensores nanoestruturados in vivo	135
6.2.1.5 Analise de componentes principais (PCA)	138
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	138
6.3.1 Experimento in vivo	138
6.3.2 Análise de PCA	143
6.4. CONCLUSÃO	144
6.5 REFERÊNCIAS	145
CAPÍTULO VII	146
CONSIDERAÇÕES FINAIS	146
7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	147
7.2 TRABALHOS FUTUROS	148
CAPÍTULO VIII	149
PRODUÇÃO CIENTÍFICA	149
8.1 PRODUÇÃO CIENTÍFICA	150



CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Esta tese está organizada em 8 capítulos. O **Capítulo I** apresenta uma introdução geral sobre feromônios e sua aplicação na agricultura, bem como a possibilidade do desenvolvimento de sensores para detecção de voláteis, também neste os objetivos gerais e específicos. Na sequência, o **Capítulo II** apresenta os aspectos teóricos que fundamentam esta tese.

Os resultados desta pesquisa, obtidos estão divididos em 04 capítulos, estes tratam, de forma independente, cada um dos sensores desenvolvidos e os resultados do experimento *in vivo*. Desta forma, os estudos experimentais apresentados nos **Capítulos III, IV, V e VI** foram estruturados com uma breve introdução, metodologia utilizada, apresentação e discussão dos resultados, as conclusões e, por fim, as referências utilizadas. No **Capítulo VII**, é apresentada uma conclusão geral da tese e no **Capítulo VIII** são apresentados os trabalhos científicos gerados no decorrer do doutorado.

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

Os insetos exercem suas relações ecológicas com o ambiente e com os outros organismos de várias maneiras, sendo uma das mais importantes a comunicação por meio de compostos químicos, como os feromônios. Estes compostos agem como gatilhos fisiológicos de reações comportamentais específicas e é através da detecção e emissão destes compostos que os insetos encontram parceiros para o acasalamento, alimento ou presa, escolhem local de oviposição, se defendem contra predadores e organizam suas comunidades.

Na agricultura os feromônios podem ser utilizados como ferramenta para o controle de insetos-praga, auxiliando na estimativa dos níveis populacionais dos insetos por meio de amostragens no campo, permitindo assim, a tomada de decisões com base em informações seguras.

Neste contexto, têm se buscado novas formas de realizar esse monitoramento, e uma delas é a utilização de feromônios sexuais, uma vez que apresentam inúmeras vantagens que justificam sua utilização: o feromônio é um composto natural, no geral, utilizado em quantidades diminutas (ordem de nanogramas), são moléculas que não permanecem na natureza por longos períodos, apresentam alta especificidade não agindo sobre organismos não alvos de forma negativa, e permitem a rápida detecção do inseto no campo, o que fornece uma ferramenta precisa para a tomada de decisões.

Com o advento dos sistemas de detecção utilizando sensores e as buscas por novos materiais para serem utilizados como camada ativa para detecção desses compostos, novas

alternativas, como o desenvolvimento de sensores de cantileveres, vem gerando interesse para detecção de insetos no campo.

Os sensores de cantileveres podem ser utilizados para detecção compostos voláteis liberados por insetos no campo com extrema sensitividade, uma vez que possuem 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 (STEFFENS et al., 2014; SHOAIB et al., 2016).

A utilização dos cantileveres para detecção de fenômenos físico-químicos depende, em grande parte, da sua funcionalização. O uso de polímeros condutores, como a polianilina (Pani), é promissor devido à capacidade de detectar uma variedade de diferentes moléculas, pela fácil polimerização e baixo custo. A possibilidade de desenvolver nanocompósitos também é atrativa, uma vez que a associação de camadas sensitivas de polímeros com outros componentes, como nanotubos de carbono (NTC) e grafeno, pode potencializar sua resposta.

Esses sensores apresentam várias vantagens sobre outras tecnologias de sensores, incluindo o rápido tempo de resposta, a possibilidade de desenvolver arranjos de sensores com pequenas dimensões, a capacidade de explorar microambientes e detectar diminutas quantidades de analitos com elevado grau de sensitividade.

Tendo em vista a importância dos insetos-praga na cultura da soja, como o percevejo marrom *E. heros*, o desenvolvimento de novas tecnologias para detecção rápida e precisa desses insetos se faz importante. E sabendo que para a detecção de compostos feromonais difundidos em meio gasoso em pequenas porções, é necessária a utilização de um sensor altamente sensível, uma alternativa interessante seria o desenvolvimento de sensores nanoestruturados de cantileveres.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver sensores nanoestruturados de cantileveres com diferentes camadas sensoras (polianilina, nanotubos de carbono e óxido de grafeno) para detecção de semioquímicos, utilizando como modelo o principal composto (2,6,10-trimetiltridecanoato de metila) do feromônio sexual do percevejo marrom, *E. heros*.

Os objetivos específicos serão divididos em dois tópicos A e B, descritos abaixo:

A. Em relação à camada sensitiva do sensor:

a) Avaliar a resposta do sensor com diferentes camadas sensoras, utilizando a Pani,
de forma isolada ou associada a derivados de carbono, como os nanotubos de carbono de
paredes múltiplas (MWNT) e o óxido de grafeno (OG);

b) Obter a Pani por síntese interfacial e caracterizar o polímero obtido por meio das técnicas de espectroscopia no ultravioleta – visível (UV-Vis) e difratometria de raio-X (DRX);

c) Funcionalizar os MWNT, realizar a retirada de impurezas e caracteriza-los pelas técnicas de UV-Vis e DRX;

d) Realizar a deposição das camadas sensoras pela técnica de *Layer by Layer* (LbL), com Pani/Poli(estireno) sulfonato de sódio (PSS), Pani/MWNT e Pani/OG e avaliar a eficiência da funcionalização pelas análises de rugosidade, morfologia, frequência de ressonância e espectroscopia de UV-Vis.

B. Sensores Nanoestruturados de Cantilever

a) Avaliar a resposta dos sensores funcionalizados (Pani/PSS, Pani/MWNT e Pani/OG) e não funcionalizados (Branco), em relação à frequência de ressonância, frente a diferentes concentrações do composto sintético, 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, principal componente do feromônio sexual do *E. heros;*

b) Caracterizar a superfície dos sensores, antes e após a deposição das camadas sensoras em relação a morfologia (microscopia eletrônica de varredura - MEV), a composição química e orientação das moléculas (Espectroscopia de infravermelho de reflexão e absorção de modulação por polarização, PM-IRRAS), as alterações na superfície (microscopia óptica), a morfologia, rugosidade, espessura e deposição dos filmes (AFM) e a molhabilidade do filme (ângulo de contato);

c) Caracterizar as respostas dos sensores quanto ao tempo de resposta, histerese, sensitividade, limite de detecção, durabilidade, reversibilidade e repetibilidade;

d) Investigar a ação de outros compostos produzidos pelos percevejos e avaliar a interferência nas respostas dos sensores;

e) Coletar e confinar os insetos, *E. heros*, e avaliar a resposta dos sensores frente aos feromônios liberados e comparar com a resposta dos sensores expostos ao componente feromonal sintético.

1.3 REFERÊNCIAS

SHOAIB, M.; HISHAM, N.; BASHEER, N.; TARIQ, M. Frequency and displacement analysis of electrostatic cantilever-based MEMS sensor. **Analog Integrated Circuits and Signal Processing**, v. 88, n. 1, 2016.

STEFFENS, C.; MANZOLI, A.; OLIVEIRA, J. E.; LEITE, F.L.; CORREA, D. S.; HERMANN, P.S.P. Bio-inspired sensor for insect pheromone analysis based on polyaniline functionalized AFM cantilever sensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 191, p. 643-649, 2014.



CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve explanação sobre as pragas da soja, feromônios, sensores e camadas sensitivas.

2.1 PRAGAS DA SOJA

A soja (*Glycine max* (L) Merril) tem grande importância no cenário mundial, tanto no âmbito alimentar como econômico, uma vez que seus grãos atendem o mercado de produção de farelo, farinhas, óleo, bebidas à base de soja entre outros (OLIVEIRA e BARNECHE, 2016).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, apresentando uma produtividade em torno de 95 milhões de toneladas com área plantada de mais de 33 milhões de hectares, movimentando um mercado de aproximadamente 113 milhões de dólares. E, frente a grande representatividade dessa cultura na economia do Brasil, se faz necessário investir em tecnologias alternativas, modernas, diversificadas, e acima de tudo, sustentáveis para o manejo de pragas da soja (BELO et al., 2012; PERRY et al., 2016).

No decorrer do desenvolvimento da soja, ela fica exposta ao ataque de diversas espécies de insetos e pragas, como besouros, percevejos e lagartas, específicos para cada fase de desenvolvimento da planta. O percevejo marrom, *E. heros* (Figura 1), está entre as pragas que mais causam prejuízo na cultura da soja, interferindo diretamente na qualidade e no rendimento dos grãos em formação, causando baixa produtividade, menor teor de óleo e baixo vigor das sementes (BLASSIOLI-MORAES et al., 2012).

O *E. heros* era tido como uma espécie de baixa ocorrência até a década de 70, porém, essa praga adaptou-se ao clima das diferentes regiões brasileiras, tornando-se o percevejo mais abundante nas lavouras de soja de todo país (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999).

Eles apresentam período de incubação de 5,4 dias, os ovos são colocados sobre as folhas ou vagens e normalmente estão dispostos em fileiras duplas O tempo de duração média de ovo a adulto (passando pelas diferentes fases de ninfa) tem duração média de 28,4 dias. Alguns autores afirmam que a longevidade média do adulto é de 116 dias (FERREIRA; PANIZZI, 1999; CORRÊA-FERREIRA, 2012).

A 1 cm

Figura 1 - Percevejo marrom, E heros, principal praga da soja.

Fonte: adaptado de Blassioli-Moraes et al. (2012)

A ocorrência e os prejuízos que podem ser causados pelo percevejo marrom dependem dos estádios fenológicos da soja. O período de maior ocorrência do percevejo marrom na cultura de soja ocorre entre os meses de novembro a abril e o pico populacional acontece entre março e abril (DEGRANDE e VIVAN, 2012).

De acordo com Degrande e Vivan (2012) quando o ataque dos percevejos ocorre no desenvolvimento das vagens, 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.

Como intuito de reduzir os danos destes insetos na cultura da soja, existem vários métodos de amostragem que podem ser utilizados no seu monitoramento, e entre eles o pano de batida.

Esse método foi desenvolvido em 1963 por Boyer e Dumas nos Estados Unidos. No Brasil começou a ser utilizado na década de 70. Esse método consiste em um pano ou plástico branco de 1 metro de largura, tendo nas bordas uma bainha onde são inseridos dois cabos de madeira. O pano, devidamente enrolado e sem perturbar as pla12ntas, é introduzido entre duas fileiras adjacentes de soja e estendido sobre o solo. As plantas das duas fileiras de soja são inclinadas sobre o pano, batidas vigorosamente, com o objetivo de deslocar os insetos das plantas para o pano. Na sequência, as plantas voltam à posição original, e os insetos sobre os panos são contados e registrados em fichas de monitoramento (CORRÊA-FERREIRA, 2012).

A vistoria na lavoura deve ser executada, no mínimo, uma vez por semana nas horas mais frescas do dia, a partir do início do desenvolvimento de vagens (DA SILVA et al., 2014).

Durante o período crítico do ataque dos percevejos (desenvolvimento das vagens ao enchimento de grãos) é importante utilizar os níveis de ação recomendados no Manejo Integrado de Pragas (MIP), que preconiza que o controle deve ser realizado quando a população

atingir quatro percevejos (adultos ou ninfas) por pano de batida em lavouras de produção de grão e dois percevejos para produção de sementes (EMBRAPA, 2013).

O monitoramento com pano de batida requer mão de obra qualificada, além de consumir muito tempo em razão da extensão de áreas em que a soja é cultivada. Por apresentar estas limitações a técnica do pano de batida não é sempre adotada ou aplicada de maneira correta pelos produtores, o que conduz, em muitos casos, a aplicações ineficientes de inseticidas

Essas limitações, associadas às alterações nas condições de cultivo, alterações no sistema de plantio, a redução do espaçamento entre fileiras e plantas e a introdução de novas cultivares, estimulou a busca por novos métodos com maior eficiência para o monitoramento das pragas da soja, entre eles a utilização de feromônios de insetos.

2.2 FEROMÔNIOS DE INSETOS

Os insetos estão entre os animais que mais dependem do olfato para desempenhar suas funções comportamentais, sendo o sentido mais importante, a frente da audição e visão. Eles utilizam sinais químicos para definir locais de oviposição, acasalamento, localização de presas, defesa, entre outros (BIRCH e HAYNES, 1984; VICKERS et al., 2001).

As substâncias químicas utilizadas na comunicação são denominadas semioquímicos e os feromônios são incluídos na comunicação intraespecífica, onde tanto emissor quanto receptor pertencem à mesma espécie, diferente dos aleloquímicos, que desempenham papel interespecífico, onde emissor e receptor são de espécies diferentes. Os aleloquímicos são subclassificados em três diferentes tipos dependendo dos efeitos causados nos indivíduos, se o receptor for favorecido são chamados de cairomônios, se beneficiam os emissores de alomônios e se os dois, receptor e emissor forem beneficiados, são os sinomônios (ZARBIN e RODRIGUES, 2009) (Figura 2).





Fonte: adaptado de Brezolin et al. (2018).

Dentre os diferentes tipos de feromônios, destacam-se os feromônios sexuais que são sinais químicos produzidos por um sexo do inseto para atração do sexo oposto, com o objetivo de reprodução, e são consideradas substâncias muito ativas, capazes de causar respostas em concentrações muito baixas (MORAES et al., 2008; WEBER et al., 2017).

A produção das moléculas de feromônio sexual varia muito nas diferentes ordens de insetos na natureza, em todos os percevejos (pentatomídeos) estudados até hoje são os machos que produzem os feromônios e são produzidos na ordem de nanogramas ou picogramas, muitas moléculas são termicamente instáveis e/ou degradam na presença de oxigênio ou radiação ultravioleta, dificultando sua extração, detecção e aplicação no campo. No entanto, esta é uma estratégia da natureza para que essas moléculas não perdurem por muito tempo no meio ambiente, diminuindo assim a chance dos insetos serem localizados pelos inimigos naturais, minimizando também a contaminação do meio ambiente, e por isso, as moléculas são produzidas em quantidades diminutas e ficam na natureza o tempo suficiente para que atraiam o parceiro para acasalamento (JONES e OLDHAM, 1999; SONENSHINE, 2017).

Os insetos exibem grande capacidade para detectar seletivamente milhares de semioquímicos em concentrações extremamente baixas, e isso acontece por apresentarem sistemas olfativos muito bem desenvolvidos. Essa capacidade de sentir as alterações no ambiente acontece através de um sistema de neurônios quimiossensores localizados em pelos sensoriais denominados sensilas que estão distribuídas no corpo dos insetos, principalmente nas antenas, e estas conseguem detectar substâncias voláteis (JONES e OLDHAM, 1999). Esse sistema olfativo avançado e complexo gera interesse no desenvolvimento de dispositivos que mimetizem esse sistema e detectem substâncias voláteis em pequenas concentrações e de forma seletiva.

2.2.1 Moléculas feromonais

O primeiro passo para avaliar a composição das moléculas feromonais é definir a forma de extração que será utilizada. Segundo Lin et al., (2016), a escolha do método de isolamento e extração de um semioquímico depende do inseto estudado, do número de insetos disponíveis e do tipo de sistema feromonal. Existem algumas limitações como a pequena quantidade secretada, alterações químicas que podem ocorrer após a extração e contaminações, por outros semioquímicos.

Os métodos mais utilizados para extração de feromônios incluem a aeração (coleta de voláteis), onde todos os voláteis dos insetos, incluindo os feromônios são coletados durante um

determinado período de tempo em polímeros adsorventes e a extração por solvente (direto da glândula), diferindo nos procedimentos e no rendimento (TURLINGS e WÄCKERS, 2004).

Como a maioria das moléculas feromonais são voláteis, a técnica mais utilizada para a análise quantitativa é a cromatografia gasosa (CG) acoplada ao detector de ionização de chamas e para análise qualitativa a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013).

2.2.2 Moléculas feromonais dos pentatomídeos e sua aplicação na agricultura

No percevejo *E. heros*, foram identificados três acetatos específicos do macho, o 2,6,10 trimetiltridecanoato de metila, (E, Z) -2,4-decadienoato de metila e 2,6,10-trimetildodecanoato de metila. Bioensaios em laboratório e testes de campos mostraram que fêmeas de *E. heros* são atraídas principalmente pelo componente 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila sendo a presença dos outros dois componentes desnecessária para atração (BORGES et al., 1998a; 1998b; 1999).

O 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila (Figura 3), tem três centros quirais, que geram oito estereoisômeros possíveis. Para identificar qual a configuração absoluta do composto produzido pelo inseto, os oito estereoisômeros foram sintetizados e testados em laboratório (BORGES et al., 1998b). Bioensaios com os estereoisômeros individuais e com a mistura racêmica mostraram que a configuração absoluta do composto produzido pelo *E. heros* é 2*S*, 6*R*,10*S*, pois este quando sozinho atrai significativamente as fêmeas quando comparado aos outros estereoisômeros, mas a mistura racêmica também capturou fêmeas no campo, o que indica que os outros isômeros não têm efeito sinérgico nem antagonista na mistura racêmica (COSTA et al., 2000).

Desde a descoberta do primeiro feromônio em 1959, vários estudos foram desenvolvidos em diferentes áreas, como química analítica, neurofisiologia e genética. Essa abordagem multidisciplinar tem instigado o desenvolvimento de estudos para detecção e compreensão do comportamento dos insetos frente aos feromônios (SAKURAI; NAMIKI; KANZAKI, 2014).

Figura 3 - Estrutura química do éster (2*S*, 6*R*, 10*S*) -trimetiltridecanoato de metila, principal componente do feromônio de percevejo marrom, *E. heros*.



Fonte: Mori e Murata (1994).

Na agricultura a utilização de feromônios para o controle de pragas tem gerado interesse, e a sua eventual aplicação pode ser considerada em diferentes aspectos e entre eles para o monitoramento de insetos para determinação do nível populacional, resultando em orientação segura sobre a ocasião oportuna para a aplicação dos tratamentos químicos. Assim, o feromônio fornece um panorama do grau de infestação, revelando a necessidade ou não de tratamentos (ZARBIN e RODRIGUES, 2009).

Na identificação do feromônio sexual do *E. heros* por Aldrich et al., (1994) foi descrito que os machos produzem predominantemente o composto 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila.

Em 1998, Borges e colaboradores, avaliaram através de bioensaios se o 2,6,10trimetiltridecanoato de metila, feromônio sintetizado por machos do *E.heros*, conseguia atrair as fêmeas e obtiveram resultados positivos. Zhang et al. (2003) propuseram uma nova combinação de ésteres metílicos como sendo os principais voláteis produzidos pelos machos: 2,4-decadionoato de metila (53%), 2,6,10–trimetildodecanoato de metila (3%) e 2,6,10 trimetiltridecanoato de metila (44%), baseando-se nos resultados obtidos das análises por detecção eletroantenográfica acoplada ao CG, mostrando também que a quantidade dos três compostos aumenta com a idade do inseto, atingindo o pico aos 35 dias de fase adulta e a taxa de liberação destes compostos foi de 2,5µg/macho/dia.

Silva et al. (2014) avaliaram a eficiência das formulações do feromônio sexual do percevejo marrom, *E. heros*, em septo de borracha e lure e compararam ao método do pano de batida para o monitoramento dessa praga em lavoura de soja. As formulações do feromônio foram mais eficientes na captura de *E. heros* e controle precoce da população, em relação ao pano de batida, resultando em sementes com maior qualidade do que as provenientes das parcelas monitoradas pelo pano de batida.

A promissora utilização dos feromônios no manejo de insetos-praga e o avanço da nanociência e nanotecnologia geram interesse para o desenvolvimento de micro e/ou nanossensores de detecção, uma vez que estes podem contornar a principal limitação da utilização dos feromônios: a pequena quantidade liberada pelos insetos.

2.3 SENSORES PARA DETECÇÃO DE MOLÉCULAS QUÍMICAS

O desenvolvimento de dispositivos sensoriais para detecção de voláteis, como os semioquímicos, gera grande interesse nas mais diferentes áreas. A detecção de compostos voláteis pode ser realizada com a utilização de equipamentos como CG ou espectrometria de massas, porem esses equipamentos possuem custo elevado e alto consumo de energia. Desse modo, estudos que visam desenvolver sensores, que interajam com espécies voláteis, alterem suas características e reflitam a concentração do volátil presente nas proximidades do sensor, geram interesse (YEW e CHUNG, 2015).

Sensores podem ser definidos como dispositivos que transformam uma informação, que pode ser originária de uma reação química ou de uma propriedade física do sistema, em um sinal mensurável. A geração do sinal ocorre quando as moléculas do analito interagem com a camada sensitiva por meio de processos físicos e químicos promovendo mudanças, geralmente nas propriedades elétricas ou ópticas, que são detectadas por um transdutor apropriado e convertidas em um sinal elétrico de saída (TEWARI et al., 2014). Este sinal obtido é processado por métodos de reconhecimento de padrões e dados analíticos são exibidos.

O desenvolvimento de sensores para voláteis vem se acentuando em diferentes segmentos, como para detecção de compostos por indústrias, poluentes atmosféricos, além de aromas, essências e feromônios. Estes apresentam vantagens como o funcionamento simples e o baixo custo de instrumentação, tempos de resposta rápidos e pré-tratamento mínimo da amostra (OLSSON e HANSSON, 2013; SAKURAI; NAMIKI; KANZAKI, 2014). A obtenção de informações em relação à concentração e propriedades de voláteis específicos vem se destacando também para detecção de feromônios de insetos-praga.

O processo de detecção dos sensores, na maioria das vezes, é iniciado na superfície do material sensor. A interação das moléculas na camada sensitiva pode ocorrer de duas formas principais: por adsorção química, onde as moléculas e átomos dos voláteis interagem com a superfície por meio de ligações químicas, ou por adsorção física, onde a energia de interação está relacionada com as forças de Wan der Waals entre os átomos da superfície e os voláteis, representando interações mais fracas e de baixa energia e nesta situação, uma molécula que

atinge a superfície do substrato pode ser adsorvida, porém não sofre reações químicas e mantém sua característica (CHU et al., 2012).

Os sensores de gases funcionam como transdutores, convertendo em sinais, as respostas da interação de um material ativo com moléculas odoríferas. Os principais sensores utilizados para a detecção dos compostos odoríferos utilizados são eletroquímicos, principalmente condutimétricos e os piezoelétricos.

Os sensores condutimétricos convertem em um sinal elétrico a resposta da interação do composto volátil com o material ativo, e de acordo com a camada sensitiva podem ser classificados como sensores semicondutores baseados em óxidos metálicos e sensores semicondutores de polímeros condutores orgânicos (JANATA e JOSOWICZ, 2003).

Os sensores semicondutores são simples, robustos e apresentam excelente resposta, reagindo a pequenas concentrações do analito. Normalmente, os dispositivos são fabricados a partir de óxido de zinco, estanho, titânio, tungstênio e irídio, e dopados com uma camada metálica ou filmes finos de ligas de paládio ou platina. São sensores de grande sensitividade (5 a 500 ppm) e de grande velocidade (baixo tempo de resposta). Como inconveniente estão sujeitos à saturação mesmo em baixas concentrações de voláteis (MEDEIROS et al., 2012).

Os sensores baseados em polímeros condutores (polipirrol, polianilina, politiofeno) apresentam vantagens como: fácil sintetização, versatilidade, podem ser operados a temperatura ambiente, variedade de metodologias para fabricação de sensores (em função do tipo de dopante utilizado e do grau de dopagem) e apresentam grande sensitividade (10 a 100ppm) a uma grande variedade de compostos voláteis (KAPLAN, 2012; MANZOLI et al., 2011). Como desvantagem podemos citar a sensibilidade a umidade e a falta de reprodutibilidade em alguns casos, uma vez que é difícil controlar o crescimento dos filmes de polímeros (PARTRIDGE; HARRIS; ANDREWS, 1996).

Dentre os sensores de gases piezoelétricos, destacam-se os de microbalança de cristal de quartzo (MCQ) e o de onda acústica de superfície (SOA). Os sensores de MCQ consistem em um disco com alguns milímetros de diâmetro, posicionado entre dois eletrodos metálicos circulares, onde uma camada ativa reveste um dos círculos e este é ligado ao outro círculo (cristal de quartzo). Apresentam limite de detecção inferior a 1 pg, permitindo a detecção de elementos traços (KAPLAN, 2012; WANG; LI; VIEHLAND 2014).

Os SOA, também já estão bem estabelecidos para detecção de voláteis, e podem ser definidos como dispositivos em que as ondas acústicas mecânicas atuam como o sistema da transdução. Estes podem ser utilizados para medir pequenas perturbações de massa na interface da camada sensitiva, através de fenômenos acústico-elétricos, e esta interação altera a

velocidade da onda acústica, modificando a frequência de ressonância do sensor, que pode ser diretamente relacionada à concentração do analito a ser detectado (MEDEIROS, 2009; DEVKROTA et al., 2015).

Os sensores com transdutores ópticos também são utilizados para detecção de voláteis, principalmente os sensores de ressonância plasmônica de superfície (RPS), que foram utilizados pela primeira vez para detecção de gases e biossensoriamento em 1982 (ZAMARION et al., 2008). Esses sensores se baseiam em ondas de plasmon de superfície que são ondas eletromagnéticas longitudinais, e se propagam entre um metal e um dielétrico, gerando um sinal pela oscilação de densidade de carga que pode existir entre dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos (MAIER, 2007). Nestes sensores, a quantificação da espécie de interesse é realizada por medidas da mudança no índice de refração e podem apresentar limite de detecção de 10⁻⁸ mol/L⁻¹(PERKINS e SQUIRRELL, 2000).

Embora utilizados como sensores para detecção de voláteis, nenhum desses dispositivos podem ser comparados com a sensibilidade, seletividade e tempo de resposta de um sistema olfativo de um organismo vivo, uma vez que os animais, principalmente os insetos, são dotados de mecanismos moleculares sofisticados que envolvem a ativação de receptores olfativos e detecção rápida e em tempo real de compostos voláteis (LU et al., 2015).

O desenvolvimento de biossensores baseados em células pode ser uma tecnologia bastante atraente, uma vez que possuem alto grau de sensibilidade e seletividade, características essenciais para aplicações práticas, e para tanto, muitos sistemas olfativos de insetos já foram estudados, incluindo moscas, mosquitos, mariposas e besouros. Cada receptor olfativo pode detectar vários tipos de odores que incluem diferentes grupos funcionais, álcoois, aldeídos, cetonas, e essas características geram interesse no desenvolvimento de sensores para voláteis, por exemplo, para detecção de feromônios (WEHRENFENNIG et al., 2013).

Lu et al. (2014) desenvolveram um biossensor olfativo de impedância eletroquímica utilizando eletrodos interdigitados revestidos de ouro contendo proteínas olfativas de abelhas (*Apis mellifera* L.), para detecção de feromônios (metil-p-hidroxilo benzoato, acetato de isoamila) e odores florais (linalol, geraniol, β -ionona, 4-alilveratrole). Verificaram que a redução da resistência do biossensor foi proporcional ao logaritmo da concentração do ligante de 10⁻⁶ M até 10⁻³ M, sendo assim, o sensor de impedância foi capaz de detectar, de forma linear, diferentes concentrações de odores florais, e feromônios, com limite de detecção de micromoles.

Mitsuno et al. (2015) desenvolveram um sensor baseado em receptores de células odoríficas de insetos, utilizando células do ovário de mariposas, *Spodoptera frugiperda*, e

testaram a seletividade e sensitividade frente aos feromônios. Dispositivos microfluídicos foram construídos em vidro de boro silicato, envoltos por uma camada de alumínio, apresentando um canal de fluxo semi-circular tendo um raio de 100 mm, com um espaço para cultura de células. Os autores obtiveram sensitividade de partes por bilhão (ppb) em solução, conseguindo distinguir seletivamente entre estruturas químicas olfativas semelhantes e exibindo tempos de resposta rápidos de aproximadamente 13 s, mantendo a capacidade de resposta após dois meses.

A comunicação entre espécies, através de feromônios, tem tido inúmeras aplicações, incluindo detecção, interceptação, monitoramento, orientação de insetos e controle de pragas na agricultura. Assim, o desenvolvimento destes sensores químicos ou biossensores, poderiam auxiliar significativamente nestes estudos.

Uma alternativa seria a utilização de sensores que empregam a detecção da deflexão ou variação da frequência de um cantilever funcionalizado, e estes representam um papel fundamental para o estabelecimento de tecnologias eficientes, para detecção de compostos com grande precisão. Os sensores de cantileveres vêm ganhando espaço com os avanços atuais no campo da nanotecnologia.

2.3.1 Sensores de cantileveres

O cantilever é um dispositivo que pode atuar como um sensor físico, químico ou biológico, detectando alterações de flexões ou frequência vibracional. Apresentam-se como hastes finas e flexíveis que em sua parte inferior contêm uma agulha, cujo raio do vértice final da ponta apresenta uma dimensão de alguns nanômetros. Podem ser construídos de uma ou mais hastes de silício ou de nitreto de silício e normalmente apresentam comprimento e espessura na ordem de micrometros (μ m), podendo sofrer deformações quando uma massa específica de analito é adsorvida na sua superfície (VASHIST, 2007).

Para avaliar a resposta de deflexão ou frequência vibracional é utilizado o microscópio de força atômica (AFM do inglês, *Atomic Force Microscopy*) (SINGAMANENI et al., 2008; NAZAROV; BALESTRA; VALERIYA, 2014).

Os principais componentes que constituem um AFM podem ser identificados como: a) um *scanner* para posicionar a amostra em relação ao cantilever, podendo ser alterado em 3 direções (x, y e z); b) um elemento para detecção e c) um computador para controle eletrônico (controlar scanner e outros componentes, salvar dados, exibir e alterar) (BAYKARA e SCHWARZ, 2016). Ele pode operar posicionando uma sonda próxima a superfície para medir e mapear fisicamente a morfologia de uma grande variedade de materiais (PATIL; ÇELIK-BUTLER; BUTLER, 2010; XU e SIEDLECKI, 2017).

O princípio de um AFM (Figura 4) baseia-se na utilização de cantileveres com valores de constante de mola adequada e dentre as várias formas de detecção, para utilização como sensor, o método óptico é o mais utilizado, pois a luz visível que parte de um diodo de laser de baixa potência, é focada na ponta do cantilever que atua como um espelho. O feixe refletido atinge uma posição no fotodetector, onde a distância percorrida do feixe sobre o detector é proporcional à deflexão da haste, ou a variação da frequência de ressonância. Todo este processo é controlado por computador (LANG e GERBER, 1997; RAITERI et al., 2002; ALIANO e CICERO, 2012).

Figura 4 - Esquema do funcionamento de um AFM.



Fonte: adaptado de Chow; Bucar; Jones (2012).

Na literatura existem muitos estudos e técnicas que analisam a interação entre a ponta de um cantilever e a superfície da amostra, no entanto, eles também podem ser utilizados como sensores para aplicação na detecção de analitos, uma vez que apresentam grande sensitividade para detecção de voláteis, por exemplo, ou para adsorção de moléculas (LANG, 2008).

Quando utilizados como sensores, os microcantileveres geram uma resposta mecânica, podendo sofrer deflexão ou alterar a frequência vibracional devido a adsorção de moléculas sobre a superfície e assim, as propriedades elásticas do cantilever desempenham um papel chave para a análise do sinal do feixe de laser no detector com alta resolução (LIU et al., 2012; STEFFENS et al., 2014).
Os sensores de cantileveres, com a função de detectar e/ou quantificar a interação entre uma molécula e a camada sensitiva podem atuar em tempo real e de forma continua e dentre os vários modos de atuação dos cantileveres, podemos destacar dois principais, denominados de modo estático e modo dinâmico. O modo estático utiliza a variação da deflexão física do cantilever, enquanto que o modo dinâmico utiliza a variação da frequência de ressonância do cantilever resultante do aumento de massa adsorvida na superfície, quando uma molécula adsorve na superfície do cantilever, que está suspensa, causa uma alteração na massa e também nas propriedades viscoelásticas do cantilever conforme mostra a Figura 5 (ZAVALA, 2007; LI et al., 2017).

Figura 5 - Principais modos de operação dos sensores de microcantileveres. (a) modo estático que explora as mudanças de deflexão. (b) modo dinâmico que explora as mudanças de massa.



Fonte: Lang (2012).

De acordo com Tamayo et al. (2013), as moléculas adsorvidas no sensor podem causar um aumento na massa com redução na frequência de ressonância, ou pode causar um aumento na rigidez, que ocasiona um aumento na frequência de ressonância.

Para cada tipo de modo de operação é necessário um cantilever com características diferentes visando uma alta sensitividade. Para o desenvolvimento de sensores para detecção de voláteis, o modo dinâmico se mostra apropriado, uma vez que permite a detecção de pequenas alterações de massa resultantes de adsorção ou dessorção de moléculas (VASHIST et al., 2014).

Quando a frequência de ressonância, resultado do movimento vibratório do cantilever, é avaliada, a constante de mola deve ser conhecida, uma vez que representa uma medida da rigidez, a geometria e a variação da massa adsorvida sobre o cantilever, e poderão interferir na resposta do sensor (VASHIST, 2007; LANG; HEGNER; GERBER, 2010). Estes sistemas podem ser utilizados como sensores de precisão de massa, semelhante a um sensor de microbalança de cristal de quartzo, com a vantagem da miniaturização, resultando em ganho de sensibilidade e limite de detecção (TAMAYO et al., 2013). Porém, a sensibilidade, os ruídos e a resolução, também são influenciados pelas condições do ambiente externo, e por serem frágeis, devem ser operados cuidadosamente (TAMAYO et al., 2013; BAUSSELS, 2015).

Alguns aspectos devem ser considerados para a escolha dos cantileveres utilizados como sensores, tais como: o material deve conter um amortecimento interno baixo (módulo de *Young*) e a geometria deverá proporcionar um fator de qualidade (Q) elevado; a superfície deve refletir com alta qualidade a leitura óptica, não podendo ser rugosa, pois dispersaria a luz em todas as direções e, a funcionalização deve ser específica para a aplicação desejada (YEW; CHUNG, 2015). Também deve-se considerar a interferência de fatores externos, como a variação da temperatura que pode ocasionar uma alteração na constante de mola e, consequentemente na frequência de ressonância. Além disso, outros ruídos mecânicos devem ser considerados, como os ruídos de adsorção-dessorção (causados pela interferência de moléculas presentes no ambiente)e os ruídos na frequência de ressonância (CUI et al., 2008).

Os parâmetros mecânicos básicos de um cantilever são a constante de mola e a frequência de ressonância. A constante de mola "K" é um fator de proporcionalidade entre a força "F" (em Newton) aplicada e a deflexão vertical resultante do cantilever (nm) (Δ S) ao sofrer uma força "F", onde está relação é chamada de Lei de Hooke´s, de acordo com a Equação 1 (YEW; CODY; KRAVITZ, 2008):

$$F = K.\Delta S$$
 Equação 1

A K produz a rigidez de um cantilever. A expressão da constante de mola (k) é dada em função das dimensões geométricas e parâmetros do material (Equação 2) (WANG; ZHANG; HE, 2007).

$$K = \frac{E.w.t^3}{4.l^3}$$
 Equação 2

onde: E é o módulo de *Young* (E = 1,3 x 10^{11} N/m² para silício no plano <100> de sua estrutura cristalina) e *t*, *w* e *l* são as dimensões do microcantilever.

A constante de mola de um microcantilever é relacionada ao módulo de *Young*, o qual depende das propriedades do material, definindo assim a sensibilidade do microcantilever (NADDEO et al., 2012).

A frequência de ressonância (f_{res}) para um cantilever retangular simples pode ser expressa pela equação 3 (CHEN et al., 1995):

$$F_{res} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{m}}$$
 Equação 3

onde: m a massa de um microcantilever (kg), a qual pode ser expressa como (Equação 4):

$$m = \rho. t. l. w$$
 Equação 4

onde: ρ é a densidade do material (kg/m³), *t*, *w* e *l* denotam a espessura, largura e o comprimento do cantilever, respectivamente.

A relação mostra que o aumento da frequência de ressonância é diretamente proporcional a um aumento da constante de mola e inversamente a redução da massa do cantilever (WILSON; BAIETTO, 2009; BRATTOLI et al., 2011). A mudança na frequência de ressonância do cantilever, após a exposição a um analito, deve-se principalmente a massa adicionada sobre ele, sendo que essa mudança induzida pela adsorção, pode causar alteração na elasticidade e amortecimento do cantilever, e modulam a frequência de ressonância em sistemas como o apresentando.

A frequência de ressonância pode ser usada para avaliar ligações moleculares, e pode utilizar diferentes técnicas para excitação e medição da frequência de ressonância, para conseguir avaliar as mudanças que ocorrem no modo dinâmico. Primeiro necessita que eles sejam excitados e após o movimento resultante é medido e as informações processadas por diferentes técnicas de leitura (JOHNSON e MUTHARASAN, 2012).

A excitação pode ser realizada por componentes externos ou internos e se classificam em 5 categorias: óptica, elétrica, térmica, magnética e acústica. As formas de mensurar a frequência de ressonância podem utilizar componentes externos, como óptico, técnicas de capacitância ou interferometria ou componentes internos, relacionados a alterações de propriedades da camada ativa ou nas propriedades do sensor, que incluem componentes piezoelétricos, piezorresistivos e estes podem ser associados (JOHNSON e MUTHARASAN, 2012).

A Figura 6 mostra essa relação, demostrando que quando ocorre uma deposição de massa no cantilever funcionalizado, a frequência de ressonância diminui. Essa relação permite a utilização dos cantileveres como sensores mecânicos, que detectam a interação entre sensor e analito, pela alteração na massa, e refletem na frequência de ressonância (XU et al., 2014).

Figura 6 - Esquema do mecanismo de detecção utilizando cantileveres no AFM, modo dinâmico, evidenciando a redução da frequência de ressonância quando ocorre uma deposição de analitos no sensor.



Fonte: Yu et al. (2012).

Os dispositivos microeletromecânicos (MEMs) são descritos como sistemas inteligentes que possuem componentes mecânicos e elétricos com tamanho que vária de micrometros (µm) a milímetros (mm), contendo um elemento chave um sistema mecânico que possibilita um alto desempenho dos sensores, com potencial para detecção de moléculas em quantidades mínimas, podendo ser utilizados como sensores com máxima sensitividade, capazes de detectar até moléculas individuais (SUCHANEK et al., 2017).

Os sensores de cantileveres comparados com outros tipos de transdutores relacionados a massa, como microbalança de cristal de quartzo, estes são superiores, pois apresentam um mecanismo de detecção mais específico, respondem melhor a massas menores, são compatíveis com arranjos de sensores e apresentam um custo mais baixo, além de apresentarem maior sensitividade limite de detecção no ambiente que pode chegar a atogramas (10⁻¹⁸ag). Os

sensores de MCQ operam com frequências em MHz enquanto em sensores de cantileveres podem ser operados em KHz, permitindo detecção de quantidades menores de analitos (XU et al., 2014).

A capacidade em adaptar o tamanho e a estrutura, associado com as propriedades dos micro e nanomateriais, indicam excelentes perspectivas para a construção e a aplicação desses sistemas de detecção (BOISEN et al., 2011). Pesquisadores conseguiram atingir elevado grau de sensitividade, na ordem de atograma (ag), permitindo a detecção de partículas de vírus individuais com massa na ordem de fentograma (fg), utilizando cantileveres da ordem de 10µm de comprimento (CHAUDHARY e GUPTA, 2009).

Sendo assim, para atuarem como excelentes sensores, os cantileveres necessitam, obrigatoriamente, de um recobrimento com uma camada sensitiva, a qual deve ser específica e capaz de reconhecer moléculas de interesse.

2.3.2 Funcionalização da superfície dos sensores nanoestruturados de cantileveres

Uma das etapas mais importantes na construção de sensores é a funcionalização (deposição da camada sensora), que pode ser realizada por intermédio da imersão do corpo do cantileveres em reagentes para modificação química, cobrindo-se ambas as faces proporcionando aumento na área de contato e, consequentemente, uma melhora na sensitividade. Cantileveres podem ser funcionalizados com diversos materiais tais como, metais, polímeros, enzimas, entre outros, devendo interagir com analitos específicos que adsorvam ou se ligam por afinidade química e com isso se torna um sensor seletivo e sensível, que responde a substâncias específicas ou a grupos de substâncias. Quando o cantilever entra em contato com o analito em questão, ele reage causando uma alteração mecânica, observada pela alteração na frequência de ressonância devido a massa adicionada e as pequenas dimensões do cantilever contribuem para alta sensibilidade desses sensores (MARGARIDO; MOREIRA; HERRMANN, 2016).

O analito e a camada sensitiva podem se ligar de forma reversível ou irreversível, se a ligação for reversível, o analito interage com a camada sensitiva e produz uma resposta, porém, quando as moléculas são removidas, o sensor retorna ao seu estado original. Se for irreversível, o analito sofre alterações em contato com a camada sensitiva e pode ser consumido no processo de detecção, embora o número de moléculas de reação seja muitas vezes uma pequena proporção do número total presente na amostra (THUNDAT et al., 2003).

A utilização de materiais sintéticos como camada ativa, embora reduzindo a sensibilidade e especificidade, em relação aos biossensores, são mais estáveis e reutilizáveis (SURESH et al., 2014). A camada ativa seletiva proporciona sítios de ligação específicos para analisar a substância alvo de interesse, o transdutor transforma o sinal da alteração causada pela interação entre os analitos e a camada ativa em outro sinal que pode ser medido e quantificado com mais facilidade por meio físico-químico, óptico, piezoelétrico, eletroquímico, entre outros (SANG et al., 2014).

Os cantileveres de AFM podem ser funcionalizados de diferentes maneiras com o intuito de interagir com o analito em questão, na maioria das vezes, as interações específicas entre o sistema e a amostra são reversíveis, permitindo seu monitoramento (ETCHEGARAY; DE CASTRO BUENO; TESCHKE, 2010).

A deposição é responsável por transferir a dispersão ou material compósito no seu estado inicial líquido sobre um substrato desejado. A qualidade dos filmes obtidos depende do material do substrato, do pré-tratamento da superfície e das propriedades da própria técnica de deposição, a qual influencia a adesão (KANOUN et al., 2014).

Na Figura 7 exemplifica a interação entre uma determinada camada sensitiva e um analito. O cantilever funcionalizado em contato com uma determinada amostra, deve ser capaz de reconhecer de forma específica, somente o analito de interesse, promovendo uma interação que irá causar uma alteração nas características iniciais do sensor, neste caso, alterando a frequência de ressonância por alteração na massa do sensor, sendo esse sinal traduzido de forma que possa ser mensurável (JOHNSON e MUTHARASAN, 2012).

Figura 7 - Desenho esquemático da interação específica entre a camada sensitiva depositada sobre o cantilever e o analito de interesse.



Existem diferentes técnicas de deposição da camada ativa a fim de obter filmes poliméricos para os mais diferentes substratos e nos mais diferentes tipos de configurações de sensores. Dentre as diferentes técnicas de funcionalização, pode-se citar a automontagem, que consiste em uma técnica de fabricação de filmes ultrafinos em multicamadas, através de interações eletrostáticas com a formação de estruturas supramoleculares, e como o próprio nome sugere, o processo reorganiza espontaneamente os componentes de um sistema desorganizado, conseguindo reestrutura-lo sem intervenção ou auxílio, de uma forma que seja termodinamicamente estável (BAI e SHI, 2007).

O princípio da técnica se baseia na adsorção espontânea entre espécies químicas, permitindo a utilização de uma grande variedade de materiais orgânicos e inorgânicos (SEO et al., 2008). A interação entre os suportes definidos e os materiais pode ocorrer por adsorção física ou química, na adsorção química, as camadas são adsorvidas sobre o suporte por ligações químicas e na adsorção física, as camadas são adsorvidas por meio de interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio, sendo que as ligações são fortes o suficiente para manterem a estabilidade do material adsorvido no substrato (MICHEL et al., 2012; NABOK et al., 2017).

A superfície de um substrato precisa apresentar carga inicial superficial não neutra, de forma geral, se um substrato é carregado negativamente, pode ser imerso em uma superfície contendo um polieletrólito com cargas positivas (policátion), por um tempo predeterminado, após esse tempo de imersão, uma camada de material é adsorvida, através de ligações eletrostáticas, entre as cargas do suporte e as cargas do policátion e o excesso do material é removido após a imersão em uma solução de lavagem. Na segunda etapa, para formação da outra camada, o suporte agora contendo cargas positivas na sua superfície, é imerso em uma solução contendo um polieletrólito com cargas negativas (poliânion), por um tempo predeterminado, e após imerso em uma solução de lavagem e seco com ar ou nitrogênio. E então, tem-se a primeira bicamada, como pode ser observado na Figura 8 (BRAGA et al., 2008; RAPOSO e OLIVEIRA JR, 1998). Este procedimento pode ser repetido por inúmeras vezes, formando multicamadas sobre substratos sólidos.

Figura 8 - Representação esquemática do processo de deposição do filme utilizando a técnica LbL. Os passos A e C representam a adsorção de um poliânion e de um policátion, respectivamente, e os passos B e D são as soluções de lavagem.



Fonte: Oliveira; Barros; Ferreira (2017).

Entre os diferentes materiais que podem ser utilizados para funcionalização por LbL, os polímeros vêm ganhando destaque. A Pani, um polímero condutor, utilizada individualmente ou associada à derivados de carbono, como nanotubos de carbono ou grafeno, pode ser vislumbrada como camada sensitiva de grande potencial.

2.3.2.1 Polímeros Condutores

Os polímeros condutores são formados por uma cadeia principal contendo ligações simples e duplas alternadas. Enquanto que uma ligação simples é forte e contem mais elétrons localizados, a ligação π , é mais fraca e contém elétrons menos localizados. Isso significa que os elétrons π podem exibir maior mobilidade pelo fato da conjugação resultar na formação de um orbital estendido. Em consequência dessa estrutura, pode-se dizer que esses polímeros são condutores (EFTEKHARI; LI; YANG, 2017).

No entanto, para que a condução possa existir, é necessário que elétrons sejam removidos (ou adicionados) por meio de processos de dopagem. Se um segundo elétron se move para a vacância, deixa atrás de si uma nova vacância que poderá ser ocupada por elétrons mais próximos e desse modo, o movimento de elétrons em longas distâncias dá origem à condução

elétrica nos polímeros conjugados que, em seu estado dopado ou condutor, são mais comumente conhecidos como polímeros condutores (BALINT; CASSIDY; CARTMELL, 2014; EFTEKHARI; LI; YANG, 2017).

As polianilinas apresentam uma série de características que a destacam entre os polímeros condutores, como polimerização simples, baixo custo do seu monômero e estabilidade, além de ser o único polímero condutor onde a sua condutividade é controlada pelos níveis de dopagem e apresenta a mais rápida adsorção/dessorção de vapores (OSTWAL; SAHIMI; TSOTSIS, 2009).

A polianilina se apresenta como um material heterogêneo, possuindo regiões altamente cristalinas condutoras e regiões amorfas isolantes. A dopagem com ácido melhora a organização e consequentemente, sua condutividade (FRATODDI et al., 2015).

A formação do polímero pode ser realizada por nucleação homogênea ou heterogênea e existem diferentes métodos para sintetizar a polianilina e geralmente são escolhidos em função da aplicação, podendo ser sintetizada por meio da oxidação química ou eletroquímica da anilina em meio ácido (WANG et al., 2009).

A síntese química convencional possui a grande vantagem de produzir um polímero de alta massa molecular e de elevada pureza, que pode ser obtido diretamente no estado dopado, em grandes quantidades, na forma de um pó verde (estado de oxidação esmeraldina). Por outro lado, a síntese eletroquímica da polianilina não necessita de agente oxidante e catalisador (MEDEIROS et al., 2012).

A síntese química é o método mais comum de polimerização da anilina, pois apresenta o melhor rendimento (HEEGER, 2001). A polimerização envolve a oxidação direta dos monômeros de anilina por oxidação química. As sínteses mais utilizadas são a polimerização interfacial (RAKIĆ; TRIFUNOVIĆ; ĆIRIĆ-MARJANOVIC, 2014).

Já na síntese interfacial, o mecanismo de polimerização oxidativa ocorre na interface de duas fases imiscíveis (um solvente orgânico e uma fase aquosa), sem a necessidade de agitação, o pH é ácido e pode ser realizada a temperatura ambiente. No caso da polimerização da anilina (monômero), a mesma é solubilizada em solvente orgânico (tolueno, diclorometano, clorofórmio) e o agente oxidante (persulfato de amônio por exemplo), é solubilizado numa solução ácida aquosa (VIRJI et al., 2004; NAJIM e SALIM, 2017).

Quando um íon é transferido na interface entre a água e um líquido orgânico, uma corrente flui através da interface e a diferença de potencial entre as duas soluções é proporcional ao número dos elétrons carregados que são transferidos através da barreira. Portanto uma vez que o monômero (anilina) e o iniciador (oxidante) são separados pela fronteira entre a fase

aquosa (ácido/oxidante) e a fase orgânica (monômero/solvente orgânico), a polimerização ocorre nesta interface, formando as nanoestruturas (DALLAS e GEORGAKILAS, 2015).

Resumidamente a polimerização *in situ* apresenta vantagem de produzir um polímero de alta massa molecular e de elevada pureza, que pode ser obtido em grande quantidade diretamente no estado dopado (ROTH e GRAUPNER, 1993). Já a síntese interfacial surgiu como uma rota fácil para fabricação de nanofibras de Pani, não dependendo de nenhum dopante específico ou solvente (HUANG e KANER, 2004).

Nanoestruturas de polímeros condutores (nanobastões, fios, fibras e tubos) vêm sendo estudadas acompanhando uma tendência geral de pesquisa em ciência dos materiais, baseados na expectativa de que a combinação de polímeros orgânicos condutores e nanoestruturas permitiriam obter propriedades superiores ou novas propriedades (EFTEKHARI; LI; YANG, 2017).

A Pani em nanoestruturas apresenta-se com maior organização (ou com menor proporção de defeitos), apresentando melhor resistência mecânica e valores de condutividade mais altos. Além disso, uma vez que não possui uma estrutura aglomerada é mais facilmente dispersa em solventes, mesmo estando na forma dopada (CHIOU, 2006).

A opção de utilização de polímeros condutores como camada sensitiva em sensores de gases se deve aos inúmeros fenômenos físicos e eletrônicos que podem sofrer quando expostos aos analitos. Estes fenômenos causam mudanças na matriz polimérica tais como modificações na conformação das cadeias, efeitos de solvatação tanto das cadeias poliméricas como dos contra-íons dos dopantes, atração ou inserção de elétrons, alteração da mobilidade dos portadores de carga e inchamento da matriz polimérica. E também provocam mudanças na resistência as quais são convertidas em sinais elétricos e/ou mecânicos detectáveis (PATERNO e MATTOSO, 1998; BAI e SHI, 2007).

Uma grande variedade de sensores de voláteis tem sido desenvolvidos usando polímeros condutores como camadas ativas (BAI e SHI, 2007). Sendo que a Pani vem se destacando entre os polímeros condutores por sua facilidade de polimerização, mecanismos de condução elétrica estáveis, alta estabilidade química em condições ambiente, baixo custo e dopagem química reversível (MATTOSO, 1996; FRATODDI et al., 2015).

No geral, polímeros condutores fornecem uma matriz adequada para preparação de nanocompósitos, possibilitando a fabricação de uma gama de novos materiais com possibilidade de utilização como camada sensitiva em sensores (SALVATIERRA; OLIVEIRA; ZARBIN, 2010).

Os nanocompósitos podem ser caracterizados como um conjunto de materiais em que pelo menos um dos seus componentes apresentam dimensões nanométricas, onde um dos materiais funciona como matriz, na qual as partículas do outro material se encontram dispersas (ESTEVES et al, 2004).

As excelentes propriedades mecânicas, elétricas e térmicas dos derivados de carbono, tais como NTC e Grafeno, fazem destes, potenciais para fabricação de nanocompósitos, podendo ser utilizados como materiais de reforço para serem associados a polímeros (CZERW et al., 2011).

2.3.2.2 Nanotubos de Carbono

O carbono está entre os elementos mais importantes da natureza, é a base da química orgânica e fundamental para uma série de importantes estruturas biológicas. Além das duas formas cristalinas de carbono elementar: diamante e grafite, em 1985, pesquisadores demonstraram a existência dos fulerenos (KROTO, 1985; DILONARDO et al., 2017) e em 1991, Sumio Iijima demonstrou a existência dos nanotubos de carbono (NCT), um dos primeiros produtos industriais da nanotecnologia (IIJIMA, 1991).

Estudos têm demonstrado que os NTC têm grandes potencialidades, podendo ser utilizados em dispositivos eletrônicos, sensores, adsorventes moleculares, bem como em produtos químicos ,engenharia biomédica, neuroengenharia, terapia gênica e vetorização de fármacos (TANG et al., 2017).

Do ponto de vista estrutural, há dois tipos de NTC que podem apresentar alta perfeição: os nanotubos de carbono de parede simples (NCPS) podem ser considerados como uma única folha de grafeno enrolada sobre si mesma para formar um tubo cilíndrico, e os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNT) que compreendem vários nanotubos concêntricos (Figura 9) (IIJIMA, 1991).

Os métodos de preparação mais utilizados na obtenção de NTC são: descarga por arco (JOURNET, 1997), ablação a laser (GUO, 1995) e deposição química de vapor (CVD) (COLOMER, 2000).



Figura 9 - Representação esquemática das principais formas de NTCs: (A) NCPS e (B) MWNT.

Fonte: Vicentini (2013).

Devido às propriedades físicas e químicas dos NTC e da Pani, cada material é reforçado com o compósito formado pelos dois, e estes passam a exibir propriedades únicas, que não são possíveis de serem obtidas a partir dos seus componentes individuais (SALVATIERRA; OLIVEIRA; ZARBIN, 2010) No entanto, a formação de nanocompósitos destes materiais ocasiona problemas de processamento em filmes ou obtenção de soluções. Uma alternativa é a obtenção de filmes pela técnica de LbL, consegue recobrir a superfície dos MWNT com partículas de Pani (HYDER et al., 2011; ROSA et al., 2015).

2.3.2.3 Grafeno

O grafeno está entre os materiais mais estudados nas mais diferentes áreas. Descrito como um arranjo bidimensional de uma única camada de átomos de carbono de hibridização sp², semelhante a uma colmeia (Figura 10), apresentando anéis hexagonais ligados entre si por meio de ligações σ com outros três átomos de carbono vizinhos, proporcionando a este material, dureza superior a qualquer outro (NABOK et al., 2017).

Figura 10 - Estrutura básica do grafeno.



Fonte: Nabok et al. (2017).

Além de apresentar alta condutividade elétrica, apresenta excelente estabilidade térmica, elevada transmitância óptica e grande área superficial (LEE et al., 2015). Existem várias formas para fabricação do grafeno, entra elas, o método de *peeling* e de deposição química de vapor; e o método de esfoliação do grafite *bulk*, que constitui etapas que englobam oxidação, esfoliação e redução das folhas de grafite, conforme a Figura 11 (KRISHNAMOORTHY et al., 2013)

Figura 11 - Esquema geral da reação de esfoliação química do grafite *bulk* para obtenção do grafeno.



Fonte: adaptado de Domingos (2013).

O OG é facilmente disperso em solução aquosa, devido a presença de grupos funcionais, como ácidos carboxílicos e álcoois, além disso a sua alta estabilidade química, alta condutividade e principalmente a grande área superficial, permitem que as folhas de grafeno atuem como substratos excelentes para hospedagem e desenvolvimento de nanocompósitos com propriedades únicas. O OG pode ser associado a diferentes materiais, como derivados de carbono, nanopartículas e a polímeros, para fabricação de camadas sensoras (LEE et al., 2015).

Estudos mostram que nanocompósitos de polímeros, como a Pani com OG, apresentam alta sensitividade quando utilizados como camadas sensoras em sensores (PEI et al., 2004 e CHEN et al., 2013).

Em relação aos nanocompósitos envolvendo Pani e grafeno, estes podem ser formados pela mistura direta dos dois materiais, polimerização eletroquímica individual ou associada, e também pela polimerização química da anilina na presença do grafeno. Ainda, podem ser desenvolvidos filmes pela técnica de LbL após a síntese individual da Pani e do OG. Essa técnica apresenta bons resultados, e se baseia na interação eletrostática entre a Pani, carregada positivamente, e o OG, carregado negativamente (LEE et al., 2015).

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O grande volume de agroquímicos utilizados na produção de alimentos, muitas vezes sem o controle adequado, pode trazer sérios problemas ao meio ambiente e a população de modo gera. Desse modo iniciativas que busquem formas de controle ou identificação de insetospraga precocemente, reduzindo danos e muitas vezes evitando a utilização de compostos químicos são necessárias.

Neste sentido, uma alternativa promissora é a utilização de feromônios de insetos para monitoramento e controle de pragas, como o percevejo marrom, *E. heros*, problema na cultura de soja. Assim, o desenvolvimento de sensores nanoestruturados de cantileveres que sejam capazes de detectar o 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, principal composto do feromônio sexual deste percevejo, de forma seletiva, rápida e eficiente, se mostra extremamente promissor.

Até o momento, não foram encontrados na literatura trabalhos que apresentem o desenvolvimento desse tipo de sensor para detecção de compostos feromonais do percevejo marrom. Frente a estes dados, justifica-se a realização deste estudo que visa, de forma geral, desenvolver um sensor para detecção deste composto, e que possa ser pensado, futuramente, para utilização no campo.

2.5 REFERÊNCIAS

ALDRICH, J. R. Chemical ecology of the Heteroptera. **Annual Review of Entomology**, v. 33, n. 1, p. 211-238, 1988.

ALDRICH, J. R; OLIVER, J. E.; LUSBY, W. R.; KOCHANSKI, J. P.; BORGES, M. Identification of male specific volatiles from neartic and neotropical stink bugs (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE). Journal of Chemical Ecology, v. 20, n. 5, p. 1103-1111, 1994.

BAI, H.; SHI, G. Gas Sensors Based on Conducting Polymers. Sensors, v. 7, n. 3, p. 267-307, 2007.

BALINT, R.; CASSIDY, N. J.; CARTMELL, S. H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. Acta Biomaterialia, v. 10, n. 6, p. 2341-2353, 2014.

BAUSSELS, J. Piezoresistive cantilevers for nanomechanical sensing. **Microelectronic Engineering**, v. 145, p. 9-20, 2015.

BAYKARA, M. Z.; SCHWARZ, U. D. Noncontact atomic force microscopy III. Beilstein Journal of Nanotechnology, v. 7, n. 1, p. 946-947, 2016.

BELO, M. S. S. P.; PIGNATI, W.; DORES, E. F.G. C.; MOREIRA, J. C. P. F. Uso de agrotóxicos na produção de soja do Estado do Mato Grosso : um estudo preliminar de riscos ocupacionais e ambientais. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 78-88, 2012.

BIRCH, K. F.; HAYNES, E. A. Insect Pheremones. Journal of Chemical Ecology, v. 10, n. 1, p. 189-191, 1984.

BLASSIOLI-MORAES, M. C.; LAUMANN, R. A; OLIVEIRA, M. W.M, WOODCOCK, C. M.; MAYON, P.; HOOPER, A.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A.; BORGES, M. Sex Pheromone Communication in Two Sympatric Neotropical Stink Bug Species Chinavia ubica and Chinavia impicticornis. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 7, p. 836-845, 2012.

BOISEN, A.; DOHN, S.; KELLER, S.S.; SCHMID, S.; TENJE, M. Cantilever-like micromechanical sensors. **Reports on Progress in Physics**, v. 74, n. 3, p. 36101, 2011.

BORGES, M.; MORI, K.; COSTA, M. L. M.; SUJJI, E. R. Behavioral evidence of methyl-2-6-10 trimethyltridecanoate a sex pheromone of Euschistus heros (Het., Pentatsmidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 122, p. 335-338, 1998a.

BORGES, M.; SCHMIDT, F.G.V.; SUJJI, E. R.; MEDEIROS, M. A.; MORI, K.; ZARBIN, P.H.G.; FERREIRA, T. B. Field responses of stink bugs to the natural and synthetic pheromone of the neotropical brown stink bug, Euschistus heros (Heteroptera: Pentatomidae). **Physiological Entomology**, v. 23, n. 3, p. 202-207, 1998b.

BORGES, M.; ZARBIN, P.H.G.; FERREIRA, J.T.B.; COSTA, M. L.M. Pheromone sharing: Blends based on the same compounds for Euschistus heros and Piezodorus guildinii. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 3, p. 629-634, 1999.

BRAGA, G. S.; PATERNO, L. G.; LIMA, J.P.H.; FONSECA, F. J.; ANDRADE, A.M. Influence of the deposition parameters on the morphology and electrical conductivity of PANI/PSS self-assembled films. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 4, p. 555-562, 2008.

CHAUDHARY, M.; GUPTA, A. Microcantilever-based Sensors. **Defence Science Journal**, v. 59, n. 6, p. 634-641, 2009.

CHEN, G.; THUNDAT, T.; WACHTER, E. A.; WARMACK, R.J. Adsorption-induced surface stress and is effects on resonance frequency of microcantilevers. **Journal of Applied Psysical**, v. 77, n. 8, p. 3618-3622, 1995.

CHEN, G.; THUNDAT, T.; WACHTER, E. A.; WARMACK, R.J. Adsorption-induced surface stress and is effects on resonance frequency of microcantilevers. **Journal of Applied Psysical**, v. 77, n. 8, p. 3618-3622, 1995.

CHU, C. P., BING, Y. B., LIU, H., QIU, D. L. Roles of molecular layer interneuronsin sensory information processing in mouse cerebellar cortex crus II in vivo. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. 1-8,

2012.

CHAO, D., CHEN, X., LU, L., Chen, W. Study of the morfology of conducting polymers. **Analytical Leters**, v. 44, n. 6, p. 1126-1171, 2010.

COLOMER, J. F. Large-scale synthesis of single-wall carbon nanotubes by catalytic chemical vapor deposition (CCVD) method. **Chemical Physics Letters**, v.317, n.1-2, p.83-89, 2000.

CORRÊA-FERREIRA, B. S. Amostragem de pragas da soja. Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga, p. 631-672, 2012.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZI, A. R. Percevejos da Soja e seu Manejo. Circular técnica/Embrapa CNPSo, ISSN 0100-6703 n.24, p. 45, 1999.

COSTA, M. L.M.; BORGES, M.; VILELA, E.F.; MARCO JR. P.; LIMA, E. R. Effect of Stereoisomers of the Main Component of the Sex Pheromone of Euschistus heros (F.) (Hemiptera : Pentatomidae) in the Attractiveness of Females. **Ecology, Behavior and Bionomics**, v. 29, n. 3, p. 413-422, 2000.

DA SILVA, V. P.; PEREIRA, M. J. B.; VIVAN, L. M.; MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; BORGES, M. Monitoramento do percevejo marrom Euschistus heros (Hemiptera: Pentatomidae) por feromônio sexual em lavoura de soja. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 49, n. 11, p. 844-852, 2014.

DALLAS, P.; GEORGAKILAS, V. Interfacial polymerization of conductive polymers: Generation of polymeric nanostructures in a 2-D space. Advances in Colloid and Interface Science, v. 224, p. 46-61, 2015.

DANIEL, S.; CHAUDHURY, M. K. Induced by Vibration. n. 8, p. 3404-3407, 2002.

DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. Science, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.

DEGRANDE, P. E, VIVAN, L. M. Pragas da Soja. n. 66, p. 155–206, 2012.

DILONARDO, E.; PENZA, M.; ALVISI, M.; ROSSI, R.; CASSANO, G.; FRANCO, C.; PALMISANO, F.; TORSI, L.; CIOFFI, N. Gas sensing properties of MWCNT layers electrochemically decorated with Au and Pd nanoparticles. **Journal of Nanotechnology**, v.8, n. 2, p. 592–603, 2017.

DOMINGOS, D, S., SANTOS, W. F., PEZZIN, S. H., Nanocompósitos de matriz epoxidica com rerfirços produzidos a partir do grafite natural. **Revista Matéria**, v. 18, n. 2, p. 1260-1272, 2013.

EFTEKHARI, A.; LI, L.; YANG, Y. Polyaniline supercapacitors. Journal of Power Sources, v. 347, p. 86-107, 2017.

ESTEVES, A. C., BARROS-TIMMOS, A., TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais hídridos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.

ETCHEGARAY, A.; DE CASTRO BUENO, C.; TESCHKE, O. Identificação de Microcistina LR ao nível molecular empregando microscopia de força atômica. **Quimica Nova**, v. 33, n. 9, p. 1843-1848, 2010.

FRATODDI, I., VENDITTI, I.; CESARE, C.; RUSSO, M. V. Chemiresistive polyaniline-based gas sensors: A mini review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 534-548, 2015.

GUO, T.; NIKOLAEV, P.; THESS, A.; COLBERT, D. T.; SMALLEY, R. E. Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. **Chemical Physics Letters**, v.243, n.1-2, p. 49-54, 1995

HEEGER, A. J. Semiconducting and Metallic Polymers: The Fourth Generation of Polymeric Materials. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 36, p. 8475-8491, 2001.

HUANG, J.; KANER, R. B. Nanofiber Formation in the Chemical Polymerization of Aniline: A Mechanistic Study. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 43, p. 5817-5821, nov. 2004.

HYDER, N.; LEE, S. W.; CEBECI, F. C.; SCHMIDT, D. J.; SHAO-HORN, Y.; HAMMOND, P. T. Layer-by-Layer Assembled Polyaniline Nano fiber / Multiwall Carbon Nanotube Thin Film Electrodes for High-Power and High-Energy Storage Applications. **Acs Nano**, n. 11, p. 8552-8561, 2011.

IIJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. Nature, v.354, p. 56-59, 1991.

IIJIMA, S.; ICHIHASHI, T. Single schell carbon nanotubes of 1 nm diameter. **Nature**, v, 358, p. 603-605, 1993.

ILER, R. K. Multilayers of Colloidal Particles. Journal of Collold and Interfate Science, v. 21, p. 569-594, 1966.

JANATA, J. Principles of Chemical Sensors. Boston, MA: Springer US, 2009.

JOHNSON, B. N.; MUTHARASAN, R. Biosensing using dynamic-mode cantilever sensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 32, n. 1, p. 1-18, 2012.

JOURNET, W.; CHUI, V. Carbon sublimation using a solar furnace. **Synthetic Metals,** v.86, n.1-3, p.2295-2296, 1997.

JURENKA, R. Insect pheromone biosynthesis. **Topics in current chemistry**, v. 239, p. 97-132, 2004.

KANOUN, O.; MULLER, C.; BENCHIROUF, A.; SANLI, A.; DIHN, T.; AL-HAMRY, A.; BU, L.; GERLACH, C.; BOUHAMED, A. Flexible Carbon Nanotube Films for High Performance Strain Sensors. **Sensors**, v. 14, n. 6, p. 10042-10071, 2014.

KAPLAN, I. Attracting carnivorous arthropods with plant volatiles: The future of biocontrol or playing with firE. **Biological Control**, v. 60, n. 2, p. 77-89, 2012.

KAPLAN, I. Attracting carnivorous arthropods with plant volatiles: The future of biocontrol or playing with firE. **Biological Control**, v. 60, n. 2, p. 77–89, 2012.

KRISHNAMOORTHY, K., VEERAPANDIAN, M., YUN, K., KIM, S. J. The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation. **Carbon**, v. 53, n. 38, p. 38-49, 2013

KROTO, H. W. C60 Buckminsterfullerene. Nature, v.318, n.6042, p.162-163, 1985.

LAAMRANI, A., LARA, R. P., BERG, A. A., BRANSON, D., JOOSE, P. Using a mobile device app and proximal remote sensing technologies to assess soil cover fractions on agricultural fields. **Sensors**, v. 18, n. 3, p. 1-16.

LANG, H. Cantilever based gas sensing. Solid State Gas Sensing, 2008.

LANG, H. P.; GERBER, C. Microcantilever Sensors. Microscale Thermophysical Engineering, v. 1, n. 3, p. 185-199, 1997.

LEE, T.; MIN, S. H.; GU, M.; JUNG, Y. K.; LEE, W.; LEE, J. U.; SEONG, D. G. LEITE, F. L.; HERRMANN, P. Low-cost gas sensors produced by the graphite line-patterning technique applied to monitoring banana ripeness. **Sensors**, v. 11, n. 6, p. 6425-6434, 2011.

LEE, T.; MIN, S. H.; GU, M.; JUNG, Y. K.; LEE, W.; LEE, J. U.; SEONG, D. G. LEITE, KIM, B.-S. Layer-by-Layer Assembly for Graphene-Based Multilayer Nanocomposites: Synthesis and Applications. **Chemistry of Materials**, v. 27, n. 11, p. 3785-3796, 2015.

LIN, H. H., CAO, D. S., SETHI, S., ZHENG, Z., CHIN, J. S. R., CHAKRABORTY, T. S., SHEPHERD, A. S., NGUYEN, C. A., YEW, J. Y., SU, C. Y. Hormonal modulation of pheromone detection enhances male courtship success. Neuron, v. 15, n. 6., p. 1272-1285, 2016.

LU, Y.; YAO, Y.; ZHA]NG, Q.; ZHANG, D.; ZHUANG, S.; LI, H., LIU, Q. Olfactory biosensor for insect semiochemicals analysis by impedance sensing of odorant-binding proteins on interdigitated electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 662-669, 2015.

LU, Y., LI, H., ZHUANG, S., ZHANG, Q., ZHANG, D., ZHO, J., LIU, Q., DONG, S., WANG P. Olfactory biosensor using odorant-binding proteins from honeybee: Ligands of floral odors and pheromones detection by electrochemical impedance. **Sensors Act B Chem**, v. 193, p. 420-427, 2014.

MAGALHÃES, D. M.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A.; WOODCOCK, C. M.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A.; BLASSIOLI-MORAES, M. C. Influence of Two Acyclic Homoterpenes (Tetranorterpenes) on the Foraging Behavior of Anthonomus grandis Boh. Journal of Chemical Ecology, v. 42, n. 4, p. 305-313, 2016.

MANZOLI, A.; SHIMIZU, F. M.; MERCANTE, L. A.; PARIS, E. C.; OLIVEIRA, O. N.; CORREA, D. S.; MATTOSO, L. C. Layer-by-layer fabrication of AgCl–PANI hybrid nanocomposite films for electronic tongues. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 16, n. 44, p. 24275-24281, 2014.

MANZOLI, A.; STEFFENS, C.; PASCHOALIN, R. T.; OLIVEIRA, J. E.; MATTOSO, L. H. C.; HERRMANN, P. S. P.. Funcionalização da superfície de microcantilevers utilizados em microscopia de força atômica com biomoléculas. **Circular Técnica EMBRAPA**, 2010.

MARGARIDO, A.; MOREIRA, F. M. A.; HERRMANN, P. S. P. Influência da temperatura e umidade no desenvolvimento de um biossensor com microcantilever. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 38, n. 4, p. 1-24, 2016.

MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 1: Introdução aos Polímeros Condutores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, p. 62-77, 2012.

MICHEL, M.; TONIAZZO, V.; RUCH, D.; BALL, V. Deposition Mechanisms in Layer-by-Layer or Step-by-Step Deposition Methods: From Elastic and Impermeable Films to Soft Membranes with Ion Exchange Properties. **ISRN Materials Science**, v. 2012, p. 1-13, 2012.

MITSUNO H, SAKURAI T, NAMIKI S, MITSUHASHI H, KANZAKI R. Novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors. **Biosensors Bioelectronical**, v. 65, p.287-294, 2015.

MOORHOUSE, J. E.; ROSENBURG, B.; VAN CAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, V. H. Tandem mass spectrometry. **Nature**, v. 222, p. 385-386, 1969.

MORI, K.; MURATA, N. Pheromone Synthesis, CLXII. Synthesis of Methyl 2,6,10-Trimethyltridecanoate, the Male Produced Pheromone of the Stink Bugs, Euschistus heros and E. obscurus, as a Stereoisomeric Mixture. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 1994, n. 6, p. 637-639, 1994.

NABOK, A.; WALCH, N.; DUTTON, S.; DAVIS, F.; HIGSON, S. P. J. Graphene-based LbL deposited films: Further study of electrical and gas sensing properties. **MATEC Web of Conferences**, v. 98, p. 8-11, 2017

NADDEO, V.; ZARRA, T.; GIULIANO, S.; BELGIORNO, V. Odour Impact Assessment in Industrial Areas. **Chemical Enginnering Transactions**, v. 30, n. i, p. 85-90, 2012.

NAJIM, T. S.; SALIM, A. J. Polyaniline nanofibers and nanocomposites: Preparation, characterization, and application for Cr(VI) and phosphate ions removal from aqueous solution. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S3459-S3467, 2017.

OLIVEIRA, C. A.; BARNECHE, A. Cultura da Soja no Rio Grande. 2016.

OLSSON, S. B.; HANSSON, B. S. Electroantennogram and Single Sensillum Recording in Insect Antennae. In: **Pheromone Signaling**, v. 1068, p. 157-177, 2013.

ONES, G. R.; OLDHAM, N. J. Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. Journal of Chromatography A, v. 843, n. 1-2, p. 199-236, 1999.

PARTRIDGE, A. C.; HARRIS, P.; ANDREWS, M. K. High sensitivity conducting polymer sensors. **The Analyst**, v. 121, n. 9, p. 1349, 1996.

PASCHOALIN, R. T.; STEFFENS, C.; MANZOLI, A.; PARIS, E. C.; HERRMANN, P. S.P. PANI conductivity: A dependence of the chemical synthesis temperature. **Macromolecular Symposia**, v. 319, n. 1, p. 48-53, 2012.

PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. Influence of Different Dopants on the Adsorption, Morphology, and Properties of Self-Assembled Films of Poly (o-ethoxyaniline). **Journal of Applied Polymer Science**, p. 1309-1316, 2001.

PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. Novos materiais poliméricos para sensores de gases. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 29, p. 1-5, 1998.

PATIL, S. K.; ÇELIK-BUTLER, Z.; BUTLER, D. P. Characterization of MEMS piezoresistive pressure sensors using AFM. **Ultramicrosco;py**, v. 110, n. 9, p. 1154-1160, 2010.

PAVIS, C.; MALOSSE, C.; DUCROT, P.H.; DESCOINS, C. Dorsal abdominal glands in nymphs of southern green stink bug,Nezara viridula (L.) (heteroptera: Pentatomidae): Chemistry of secretions of five instars and role of (E)-4-oxo-2-decenal, compound specific to first instars. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 9, p. 2213-2227, 1994.

PEI, J., FANG, T. F., THUNDAT, T. Glucose biosensor based on the microcantilver. Analytical Chemistry, v. 76, p. 292-297, 2004.

PERKINS, E. A.; SQUIRRELL, D. J. Development of instrumentation to allow the detection of microorganisms using light scattering in combination with surface plasmon resonance. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 14, n. 10–11, p. 853–859, 2000

PERRY, E. D.; CILIBERTO, F.; HENNESY, D.A.; MOSCHINI, G.; QAIM, M.; ZIBERMAN, D.; KATHAGE, J.; BARROWS, G.; SEXTON, S. Genetically engineered crops and pesticide use in U.S. maize and soybeans. **Science Advances**, v. 2, n. 8, p. 900-902, 2016.

PINTO-ZEVALLOS, D. M., MARTINS, C. B. C.; PELLEGRINO, A. C.; ZARBIN, P.H.G. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Quimica Nova**, v. 36, n. 9, p. 1395–1405, 2013.

RAITERI, R.; GRATTAROLA, M.; BERGER, R. Micromecânicos senses biomolecules. Sensors and Actuators B-Chemical, v. 5, n. 1, p. 22-29, 2002.

RAKIĆ, A. A.; TRIFUNOVIĆ, S.; ĆIRIĆ-MARJANOVIC, G. Dopant-free interfacial oxidative polymerization of aniline. **Synthetic Metals**, v. 192, p. 56-65, 2014.

ROSA, T., AROEIRA, G. J. R.; PARREIRA, L. S.; CODOGNOTO, L., SANTOS, M. C.; SIMÕES, F. R. Self-assembled films based on polyaniline/multiwalled carbon nanotubes composites and sulphonated polystyrene deposited onto ITO substrates. **Synthetic Metals**, v. 210, p. 186-191, 2015.

ROTH, S.; GRAUPNER, W. Conductive polymers: Evaluation of industrial applications. **Synthetic Metals**, v. 57, n. 1, p. 3623-3631, 1993.

SAKURAI, T.; NAMIKI, S.; KANZAKI, R. Molecular and neural mechanisms of sex pheromone reception and processing in the silkmoth Bombyx mori. Frontiers in Physiology,

v. 5 MAR, n. March, p. 1-20, 2014.

SALVATIERRA, R. V.; OLIVEIRA, M. M.; ZARBIN, A. J. G. One-pot synthesis and processing of transparent, conducting, and freestanding carbon nanotubes/polyaniline composite films. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 18, p. 5222–5234, 2010.

SANG, S.; ZHAO, Y.; ZHANG, W.; LI, P.; HU, J.; LI, G. Surface stress-based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 51, p. 124-135, 2014.

SCHNEIDER, D. Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners Bombyx mori L. Zeitschrift fr Vergleichende Physiologie, v. 40, n. 1, p. 8-41, 1957.

SILVA, J. S.; BARROS, A.; CONSTANTINO, C. J. L.; SIMÕES, F. R.; FERREIRA, M.; SOROCABA, C. J.; Layer-by-Layer Films Based on Carbon Nanotubes and Polyaniline for Detecting 2-Chlorophenol. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 14, p. 6586-6592, 2014.

SINGAMANENI, S.; LEMIEUX, M. C.; LANG, H. P.; GERBER, C.; LAM, Y.; ZAUSCHER, S.; DATSKOS, P. G.; LAVRIK, N. V.; JIANK, H.; NAIK, R. R.; BUNNING, T. J.; TSUKRUK, V.V. Bimaterial microcantilevers as a hybrid sensing platform. Advanced Materials, v. 20, n. 4, p. 653-680, 2008.

SONENSHINE, D. E. Pheromones: Function and Use in Insect and Tick Control. Life Science, v. 6, n. 2, p. 407-459, 2017.

STEJSKAL, J.; GILBERT, R. G. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 857-867, 2002.

SUCHANEK, J.; DOSTÁL, M.; VLASÁKOVÁ, T.; KLUSÁ ČKOVÁ, M.; KUBÁT, P.; NEVRLÝ, V.; BITALA, P.; CIVIŠ, S.; ZELINGERET, Z. First application of multilayer graphene cantilever for laser photoacoustic detection. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 101, p. 9-14, 2017.

SURESH, M.; VASA, N. J.; AGARWAL, V.; CHANDAPILLAI, J. UV photo-ionization based asymmetric field differential ion mobility sensor for trace gas detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 195, p. 44-51, 2014.

TAMAYO, J.; KOSAKA, P. M.; RUZ, J. J.; SAN PAULO, A.; CALLEJA, M. Biosensors based on nanomechanical systems. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 3, p. 1287-311, 2013.

TANG, R.; SHI, Y.; HOU, Z.; WEI, L. Carbon Nanotube-Based Chemiresistive **Sensors**, v. 17, n. 4, p. 1-16, 2017.

TEWARI, S.; LESKEY, T. C.; NIELSEN, A. L.; PIÑERO, J. C.; RODRIGUEZ-SAONA, C. R. Use of pheromones in insect pest management, with special attention to weevil pheromones. In: ABROL, D. P. Integrated Pest Management. Academic Press, p. 141-168, 2014.

THUNDAT, T. Microcantilevers for physical, chemical, and biological sensing. **Sensors and Sensing in Biology and Engineering**, p. 337-355, 2003.

TURLINGS, T. C. J.; WÄCKERS, F. Recruitment of predators and parasitoids by herbivoreinjured plants. Advances in Isect Chemical Ecology, v. 2, p. 21-75, 2004.

VASHIST, S. A review of microcantilevers for sensing applications. Journal of Nanotechnology, v. 3, p. 1-15, 2007.

VASHIST, S. K.; CZIWIK, G.; VAN ODOORDT, T.; VON STETTEN, F.; ZENGERLE, R.; MARION SCHNEIDER, E.; LUONG, J. H.T. One-step kinetics-based immunoassay for the highly sensitive detection of C-reactive protein in less than 30 min. **Analytical Biochemistry**, v. 456, n. 1, p. 32-37, 2014.

VICKERS, N. J.; CHRISTENSEN, T. A.; BAKER, T. C.; HILDEBRAND, J. G. Odour-plume dynamics influence the brain's olfactory code. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 466-470, 2001.

VIRJI, S.; HUANG, J. X.; KANER, R. B.; WEILER, B. H. Polyaniline nanofiber gas sensors. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, v. 227, p. U104-U104, 2004.

WANG, C. M.; LI, J.; VIEHLAND, D. Magnetoeletrics for magnetic sensor applications: status, challenges and perspectives. **Materials Today**, v. 17, n. 6, p. 269-275, 2014

WEBER, D. C.; MORRISON, W. R.; KHRIMIAN, A.; RICE, K. B.; LESKEY, T. C.; RODRIGUEZ-SAONA, C.; NIELSEN, A. L.; BLAAUW, B. R. Chemical ecology of Halyomorpha halys: discoveries and applications. **Journal of Pest Science**, p. 1-20, 2017.

WEHRENFENNIG, C.; SCHOTT, M.; GASCH, T.; DURING, R. A.; VILCINKAS, A.; KOHL, C.D. On-site airborne pheromone sensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 20, p. 6389-6403, 2013.

WILSON, A.; BAIETTO, M. Applications and advances in electronic-nose technologies. **Sensors**, v. 9, n. 7, p. 5099-5148, 2009.

XU, P.; LI, X; YU, H.; XU, T.Advanced nanoporous materials for micro-gravimetric sensing to trace-level bio/chemical molecules. **Sensors (Switzerland)**, v. 14, n. 10, p. 19023-19056, 2014.

YEW, J. Y.; CHUNG, H. Insect pheromones: an overview of function, form, and discovery. **Progress in lipid research**, v. 59, p. 88-105, 2015.

YEW, J. Y.; CODY, R. B.; KRAVITZ, E. A. Cuticular hydrocarbon analysis of an awake behaving fly using direct analysis in real-time time-of-flight mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 20, p. 7135-7140, 2008.

YEW, J. Y.; CODY, R. B.; KRAVITZ, E. A. Cuticular hydrocarbon analysis of an awake behaving fly using direct analysis in real-time time-of-flight mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 20, p. 7135-7140, 2008.

YU, H.; XU, P.; XIA, X.; LEE, D. W.; LI, X. Micro-/nanocombined gas sensors with functionalized mesoporous thin film self-assembled in batches onto resonant cantilevers. **IEEE Transactions on Industrial Electronics**, v. 59, n. 12, p. 4881-4887, 2012.

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B.; LEAL, W. S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrtural de feromônios de insetos, **Química Nova**, v. 22, n. 2, 1999.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M. Química Nova, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

ZHANG, A.; BORGES, M.; ALDRICH, J. R.; CAMP, M. Stimulatory Male Volatiles for the Neotropical Brown Stink Bug, Euschistus heros (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 713-717, 2003.



CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DE SENSOR DE PANI/PSS PARA DETECÇÃO DO FEROMÔMIO SEXUAL DO PERCEVEJO MARROM

3.1 INTRODUÇÃO

A agricultura vem utilizando a tecnologia para gerenciar a produção agrícola, desde o preparo do solo, controle de pragas, plantação e colheita, com o objetivo de melhorar o desempenho das culturas, com redução de prejuízos e sempre com foco na qualidade ambiental (LAAMRANI et al., 2018).

Mesmo com a modernização, um dos grandes problemas na agricultura são as perdas por pragas, e neste contexto, os feromônios podem ser utilizados para controlar e monitorar insetos, sendo uteis para estimar o tamanho de uma população de insetos através de amostragem de campo. Os feromônios utilizados no manejo de pragas apresentam vantagem de serem compostos naturais, utilizados em pequenas quantidades, se decompõe rapidamente no meio ambiente, são altamente específicos, pois não atuam em organismos não-alvo e permitem a rápida detecção de insetos no campo, auxiliando nas decisões, principalmente em relação a aplicação de produtos químicos.

O percevejo marrom, praga da cultura da soja, tem como principal composto do feromônio sexual, o 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, um éster liberado em pequenas quantidades pelos machos. Esse composto, altamente específico, pode ser utilizado como analito para detecção em sensores, com o objetivo de detectar os percevejos precocemente na lavoura.

Os sensores de cantileveres podem ser desenvolvidos com essa finalidade, uma vez que, dependendo da especificidade da camada ativa, são capazes de detectar pequenas quantidades de analitos, como o feromônio sexual do percevejo marrom.

Dentre as inúmeras possibilidades de funcionalização, os polímeros condutores são bastante explorados. Apresentam baixo custo e boa resposta frente a diferentes moléculas de voláteis, apresentando alta sensitividade (ROZEMARIE, et al., 2017). A Pani, obtida através da síntese interfacial, tem demostrado grande potencial para ser utilizada como camada sensora em sensores de cantilever na detecção de voláteis (STEFFENS et al. 2013).

A forma de funcionalização dos sensores também interfere na sua qualidade, e dentre os diferentes métodos, a deposição por Layer by layer (LbL) tem como vantagem a formação de filmes ultrafinos com materiais poliméricos, possibilitando o controle da espessura, além de ser experimentalmente simples (BRAGA et al., 2008; MANZOLI et al., 2014). Sendo assim, o objetivo do estudo foi desenvolver um sensor de Pani/PSS, utilizando a técnica LbL, para detecção do 2,6,10 trimetiltridecanoato de metila, principal componente do feromônio sexual

do percevejo marrom, sintetizado em laboratório e também avaliar a resposta dos sensores frente a liberação de interferentes.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item serão apresentados os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento dos sensores nanoestruturados de cantilever de Pani/PSS, assim como a resposta destes na detecção do 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, e dos compostos utilizados como interferentes, tridecano, 4-oxo-(E)-2-hexenal e 2-(E)-4-(Z)-decadienoato de metila. Assim como avaliação da resposta dos sensores (tempo de resposta, sensitividade, limite de detecção, repetibilidade e reversibilidade), e caracterização da camada sensora (UV-Vis, PM-IRRAS, MEV e AFM).

3.2.1 Cantileveres

Foram utilizados cantileveres de silício (Si) com módulo de *Young* de $E=1,3x10^{11}$ N/m², no plano <100> de sua estrutura cristalina. A escolha do cantilever de Si foi baseada no fato de ser estável ao longo do tempo e muito utilizado na fabricação de sensores.

Os cantileveres de Si foram adquiridos comercialmente (Budget Sensors[®]) com frequência de ressonância de 13 ± 4 kHz, constante de mola de 0,2 N.m⁻¹, comprimento de 450 μ m, largura de 50 μ m e espessura de 2 μ m, revestido com uma camada de 30 nm de alumínio (camada refletora).

Todos os cantileveres, antes da funcionalização, foram lavados com álcool isopropílico por 2 min em placa de Petri para eliminar quaisquer sujidades presentes. Em seguida, foram secos a temperatura ambiente (25°C) por 30 min.

3.2.2 Síntese Interfacial da Pani

A síntese da Pani foi realizada pela técnica interfacial de acordo com Huang e Kaner (2004). Para a síntese o monômero (anilina, Sigma Aldrich, 99,5 %, USA) foi dissolvido no solvente orgânico (diclorometano, Synth, 99,5 %) e o oxidante (persulfato de amônio, Sigma-Aldrich, 98 %, USA) dissolvido em HCl 1 mol. L⁻¹ (Merck, 99 %, USA). Em seguida, a solução oxidante foi adicionada lentamente à solução de monômero de forma a não ocorrer a mistura das fases. A reação foi deixada em repouso por 2 h, em frasco vedado e protegido da luz a temperatura e umidade ambiente (25°C; 67%). Após o produto da reação foi filtrado (papel filtro Milipore 25 μm) e lavado várias vezes, intercalando lavagens com metanol (Merck, 99,5 %, USA) e água ultrapura.

Após o filtrado foi seco por 20 h em dessecador a vácuo, obtendo-se assim a Pani no estado de oxidação sal esmeraldina. O pó obtido foi utilizado para preparo da solução de Pani, sendo o mesmo utilizado para a funcionalização.

3.2.3 Preparo da solução de Pani

A solução de Pani foi preparada utilizando 10 mg do pó diluído em 1 mL de n, n dimetilacetamida (DMAc, Merck, 99 %) 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 (RAM et al., 1999).

3.2.4 Preparo da solução de PSS

A solução de PSS (Sigma Aldrich), foi preparada utilizando 5 mg de PSS diluído em solução de HCl (1 mol. L⁻¹) pH 3, apresentando concentração final de 0,5 mg. mL⁻¹ (CHEUNG; STOCKTON; RUBNER, 1997; RAM et al., 1999; MANZOLI et al., 2014)

3.2.5 Funcionalização das superfícies dos cantileveres

A funcionalização foi realizada pela técnica de automontagem (LbL), de acordo com a metodologia de Raposo et al. (1997). A definição do número de bicamadas e do tempo de permanência em cada etapa da funcionalização por LbL, foi baseada em trabalhos de cinética de adsorção realizados por Manzoli et al. (2014) e Silva et al. (2014). Também foi realizado um teste preliminar com deposição e avaliação de 10 bicamadas de Pani/PSS nos sensores onde observou-se que a partir da 8ª bicamada houve um aumento na frequência de ressonância dos cantileveres, indicando uma possível alteração nas características dos mesmos, em relação a rigidez. A deposição foi alternada com polímeros de cargas opostas do poliânion (solução de PSS) e policátion (solução de Pani), em ambos os lados do cantilever (superfície superior e inferior) até a formação de sete bicamadas

As bicamadas de Pani/PSS 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 policátion por 3 min, novamente lavado por 1 min e seco por 15 min, conforme ilustrado na Figura 12. Assim, com os testes preliminares e os dados buscados na literatura, definiu-se 7 bicamadas para realização de todos os sensores.

Figura 12 - Representação esquemática da deposição dos filmes de Pani/PSS por meio da técnica de LbL.



Fonte: adaptado de Silva et al. (2014).

Devido ao tamanho reduzido do cantilever e para evitar a funcionalização do seu suporte que pode interferir na constante de mola (k), o mesmo foi recoberto com uma fita de Teflon[®] deixando somente a haste (dois lados – superior e inferior) em contato com as soluções.

3.2.6 Caracterização dos filmes depositados sobre os cantileveres

Para análise da composição química e a orientação das moléculas das camadas depositadas sobre o cantilever utilizou-se a técnica de PM-IRRAS em um espectrofotômetro KSV, modelo PMI 550 (KSV Instruments, Finlândia), com resolução espectral de 8 cm⁻¹ e ângulo de incidência de 81°. Esta análise foi realizada no Instituto de Física da USP, São Carlos/SP.

Para avaliação dos filmes em relação à dopagem, acompanhamento do crescimento e a interação dos filmes automontados, bem como verificar as bandas características dos grupos cromóforos dos filmes, espectros de absorção UV-Vis foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro de UV-Vis (Agilent, modelo 8453E) com varreduras entre 200-1000 nm.

Para a caracterização estrutural da Pani, a difratometria de raios X (DRX) foi realizada em um difratômetro (Rigaku - Mini flex II), operando na geometria convencional 2 θ , sendo que o ângulo da análise se estendeu entre 1,35 a 90°, com as condições de análise: velocidade de varredura: 2.50, passo: 0.05; detector de cobre: 1,54 nm e voltagem do detector: 30 mA.

A técnica de AFM foi utilizada para caracterizar os filmes em relação a morfologia, rugosidade e espessura. As análises foram realizadas em um AFM (Nano Surf, Suíça), utilizando ponteiras de silício anexadas a um cantilever de constante de mola 48 N.m⁻¹ e frequência de ressonância de 190 KHz (*Budget sensors*[®]). Todas as imagens foram obtidas em modo dinâmico com velocidade de varredura de 0,5 Hz. A raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) foi calculada usando o software Gwyddion (Versão 2.18). A Rms é uma função da média do desvio dos picos e vales no perfil da superfície do material (LEITE et al., 2005; BURLAKOV et al., 2016). Para a análise foram utilizadas placas de silício funcionalizadas com filmes de Pani/PSS pela técnica de LbL após a 1^a, 3^a, 5^a e 7^a bicamada depositada.

Para avaliar a deposição dos filmes em cada bicamada a frequência de ressonância foi medida utilizando o AFM e assim, calculada a massa depositada em cada bicamada. A frequência de ressonância avaliada em cada uma das etapas pode ser relacionada com a massa (m) depositada sobre o microcantilever e a constante de mola (K). A variação de massa depositada sobre o cantilever em cada bicamada foi calculada pela Equação 5 (WANG; ZHANG; HE, 2007). Essa avaliação é importante para verificar se houve a deposição das camadas no sensor e também para avaliar se a deposição ocorreu uniformemente, o que pode influenciar na qualidade do sensor desenvolvido. Neste experimento foram utilizados microcantileveres com frequência de ressonância 13 ± 4 KHz e com K= 0,2 N/m.

$$\Delta m = \frac{K}{4\pi^2 n} \left(\frac{1}{f_1^2} - \frac{1}{f_0^2} \right)$$
 Equação 5

onde K=constante de mola, f_1 é a frequência final e f_0 é a frequência inicial do cantilever e *n* é uma constante que depende do cantilever utilizado (0,24 para retangulares) (CHEN et al., 1995).

As alterações na rigidez do cantilever também foram avaliadas após a deposição de cada bicamada. A K_{loaded} foi calculada utilizando a Equação 6 (MANZOLI et al., 2010; PARKIN et al., 2011):

$$K_{loaded} = \left(\left(\frac{f_n - f_{0n}}{f_{0n}} \right) + 1 \right)^2 * \left(K_0 * \left(1 + \frac{m_a}{m_c} \right) \right)$$
 Equação 6

onde: f_n = frequência após cada etapa de funcionalização, f_{0n} = frequência inicial, antes da funcionalização, m_a = massa adicionada sobre o cantilever após cada etapa de funcionalização, m_c = massa inicial do cantilever e K_0 = constante de mola inicial do cantilever.

Para realização das medidas, o cantilever foi acoplado em um canticlipe e anexado ao *scanner* piezoelétrico do AFM, em seguida alinhado o laser e medida a sua intensidade de sinal. A cada bicamada depositada era realizada a medida de frequência de ressonância, sempre em triplicata, ajustando o equipamento para realização de medidas no ar e no modo dinâmico. É importante ressaltar que o equipamento ajusta automaticamente a faixa de frequência de ressonância (harmônico) necessária para causar a vibração do cantilever, de acordo com o modelo do cantilever selecionado.

Para verificar a morfologia superficial dos filmes formados, quanto ao tamanho, forma e distribuição dos grãos ou fibras de Pani foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL, JSM- 6701F) operando a 5 kV.

Para a observação das superfícies dos cantileveres não funcionalizados e funcionalizados com os filmes LbL de Pani/PSS com ampliações de algumas dezenas até milhares de vezes as dimensões físicas foram avaliadas em um microscópio (Olimpus CX41) com um aumento de 100X, acoplado a uma câmara digital (Opton 5.0 mp) e as imagens digitalizadas em computador com o auxílio do *software* Motic Image Plus 2.0.

Para avaliar a molhabilidade que pode ser representada pelo ângulo entre o contorno da superfície da gota e a interface líquido/sólido, denominado ângulo de contato foram realizadas medidas em aparelho KSV Instruments, através da deposição de uma gota de água ultrapura (tensão superficial de 72,7 mJ/m²) sobre superfícies não funcionalizadas e funcionalizadas. Os experimentos foram realizados no Instituto de Física da USP, São Carlos/SP.

3.2.7 Avaliação dos sensores nanoestruturados de cantilever

Para avaliar a resposta dos sensores nanoestruturados foi projetada uma câmara de polipropileno com volume de 6,38 cm³. A câmara contém um orifício central superior com 25 mm de diâmetro e 13 mm de altura para o encaixe da cabeça do *scanner* piezoelétrico do AFM, dois orifícios laterais para a entrada e saída dos compostos voláteis. Para vedação da câmara foi utilizada um filme de borracha (K-dent, USA) na parte inferior e um anel de borracha de vedação (na parte superior (Figura 13). Entre a câmara e a borracha superior, foi inserido

sensor comercial de temperatura e umidade (Sensirium Kit EK-H5, resolução SHT2x) para monitorar as condições do experimento.

Figura 13 - Diagrama esquemático (a) e imagem real (b) da câmara desenvolvida para detecção dos voláteis com suas medidas.



Fonte: o autor.

A câmara foi construída com o menor volume possível para que possa ocorrer a vibração do cantilever e avaliação da frequência de ressonância sem a interferência das paredes internas da mesma, assim, não influenciando na resposta do sensor.

Para realização dos testes foi utilizado o principal componente do feromônio sexual do percevejo marrom, o composto 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, sintetizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

O composto é líquido a temperatura ambiente, apresenta densidade de 0,9 \pm 0,1 g/cm³e massa molecular de 270 g/mol e foi utilizado 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 e ZARBIN, 2006).

Para avaliar a resposta dos sensores foi calculado a concentração do composto feromonal, 2,6,10-trimetiltridecanoato, no interior da câmara, considerando a quantidade deste presente na alíquota inserida (20µL), para cada concentração.

Para o cálculo (Equação 7) foi considerado o volume da câmara (6,38cm³), a temperatura (25°C) e a pressão atmosférica na cidade de Erechim (0,9158 atm), de acordo com a estação meteorológica automática experimental de Erechim, localizada a latitude de 27°38'45,5", longitude de S 52°16'19,1"W e altitude de 664m) (STEFFENS et al., 2014) e está expressa na Tabela 1.

$$\gamma i(ppm) = \frac{V voc \times \rho(voc)}{MW(voc)} \times \frac{R \times T}{P \times V(c\hat{a}mara)}$$
 Equação 7

onde: Vvoc (L) é volume do composto, ρ (g/L) é a densidade do composto, MW (g/mol) é a massa molar do composto, R=(0,0820574587 (L*atm*K⁻¹*mol⁻¹) é a constante dos gases, T (K) é a temperatura, P (atm) é a pressão e V (L) volume da câmara.

Tabela 1 - Concentração do composto feromonal, 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, no interior da câmara, para cada concentração inserida.

Concentração (µg/mL)	Concentração do composto na câmara (fg/mL) *
0,005	1,4
0,01	2,9
0,05	14,5
0,1	28,9
0,2	57,8
0,3	86,8

 $fg = 10^{-15}$.

Fonte: o autor.

O solvente utilizado para auxiliar no carreamento dos compostos até o sensor, foi o *n*-hexano, uma vez que o 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, mesmo sendo um composto relativamente volátil, nesse modelo experimental necessita de um solvente orgânico mais volátil, para auxiliar no transporte até o sensor. Vários trabalhos na literatura mostram que o *n*-hexano não é capaz de atrair os percevejos, portanto não interferindo na resposta quando projetada sua utilização no campo (BORGES et al., 1998; ZARBIN et al., 2000; PIRES et al., 2006).

Para avaliação leitura da resposta do sensor nanoestruturado de Pani/PSS, primeiramente o cantilever foi colocado em um porta cantilever (canticlipe) e encaixado na cabeça do *scanner* piezoelétrico do AFM. Então, a câmara foi encaixada na cabeça do *scanner*, sendo vedada com anel de borracha. O sinal do laser foi ajustado na extremidade final do cantilever e ajustado no centro do fotodetector de quatro quadrantes, sendo que a intensidade foi verificada, ficando em torno de 70%.

A frequência de ressonância dos cantileveres (com e sem funcionalização) foi avaliada na presença de diferentes concentrações do feromônio e na ausência do mesmo (branco). Para realização das medidas foi selecionado o modelo do cantilever no software do AFM e o equipamento faz a seleção da faixa de frequência de ressonância adequada (harmônico) para a vibração do cantilever.

Uma alíquota de 20 μ L de cada concentração do feromônio (sempre da menor para maior concentração) foi adicionada, com o auxílio de uma microseringa, sobre um pedaço de papel filtro (Milipore 25 μ m) que foi acoplado no fundo câmara desenvolvida.

Antes de iniciar as medidas com o composto (2,6,10-trimetiltridecanoato de metila), os sensores foram mantidos em contato com ar sintético (White Martins 99%) por 2 min, tempo necessário para estabilização da frequência de ressonância. Posteriormente o composto feromonal foi introduzido na câmara e então avaliada a resposta do sensor realizando medidas a cada 20 s por 5 min. Depois de cada concentração avaliada, o papel filtro foi retirado e adicionado novamente ar sintético para fazer a limpeza da câmara.

Cabe ressaltar que as medidas foram realizadas utilizando um canticlipe para medidas em ar, sempre no modo dinâmico do AFM.

Os sensores também foram expostos ao *n*-hexano, solvente utilizado nas diluições dos compostos feromonais, por 5 min avaliando a frequência de ressonância a cada 20 s, com o intuito de avaliar se as respostas dos sensores poderiam estar sofrendo interferência do solvente.

Em todos os experimentos a temperatura foi controlada e monitoradas, através de um modulo controlador (Nanosurf, Suiça), e a umidade relativa com um sensor comercial (Sensirium Kit EK-H5, resolução SHT2x).

Além do sensor utilizado no interior na câmara e do controlador de temperatura externa, também foi utilizado um sistema de resfriamento, para auxiliar na manutenção da temperatura interna e reduzir a interferência dos ruídos do ambiente, de acordo com a Figura 14.

Figura 14 - Sistema de resfriamento do equipamento de microscopia de força atômica desenvolvido para controle de temperatura e minimização de ruídos.



Esse sistema de resfriamento do AFM foi desenvolvido tendo como base uma pastilha Peltier com dimensões de 50 x 53 mm. Este elemento, quando ligado a uma fonte de corrente contínua (CC) teve uma de suas faces resfriadas e a outra aquecida. Em ambas as faces foram acoplados dissipadores de calor aletados. Para minimização de ruídos e interferências nas respostas, usou-se uma caixa de fibra de média densidade (MDF) sobre a parte do equipamento que ficava o cantilever em contato com a amostra. A face resfriada e seu dissipador ficaram na parte interna da caixa enquanto que a face aquecida e seu dissipador ficaram na parte externa. O dispositivo foi montado na parte superior da caixa em uma abertura feita para sua fixação. Em cada dissipador de calor foi colocado um microventilador, ambos alimentados pela mesma fonte de energia que aciona a pastilha Peltier (MARTINAZZO, 2017) conforme demonstrado na Figura 20.

A partir destes dados foi elaborada uma curva de calibração que permitiu avaliar diferentes características dos sensores, como sensitividade, limite de detecção e histerese.

3.2.7.1 Caracterização da resposta dos sensores frente ao composto 2,6,10trimetiltridecanoato de metila

O tempo de resposta é importante para avaliar o desempenho dos sensores, e pode ser definido como o tempo que o sensor leva para responder a uma mudança na concentração do feromônio, sendo obtida em 63,2% do seu valor máximo estável (CUI et al., 2012; RINAUDO et al., 2016; STEFFENS et al., 2014). O tempo de resposta foi obtido pela linha de base (exposto ao ar) medida a cada 20 s por 2 min, e após na concentração de 0,3 µg/mL do composto 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila a cada 20 s por 2 min.

A sensitividade demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e é expressa pelo coeficiente angular da curva analítica (PASCHOAL et al., 2008). A resposta dos sensores nanoestruturados a diferentes concentrações do composto 2,6,10trimetiltridecanoato de metila (0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 μ g/mL), e assim, avaliado a sensitividade do sensor, pelo coeficiente angular por meio da curva de calibração.

O limite de detecção de um sensor pode ser definido como a menor concentração de um analito que pode ser distinguida com certo nível de confiança. Neste estudo, o limite de detecção foi calculado de acordo com a recomendação da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (LOOCK e WENTZELL, 2012). Por meio da curva de calibração nas diferentes concentrações do composto 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila (0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 µg/mL), o limite de detecção (LD) foi definido como a concentração analítica que

gera uma resposta com um fator de confiança k superior ao desvio padrão do branco (S_b) (Equação 8):

$$LD = \frac{kS_b}{m}$$
 Equação 8

onde: S_b é o desvio padrão do branco, *m* é sensibilidade da calibração, *k* é o fator que corresponde ao nível de confiança, um valor de k de 2 corresponde a um nível de confiança de 92,1 %, enquanto um valor de 3 corresponde a um nível de confiança de 98 %, sendo utilizado neste estudo uma confiança de 98 %.

A reversibilidade (η) demonstra a capacidade de um sensor poder voltar ou não a sua condição inicial, depois de interrompida a exposição ao analito (JANATA e JOSOWICZ, 2003). Os sensores nanoestruturados foram expostos a uma concentração de 0,3 µg/mL do composto 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, e a ar sintético, alternadamente, por 8 ciclos, e a partir destes dados foi calculada a reversibilidade com a Equação 9 (STEFFENS et al., 2009).

$$\eta = \frac{(F - F_f)}{(F - F_0)} x \ 100$$
 Equação 9

onde: Fo é a frequência inicial do sensor; F é o valor de frequência após exposição ao feromônio e F_f é a frequência final do sensor.

A histerese é definida como a diferença do comportamento da saída do dispositivo para um mesmo valor de entrada, dependendo se o sinal está subindo ou descendo em amplitude. A histerese dos sensores foi avaliada submetendo o mesmo sensor a ciclos de aumento e redução na concentração do composto feromonal (2,6,10-trimetiltridecanoato de metila), aumentando a concentração de 0,005 para $0,3\mu g/mL$, e após diminuindo de 0,3 para $0,005\mu g/mL$. A resposta dos sensores nanoestruturados foram avaliadas a cada 20 s, por 2 min em cada concentração e entre as medidas era realizada a limpeza da câmara com ar sintético e a troca do papel filtro.

A durabilidade foi avaliada a cada 10 dias por um período de 30 dias, sendo que os sensores nanoestruturados foram mantidos em um dessecador, e calculados o limite de detecção e sensitividade dos sensores em todos os períodos avaliados.

3.2.7.2 Avaliação de interferentes na resposta dos sensores nanoestruturados

A resposta dos sensores nanoestruturados a substâncias quimicamente semelhantes ao 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila foi avaliada utilizando os compostos 4-oxo-(E)-2-hexenal, tridecano e o 2-(E)-4-(Z)-decadienoato de metila, que são compostos defensivos também produzidos pelos percevejos, ninfas e adultos, machos e fêmeas.

O 4-oxo-(E)-2-hexenal, apresenta densidade de 1 g/cm³ e peso molecular de 112,1 g/mol, é específico de percevejos e nunca foi identificado em nenhum outro organismo vivo. Já o 2-(E)-4-(Z)-decadienoato de metila, composto com peso molecular de 182,3 g/mol e densidade de 0,9 g/cm³, além de ser produzido pelo percevejo *E. heros*, também é produzido por outros percevejos do gênero. O tridecano apresenta peso molecular de 184,4 g/mol e densidade de 0,76 g/cm³, e é produzido como um composto defensivo, por machos e fêmeas do percevejo marrom (BORGES et al., 2001).

Os interferentes foram sintetizados e cedidos pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia de Brasília e, para o experimento foram diluídos em *n*-hexano, e utilizados na concentração de 0,005µg/mL. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições que os realizados com o 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila.

3.2.7.3 Análise Estatística

Os resultados de sensitividade e limite de detecção, referentes a durabilidade, e os dados de rugosidade foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 95% de confiança, utilizando o *software* Origin 8.5.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização da Pani

As bandas de absorção características da Pani (dopada) sintetizada pela técnica interfacial foi avaliada em relação a cristalinidade e a orientação do polímero utilizando a técnica de DRX (Figura 15). Observa-se a presença dos picos típicos da Pani em 9, 15, 21 e 25°, cujas posições em 2 Θ também foram encontradas por Zang et al. (2002), Galinani et al. (2007) e Steffens et al. (2014). A presença desses picos está relacionada a cristalinidade da amostra, assim como o pico em pico em 19° (DU; XIAO; MENG, 2004).




Fonte: o autor.

Os picos em 21 e 25°, característicos da Pani, representam a periodicidade perpendicular e paralela das cadeias (POUGET et al., 1991; CAI et al., 1997) No presente estudo a Pani dopada com HCL apresentou picos levemente deslocados (21,35° e 25,85°), sendo que essas pequenas variações na posição dos picos podem ocorrer pelo tipo de dopante, por diferentes graus de dopagens, preparação da amostra e tamanho da partícula de Pani (ZHANG et al., 2004). De acordo com Pouget et al., (1991), a alta intensidade do pico em 25° se relaciona com a cristalinidade do polímero, que também foi observado no presente estudo (Figura 24).

O difratograma de raios X também mostra um pico em 6,5°. Em estudos realizados por Yin et al.(2008) e Steffens (2012), os autores também observaram a presença desse pico e relacionaram a presença de nanofibras de Pani em sua estrutura.

3.3.2 Caracterização dos filmes de Pani/PSS

O crescimento e uniformidade dos filmes de Pani/PSS foi monitorado por espectroscopia UV-Vis a cada bicamada depositada em substrato de quartzo, utilizando comprimento de onda de 200 a 600 nm. A Figura 16 mostra o espectro de absorção dos filmes de Pani/PSS até a 7^a bicamada, com ênfase no pico de absorção de 241 nm. Sendo este pico em 241 nm característico dos anéis aromáticos tanto da Pani quanto do PSS (OGAWA e KOMATSU, 2007).

Figura 16 - Espectro de absorção (200 a 600 nm) no UV-Vis do filme de Pani/PSS a cada bicamada formada (a) e crescimento das bicamadas de Pani/PSS em 241 nm (b).



Fonte: o autor.

Na Figura 16 b pode-se observar uma dependência linear da absorbância com o número de bicamadas depositadas (R² =0,99), indicando que cada bicamada depositada contribuiu com uma quantidade de material semelhante na formação do filme.

O espectro de absorção mostrou uma banda em 241 nm e uma leve banda em 320 nm, associadas à transição do elétron do orbital ligante (π) para orbital antiligante (π^*), relacionadas respectivamente, aos anéis benzóide e quinóide da cadeia de Pani (LI et al., 2010). Também se observa uma banda em 470 nm, responsável pela transição do elétron antiligante (π^*) para banda polarônica (GAJESDRAN e SARASWATHI, 2008).

A espectroscopia de PM-IRRAS é uma variação da espectroscopia de infravermelho comum, que combina a reflexão no infravermelho transformada por Fourier e a modulação da polarização da luz incidente de alta frequência, permitindo inferir sobre a orientação de dipolos sobre filmes depositados sobre substratos sólidos refletores (MENDELSOHN; MAO; FLACH, 2010). A Figura 17 mostra os espectros de PM-IRRAS dos filmes de Pani/PSS, funcionalizados pela técnica de LbL, com bandas de absorção em 1145 cm⁻¹, 2307 cm⁻¹ e 3699 cm⁻¹.

Figura 17 - Espectros de PM-IRRAS dos filmes desenvolvidos com Pani/PSS sobre superfícies de silício.



Fonte: o autor.

A banda de absorção em 1145 cm⁻¹ está relacionada as ligações C-H do anel aromático da Pani e a banda de absorção em 3699 cm⁻¹ pode ser atribuído ao modo de estiramento N-H, que no caso da Pani, no seu estado dopado, é associada a alta condutividade elétrica (WESSLING, 1998). A banda de absorção em 2307 cm⁻¹ pode ser atribuída a presença do PSS e é relacionada ao estiramento assimétrico do C-H (FALL et al., 2003).

Essas características indicam que a funcionalização do cantilever realizada pela técnica de LbL com Pani/PSS ocorreu de forma eficaz.

A MEV mostra a microestrutura do filme de Pani/PSS, onde verifica-se uma estrutura globulosa, na forma de grumos, interconectadas de forma aleatória em toda a superfície.

Segundo Chao e colaboradores (2010), a morfologia e a cristalinidade da polianilina dependem da maneira como o polímero é sintetizado. A Figura 18 mostra a imagem da amostra de Pani/PSS com uma estrutura granular e porosa que, segundo Mattoso (1996), ocorre quando a Pani está dopada.

A formação de um filme espesso, com falhas e sem uniformidade pode interferir na detecção do analito em questão, perdendo sensitividade e qualidade do sensor desenvolvido (BOISEN et al., 2012; FRAGOSO-MORA et al., 2018).

Figura 18 - Micrografia dos filmes de Pani/PSS sob superfície de silício, com aumento na escala de 5000 vezes.



Fonte: o autor.

Para avaliar a frequência de ressonância a cada bicamada depositada e também a rugosidade dos filmes após a deposição da 1^a, 3^a, 5^a e 7^a bicamada foi utilizada a AFM. A frequência de ressonância foi obtida em modo dinâmico, em triplicata, a $25^{\circ}C\pm0,3^{\circ}C$ de temperatura e $64\%\pm0,9\%$ de umidade relativa. A Figura 19 apresenta a média das frequências de ressonância após cada bicamada da funcionalização com Pani/PSS.

Figura 19 - Frequência de ressonância a cada bicamada de Pani/PSS depositada sobre os cantileveres.



Fonte: o autor.

Os sensores nanoestruturados avaliados apresentaram um decréscimo gradual da frequência de ressonância após cada bicamada depositada, e este pode ser relacionado diretamente com a massa (m) e a constante de mola (K), sugerindo assim a deposição dos filmes nos sensores. A frequência inicial dos cantileveres de Pani/PSS se enquadram na faixa de frequência de ressonância indicada pelo fabricante (13KHz±4). Pode-se observar uma redução de aproximadamente 5% na frequência inicial após a adição da sétima bicamada de Pani/PSS e que esta redução ocorreu de forma linear (R^2 =0,99). É importante destacar que a uniformidade das deposições entre as camadas é fundamental para a qualidade do sensor, uma vez que a deposição do filme interfere no fator de qualidade, e assim, na sensitividade e no limite de detecção (LEITE et al., 2005; SUSHET et al., 2016).

A Tabela 2 mostra a massa adicionada a cada bicamada, sendo possível observar o aumento desse valor a cada etapa da funcionalização, o que comprova a deposição do material sobre a superfície do cantilever, indicando também que não ocorreu alteração na rigidez (relacionada ao K). A camada sensora aumenta a espessura do cantilever, podendo atuar como um amortecedor alterando a eficiência da excitação, exigindo mais energia para manter a vibração assim alterando a frequência de ressonância (MARGARIDO et al., 2016).

A massa final do cantilever funcionalizado com Pani/PSS foi de 93,56 ng, indicando um aumento na massa inicial do cantilever próximo a 18%.

Etapas da Construção do sensor	Pani/PSS	
	K (N.m ⁻¹)	Massa (ng)
Sem funcionalização	0,20	79,4
1ª bicamada	0,20	82,4
2ª bicamada	0,20	83,87
3ª bicamada	0,20	84,93
4ª bicamada	0,20	85,56
5ª bicamada	0,20	87,03
6ª bicamada	0,20	91,03
7ª bicamada	0,20	93,56

Tabela 2 - Valores de constante de mola (K) e variação de massa para as etapas de construção do sensor de cantilever com Pani/PSS.

Fonte: o autor.

A Figura 20 e a Tabela 3 apresentam, respectivamente, as imagens de AFM em 3D e os valores de rugosidade das superfícies dos sensores após a deposição da 1ª, 3ª, 5ª e 7ª bicamada de Pani/PSS por LbL.

Pelas imagens de AFM pode-se observar a deposição do filme sobre o cantilever, mostrando a morfologia globular típica da Pani. Pode-se observar que com o aumento do número de bicamadas as estruturas globulares uma tendência de formar aglomerados (locais com intensidade de cor mais claras) e indicam a deposição da Pani em cada bicamada. A morfologia dos filmes pode influenciar fortemente o desempenho dos sensores, uma vez que mudanças da área/volume da superfície polimérica podem alterar a sensitividade e o tempo de resposta dos sensores (HAARLEY et al., 2016; SHERING et al., 2016).

De acordo com a Tabela 3, os filmes de Pani/PSS apresentaram um aumento da rugosidade (Rms) a cada bicamada depositada com diferença significativa entre elas ($P \le 0,05$). Este aumento é um indicativo da deposição do filme sobre a superfície. O valor da rugosidade também é um importante parâmetro utilizado na avaliação de sensores, uma vez que um maior valor de rugosidade implica também em um aumento na área superficial, podendo facilitar a ancoragem e ligações com outras moléculas de interesse, aumentando a interação com a superfície do analito (CHUNG et al., 2015).

Figura 20 - Imagens de AFM em 3D dos filmes de Pani/PSS obtidos com as técnicas LbL após a 1ª bicamada, 3ª bicamada, 5ª bicamada e 7ª bicamada.



Fonte: o autor.

Número de bicamadas	Rms (nm)
1	6,21 ^d ±1,1
3	19,10 ^c ±1,62
5	30,00 ^b ±1,4
7	33,63 ^{ab} ±1,8

Tabela 3 - A raiz quadrada da média da rugosidade (Rms) dos filmes LbL de Pani/PSS.

*dados expressos como média±desvio padrão. As letras iguais na coluna indicam não haver diferença significativa a nível de 5 % (Teste de Tukey) entre as bicamadas depositadas. Fonte: o autor.

A pequena variação da rugosidade da quinta para sétima bicamada, pode estar relacionada a tendência dos aglomerados de Pani crescerem pela deposição subsequente de material. Essa deposição pode acontecer devido a coalescência e redução da altura entre picos e vales e maior preenchimento dos vales (SHERING et al., 2016).

A espessura do filme foi medida na imagem topográfica na região do degrau formado entre o filme e o silício com a técnica de AFM, sendo esta realizada após a deposição da sétima bicamada. A espessura do filme de Pani/PSS foi de 87 nm, compreendido na escala nanométrica, que pode influenciar diretamente na sensitividade dos sensores por apresentar uma grande área superficial.

As medidas de ângulo de contato foram usadas para mostrar as modificações superficiais, definindo as propriedades de molhamento das superfícies não funcionalizadas e funcionalizadas com o filme fino de Pani/PSS (Figura 21). Pelo espalhamento da gota for de 90 graus ou menos tem-se superfícies hidrofílicas (maior molhabilidade), enquanto que nas superfícies hidrofóbicas este é acima de 90 graus (menor molhabilidade). O valor de ângulo de contato foi de 80,01 graus para a superfície não funcionalizada, enquanto que a funcionalizada com Pani/PSS foi de 121,19°, indicando que a superfície foi modificada e que estes filmes desenvolvidos apresentam características hidrofóbicas, uma vez que o filme de Pani/PSS depositado sobre a superfície de silício causou um aumento na tensão superficial.

Figura 21 - Perfil do ângulo de contato nos ensaios de molhabilidade, realizados com água, dos filmes de Pani/PSS.



Fonte: o autor.

A Pani no seu estado dopado normalmente apresenta características hidrofílicas. Blinova et al., (2012) observaram um ângulo de contato de 63° para filmes de Pani, depositados em superfície de silício pela técnica de *spin-coating*. Steffens et al. (2014) também observaram um ângulo de contato de 53° para Pani dopada com HCl depositada em uma superfície de silício pela técnica de *spin-coating*. Porém, dependendo da técnica utilizada para formar os filmes e dos componentes associados, a Pani pode apresentar características diferentes.

De acordo com Fujimoto et al. (2008), a funcionalização com Pani e copolímeros aniônicos, depende do pH e a cada bicamada depositada diminui a densidade de carga da Pani, reduzindo sua solubilidade. Quando a funcionalização é realizada através de camadas automontadas, como na LbL, cada camada subjacente adicionada interfere na hidrofobicidade do sensor, uma vez que ocorre uma reorganização e interpenetração dos componentes (CHEN; LUO; CAO, 2001).

A microscopia óptica foi utilizada para observar as diferenças nos sensores funcionalizados e não funcionalizados, apresentada na Figura 22. Os sensores não funcionalizados (branco) apresentam um aspecto liso e uniforme, enquanto os sensores funcionalizados com filmes de Pani/PSS, evidenciam a deposição pela visualização de grumos.

Figura 22 - Imagens de microscopia óptica das superfícies dos cantileveres funcionalizados com Pani/PSS e não funcionalizados (branco) (Imagens com aumento de 100X).



Fonte: o autor.

3.3.3 Resposta dos sensores funcionalizados com Pani/PSS ao composto feromonal 2,6,10trimetiltridecanoato de metila

Para definição das concentrações, primeiramente foi realizado um teste piloto, com o sensor de Pani/PSS, utilizando concentrações de 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, que variaram de 0,005 mg/mL até 0,1 mg/mL, sendo que os sensores conseguiram detectar essas concentrações de forma linear (Figura 23). Assim, optou-se por realizar uma nova curva de calibração com concentrações menores, que variaram de 0,005 até 0,3 μ g/mL, com o intuito de conseguir detectar a quantidade liberada pelo percevejo marrom, *E. heros*, uma vez que um adulto macho libera quantidades pequenas deste composto, em torno de 2,5 μ g/24 h (ZHANG et al., 2003).

Figura 23 - Teste preliminar para avaliar a resposta dos sensores de Pani/PSS frente ao composto feromonal 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila.



Fonte: o autor.

A resposta dos sensores sem e com funcionalização foi avaliada na detecção do composto feromonal 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, ao ar sintético e ao *n*-hexano (Figura 23). A sensitividade e o limite de detecção foram avaliados em diferentes concentrações em triplicata. A temperatura para realização deste experimento foi de $25^{\circ}C\pm0,3^{\circ}C$ e a umidade de $67\%\pm0,8\%$.

A resposta dos sensores nanoestruturados foi avaliada na presença do solvente *n*-hexano (99%, Merk), para avaliar a interferência deste nas medidas. Verificou-se que os sensores funcionalizados não sofreram alterações na frequência de ressonância, apresentando o mesmo comportamento que as medidas no ar, indicando que o solvente não interferiu na resposta.

Pode-se observar que os sensores funcionalizados com Pani/PSS (R²=0,95) (Figura 24 e 25), foram sensíveis ao composto feromonal 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, diminuindo a frequência de ressonância com o aumento das concentrações. Por outro lado, o sensor não funcionalizado (Branco) não apresentou variação na resposta na exposição as diferentes concentrações do composto, indicando que a camada sensora de Pani/PSS depositada sobre o cantilever é responsável pela sensitividade.

Figura 24 - Resposta do sensor com funcionalização de Pani/PSS e sem funcionalização (branco) ao composto 2,6,10 trimetiltridecanoato de metila.



Fonte: o autor.



Figura 25 - Resposta do sensor com funcionalização de Pani/PSS ao ar e ao hexano.

Fonte: o autor.

A sensitividade e limite de detecção do sensor nanoestruturado foram de 5.28 fg/Hz e 1,44 fg/mL, respectivamente. Sensores nanomecânicos que avaliam frequência de ressonância permitem uma extraordinária sensitividade de massa, desde que apresentem uma camada sensitiva adequada (BURG et al., 2007). Vashist et al. (2010) relata que sensores de cantileveres podem detectar vestígios de substâncias em ppb, ppt e até ppq, através da interação entre a camada sensitiva do sensor e o analito.

Outros fatores que podem ter contribuído para o desempenho dos sensores nanoestruturados são a miniaturização e o comportamento exibido pela molécula alvo, que causou uma resposta, resultante da interação da Pani com o adsorbato causando mudanças na frequência de ressonância. A estrutura globular e porosa da Pani, visualizada no MEV e o aumento da rugosidade observado após a deposição das bicamadas, contribui para o alto desempenho do sensor, permitindo a presença de mais sítios de ligação.

Na literatura existem vários trabalhos onde foram desenvolvidos sensores para diferentes finalidades, porém utilizando o mesmo princípio mecânico baseado em adsorção de massa em cantileveres. Sone et al. (2004) desenvolveram um sensor de massa piezoelétrico baseado em cantilever, com circuitos de Wheatstone para avaliação da adsorção molecular de água e conseguiram uma sensitividade de 2 pg/Hz. Sumio et al. (2006) também desenvolveram um sensor de massa piezoelétrico semelhante para avaliar a umidade no ar e estimaram uma sensibilidade de 200 fg/Hz. Gruber et al. (2011), desenvolveram um arranjo de sensores de cantileveres para aplicação no diagnóstico de doenças, como câncer ou HIV, com o objetivo de

detectar interações entre proteínas e carboidratos e obtiveram sensitividade em picomolar (91pM) da proteína (cianovirina –N).

Llic et al. (2005), desenvolveram nanocantileveres de nitreto de silício com 90 nm de espessura e estes foram utilizados para detectar uma única molécula de DNA com 1578 pares de bases de comprimento, utilizando nanoparticulas de ouro nas extremidades do cantilever conseguindo detectar uma molécula com massa de cerca de 0,23 attogramas (1 attograma = 10^{-18} gramas). Steffens et al. (2014) desenvolveram um sensor de microcantilever funcionalizado com Pani para detecção de 2-heptanona, feromônio da abelha, apresentando sensitividade de 0,67 nm/ppm e limite de detecção de 21 ppm_v. Moitra et al. (2016) desenvolveram um dispositivo MEMS miniaturizado, que foi funcionalizado covalentemente para a detecção de feromônios sexuais de *Helicoverpa armigera*. O sensor de cantilever foi desenvolvido a partir de silício e dióxido de silício, funcionalizado com APTES e conseguiu detectar concentrações de feromônio na ordem de fentograma.

Outros tipos de sensores para detecção de feromônios são relatados como o biossensor de impedância eletroquímica revestidos com proteínas olfativas da abelha com limite de detecção de micromoles (LU et al., 2014); sensor baseado em receptores de células odoríferas de insetos com sensitividade em ppb (MITSUNO et al., 2015).

Neste trabalho foi obtido um baixo limite de detecção (1,44fg/mL) com os sensores nanoestruturados funcionalizados com Pani/PSS para detectar o feromônio sexual do percevejo marrom, *Euschistus heros*. Como os machos deste inseto liberam em torno de 2,5µg/dia do feromônio (ZHANG et al., 2003), o sensor desenvolvido pode detectar essa quantidade, indicando que os resultados deste estudo pode ser vislumbrados para futuras aplicações no campo.

Para avaliação da histerese, um mesmo sensor foi submetido a um ciclo de aumento (de $0,005 \mu g/mL$ para $0,3 \mu g/mL$) e redução ($0,3 \mu g/mL$ para $0,005 \mu g/mL$) do composto feromonal 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila (Figura 26). Os valores de histerese foram determinados por meio da diferença do valor médio a cada concentração avaliada de forma ascendente e descendente, obtendo-se um valor médio de 0,01%, demonstrando uma baixa histerese e que o sensor apresentou praticamente o mesmo percurso.





Fonte: o autor.

A resposta da estabilidade do sensor nanoestruturado, avaliados a cada 10 dias durante 30 dias é mostrada na Figura 27.

Figura 27- Avaliação da resposta do sensor de Pani/PSS durante 30 dias de armazenamento.



Fonte: o autor

A Tabela 4 mostra a resposta de sensitividade e limite de detecção do sensor nanoestruturado de Pani/PSS durante 30 dias de estocagem. Verificou-se uma diminuição do limite de detecção (aumento do valor) apresentando diferença significativa (p<0,05) do 1º para

10° dia de estocagem avaliado, enquanto que do 10 para o 30 ° não houve diferença significativa (p>0,05). Essa diminuição do limite de detecção, segundo Steffens et al. (2014), pode estar associada a possível lixiviação do dopante utilizado na camada sensora de Pani.

Tabela 4 - Resposta de sensitividade e limite de detecção dos sensores nanoestruturados de Pani/PSS durante a estocagem.

Estasson (diss)	Limite de detecção (fg.mL ⁻¹)	Sensitividade (Hz/fg.mL ⁻¹)
Estocageni (unas)	Pani/PSS	Pani/PSS
0	1,44 ^b ±0,06	5,28 ^a ±0,14
10	$1,66^{a}\pm0,07$	4,57 ^b ±0,13
20	1,67 ^a ±0,03	$4,55^{b}\pm0,18$
30	$1,60^{a}\pm0,05$	$4,72^{b}\pm0,15$

* Dados apresentados como média (três repetições) ± Desvio Padrão. Letras iguais na coluna indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey) entre os diferentes dias avaliados.

Fonte: o autor.

Para a sensitividade verifica-se um aumento ao longo da estocagem com diferença significativa (p<0,05) entre 1° e 30° dia. Mesmo observando essas diferenças significativas em relação ao limite de detecção e a sensitividade, os resultados mostram que mesmo após 30 dias, os sensores conseguem detectar pequenas quantidades dos voláteis, na ordem de fentograma (10^{-15}) , características excelentes quando comparado com a EAG (eletroantenografia). Em estudo para detecção e avaliação de compostos feromonais ativos em insetos usando a EAG a durabilidade média encontrada foi 2 h (MORAES et al., 2008). Assim, os sensores desenvolvidos neste trabalho se mostram superiores em relação a esta característica.

O tempo de resposta dos sensores nanoestruturados de Pani/PSS apresentaram um tempo de resposta de 37,8s (Figura 28).

Figura 28 - Tempo de resposta dos sensores de Pani/ PSS.



Fonte: o autor.

Em relação a reversibilidade os sensores foram reversíveis (98%) aos 8 ciclos de exposição ao 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila e de ar sintético avaliados (Figura 29).

Figura 29 - Repetibilidade dos sensores nanoestruturados de Pani/PSS.



Fonte: o autor.

Os resultados indicam que um mesmo sensor de Pani/PSS pode ser utilizado de forma consecutiva para determinação da presença do composto feromonal, pois obtiveram recuperação completa a linha de base após consecutivos ciclos.

A resposta dos sensores foi avaliada na exposição do 4-oxo-(E)-2-hexenal, do tridecano e do2-(E)-4-(Z)-decadienoato de metila, na concentração de $0,005\mu$ g/mL (Figura 30). Os testes foram realizados da mesma forma que os testes com o 2,6,10 trimetiltridecanoato de metila, com temperatura de 25±0,6°C e umidade de 65%±0,9%.

Pode-se observar que os sensores de Pani/PSS detectaram a presença dos interferentes, porem a frequência de ressonância observada para os interferentes é diferente da observada para o composto 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila. Esses dados mostram que o sensor de Pani/PSS não foi específico para o composto em estudo, mas apresentou uma resposta diferente, possibilitando a discriminação dos compostos.



Figura 30 - Avaliação de interferentes na resposta dos sensores de Pani/PSS.

Fonte: o autor.

3.4 CONCLUSÕES

Por meio das análises realizadas foi possível verificar que a funcionalização através da técnica de LbL com Pani/PSS ocorreu de forma eficiente, sendo observada a deposição de massa com redução da frequência de ressonância a cada bicamada depositada, característica observada também pela espectroscopia de UV-Vis e pelas imagens de morfologia realizadas no

AFM, todas demostrando que a cada bicamada depositada ocorreu uma mudança na superfície dos sensores, aumentando a rugosidade.

Em relação as respostas dos sensores nanoestruturados de cantileveres, apresentaram baixo limite de detecção (1,44 fg/mL), tempo de resposta de 37,8 s com reversibilidade de superior a 90%. Além disso, a avaliação da estabilidade demostrou que continuam apresentando limites de detecção e sensitividade na ordem de fentogramas, mesmo após 30 dias de estocagem.

Todos os sensores foram avaliados em relação a resposta frente a interferentes, 4-oxo-(E) -2-hexenal, tridecano e o 2-(E)-4-(Z)-decadienoato de metila, apresentando uma pequena variação na frequência de ressonância, quando comparado com os valores da exposição ao ar, e embora não conseguiram diferenciar os interferentes, mostraram uma redução na frequência de ressonância.

Os sensores sem funcionalização não apresentaram sensitividade ao feromônio sintético indicando que a camada ativa sobre os sensores, se mostrou eficiente para detecção dos compostos de interesse.

3.5 REFERÊNCIAS

ACZONA, F. J.; JHA, A.; YANEZ, C.; ATASHKHOOEI, R.; ROYO, S. Microcantilever displacement measurement using a mechanically optical feedback interferometer. **Sensors**, v. 17, n. 7, p. 997-999, 2016.

BOISEN, A.; DOHN, S.; KELLER, S. S.; SCHMID, S.; TENJE, M. Cantilever-like micromechanical sensors. **Reports on Progress in Physics**, v. 74, n. 3, p. 36101, 2011.

BORGES, M.; SCHMIDT, F. G. V.; SUJJI, E. R.; MEDEIROS, M. A.; MORI, K.; ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, T. B. Field responses of stink bugs to the natural and synthetic pheromone of the neotropical brown stink bug, Euschistus heros (Heteroptera: Pentatomidae). **Physiological Entomology**, v. 23, n. 3, p. 202-207, 1998b.

BORGES, M.; ZHANG, A.; CAMP, M. J.; ALDRICH, J. R. Adult diapause morph of the brown stink bug, Euschistus servus (Say) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 179-182, 2001.

BRAGA, G. S.; PATERNO, L. G.; LIMA, J.P.H.; FONSECA, F. J.; ANDRADE, A.M. Influence of the deposition parameters on the morphology and electrical conductivity of PANI/PSS self-assembled films. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 4, p. 555-562, 2008.

CHEUNG, J. H.; STOCKTON, W. B.; RUBNER, M. F. Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers - Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline via Electrostatic Interactions. Chemical Physics Letters, v. 9297, n. 97, p. 2712-2716, 1997.

CUI, S.; PU, H.; LU, G.; WEN, Z.; MATSSON, E.C.; HIRSCHMUGL, C.; WEINERT, M.; GAJDARDZISKA-JOSIFOVSKA, M.; WEINERT, M.; CHEN, J. Fast and Selective Room-Temperature Ammonia Sensors Using Silver Nanocrystal-Functionalized Carbon Nanotubes. **Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 4, p.4898-4904, 2012.

CUI, S., LING, P., ZHU, H., KEENER, H. M. Plant pest detection using artificial nose system:a review, v.8, n. 2, p. 1-18, 2018.

DANIEL, S.; CHAUDHURY, M. K. Induced by Vibration. n. 8, p. 3404-3407, 2002.

DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. Science, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.

DU, X. S.; XIAO, M.; MENG, Y. Z. Synthesis and Characterization of Polyaniline/Graphite. Journal of Polymer Science, v. 42, n. 8, p. 1972-1978, 2004.

FUJIMOTO, K., KIM, J. H., OLMORI, K., ONO, K., SHIRATOTI, S. Flexible multilayer electrode films consisted of polyaniline and polyeletrolyte by LbL. Colloids and Surfaces, v. 313, p.387-392, 2008.

GAJESDRAN, P.; SARASWATHI, R. Polyaniline-carbon nanotube composites.**Pure of apllied chemical**, v. 80, n. 11, p. 2377-2395, 2008.

GOTSZALK, T.; GRABIEC, P.; RANGELOW, I. W. Piezoresistive sensors for scanning probe microscopy. **Ultramicrocopy**, v. 82, n. 42, p. 39-48, 2000.

HABA, Y.; SEGAL, E.; NARKIS, M.; TITELMAN, G.; SIEGMANN, A. Polymerization of aniline in the presence of DBSA in an aqueous dispersion. **Synthetic Metals**, v. 106, n. 1, p. 59-66, 1999.

HOPKINS, A. R.; RASMUSSEN, P. G.; BASHEER, R. A. Characterization of Solution and Solid State Properties of Undoped and Doped Polyanilines Processed from Hexafluoro-2-propanol. **Macromolecules**, v. 29, n. 24, p. 7838-7846, 1996.

JANATA, J.; JOSOWICZ, M. Conducting polymers in electronic chemical sensors. **Nature materials**, v. 2, n. 1, p. 19-24, 2003.

JONES, G. R., OLDHAM, N. J. Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. J Chromatogr A, v. 32, n. 5, p. 1002-1009, 1999.

LEITE, F. L.; PATERNO, L. G.; BORATO, C. E.; HERRMANN, P. S. P.; OLIVEIRA, O. N.; MATTOSO, L. H. C. Study on the adsorption of poly(o-ethoxyaniline) nanostructured films using atomic force microscopy. **Polymer**, v. 46, n. 26, p. 12503-12510, 2005.

LEITE, F. L.; PATERNO, L. G.; BORATO, C. E.; HERRMANN, P. S. P.; OLIVEIRA, O. N.; MATTOSO, L. H. C. Study on the adsorption of poly(o-ethoxyaniline) nanostructured films using atomic force microscopy. **Polymer**, v. 46, n. 26, p. 12503-12510, 2005.

LI, L.; FERNG, L.; WEI, Y.; YANG, C.; JI, H.-F. Effects of acidity on the size of polyanilinepoly(sodium 4-styrenesulfonate) composite particles and the stability of corresponding colloids in water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 381, n. 1, p. 11-16, 2012.

LOOCK, H.; WENTZELL, P. D. Sensors and Actuators B: Chemical Detection limits of chemical sensors : Applications and misapplications. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 173, p. 157-163, 2012.

LU, Y.; YAO, Y.; ZHANG, Q.; ZHANG, D.; ZHUANG, S.; LI, H., LIU, Q. Olfactory biosensor for insect semiochemicals analysis by impedance sensing of odorant-binding proteins on interdigitated electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 662-669, 2015.

MANZOLI, A.; SHIMIZU, F. M.; MERCANTE, L.A.; PARIS, E. C.; OLIVEIRA, O. N.; CORREA, D. S.; MATTOSO, L. C. Layer-by-layer fabrication of AgCl–PANI hybrid nanocomposite films for electronic tongues. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 16, n. 44, p. 24275-24281, 2014.

MARGARIDO, A.; MOREIRA, F. M. A.; HERRMANN, P. S. P. Influência da temperatura e umidade no desenvolvimento de um biossensor com microcantilever. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 38, n. 4, p. 1-24, 2016.

MARTINAZZO, J. **Desenvolvimento de nanobiossensor de cantilever para detecção de atrazina em água.** 2017. 78f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Ciências Agrárias, URI, Erechim, 2017.

MOITRA, P., BHAGAT, D., PRATAP, R., BHATTACHARYA, S. A novel bio-engineering approach to generate an eminent surface-functionalized template for selective detection of female sex pheromone of *Helicoverpa armigera*. Sci Rep. 2016; doi:10.1038/srep37355.

MORAES, M. C. B, PAREJA, M., LAUMANN, R. A., HOFFMANN-CAMPO, C. B., BORGES, M. Response of the parasitoid *Telenomus podisi* to induced volatiles from soybean damaged by stink bug herbivory and oviposition. **J Plant Interact**, v. 32, n 2, p. 102-112, 2008a.

OGAWA, T., KOMATSU, M. Analysis of Q. Rad Science, v. 42, p.1-11, 2007.

PARKIN, J. D.; HÄHNER, G. Mass determination and sensitivity based on resonance frequency changes of the higher flexural modes of cantilever sensors. **Scientific Instruments**, v.82, p. 1-5, 2011.

PASCHOAL, J. A. R.; RIZZATO, J. A.; RATH, S.; AIROLDI, F. P.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. Influence of Different Dopants on the Adsorption, Morphology, and Properties of Self-Assembled Films of Poly (o-ethoxyaniline). Journal of Applied Polymer Science, p. 1309-1316, 2001.

PIRES, C. S. S.; ZARBIN, P. H. G. 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, v. 7, p. 70-77, 2006.

RAM, M. K.; SALERNO, M.; ADAMI, M.; FARACI, P.; NICOLINI, C. Physical Properties of Polyaniline Films : Assembled by the Layer-by-Layer Technique. **Langmuir**, v. 13, n. 13, p. 1252-1259, 1999.

RAPOSO, M.; OLIVEIRA JR, O. N. Adsorption mechanisms in layer-by-layer films. **Brazilian** Journal of Physics, v. 28, n. 4, 1998.

RINAUDO, P.; PAYÁ-ZAFORTEZA, I.; CALDERÓN, P.; SALES, S. Experimental and analytical evaluation of the response time of high temperature fiber optic sensors. **Sensors &** Actuators: A. Physical, v. 243, n. 5, p. 167-174, 2016.

SHUKLA, A. K.; ALAM, J.; ALHOSHAN, M.; DASS, L. A.; MUTHUMAREESWARAN, M. R. Development of a nanocomposite ultrafiltration membrane based on polyphenylsulfone blended with graphene oxide. **Nature Publishing Group**, p. 1-12, 2017.

SILVA, J. S.; BARROS, A.; CONSTANTINO, C. J. L.; SIMÕES, F. R.; FERREIRA, M.; SOROCABA, C. J.; Layer-by-Layer Films Based on Carbon Nanotubes and Polyaniline for Detecting 2-Chlorophenol. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 14, p. 6586-6592, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1994.

STEFFENS, C.; MANZOLI, A.; FRANCHESCHI, E.; CORAZZA, M. L.; CORAZZA, F. C.; OLIVEIRA, J. V.; HERRMANN, P. S. Low-cost sensors developed on paper by line patterning with graphite and polyaniline coating with supercritical CO2. **Synthetic Metals**, v. 159, n. 21-22, p. 2329-2332, 2009.

STEFFENS, C.; MANZOLI, A.; OLIVEIRA, J. E.; LEITE, F.L.; CORREA, D. S.; HERMANN, P.S.P. Bio-inspired sensor for insect pheromone analysis based on polyaniline functionalized AFM cantilever sensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 191, p. 643-649, 2014.

THUNDAT, T. Microcantilevers for physical, chemical, and biological sensing. **Sensors and Sensing in Biology and Engineering**, p. 337-355, 2003.

VASHIST, S. A review of microcantilevers for sensing applications. Journal of Nanotechnology, v. 3, p. 1-15, 2007.

VASHIST, S. K.; CZIWIK, G.; VAN ODOORDT, T.; VON STETTEN, F.; ZENGERLE, R.; MARION SCHNEIDER, E.; LUONG, J. H.T. One-step kinetics-based immunoassay for the highly sensitive detection of C-reactive protein in less than 30 min. **Analytical Biochemistry**, v. 456, n. 1, p. 32-37, 2014.

ZHANG, A.; BORGES, M.; ALDRICH, J R.; CAMP, M. Stimulatory Male Volatiles for the Neotropical Brown Stink Bug, Euschistus heros (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 713-717, 2003.

ZAMARION, V. M., TIMM, R. A., ARAKI, K., TOMA, H. E. Ultrasentive SERS nanoprobes for metal ions based on trimercaptotriazine gold nanoparticules. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 8, p. 2934-2936, 2008.

ZHANG, Q. H.; ERBILGIN, N.; SEYBOLD, S. J. GC-EAD responses to semiochemicals by eight beetles in the subcortical community associated with Monterey pine trees in coastal California: Similarities and disparities across three trophic levels. **Chemoecology**, v. 18, n. 4, p. 243-254, 2008.

CAPÍTULO IV

DETECÇÃO DE FEROMÔNIO SEXUAL DO *E. heros* UTILIZANDO SENSOR NANOESTRUTURADO FUNCIONALIZADO COM PANI/MWNT

4.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento na área de sensores substituiu muitas práticas e sistemas analógicos utilizados no início da industrialização, e entre eles, os sensores microeletromecânicos (MEMs) tem uma grande importância, pois são dispositivos compostos por componentes elétricos e mecânicos que interagem e transmitem informações para outros componentes, decodificando informações sobre um determinado ambiente.

Na agricultura já se utilizam vários tipos de sensores para auxiliar nos processos de preparação do solo, plantio e colheita, visando reduzir custos e melhorar o rendimento, mas mesmo com toda a modernização, ainda existem perdas significativas na agricultura, e dentre os diversos fatores, a presença de pragas se destaca. E buscando inspirações nos sensores já existentes pode-se vislumbrar sensores para detecção de feromônios de insetos praga com o intuito de detecta-los precocemente, reduzindo gastos e perdas na qualidade dos grãos.

A miniaturização dos sensores contribui muito para qualidade, sensitividade e especificidade, e os sensores nanoestruturados de cantileveres, funcionalizados de forma adequada, podem ser utilizados na detecção de quantidade diminutas dos feromônios de insetos.

Os polímeros condutores, como a polianilina, já foram bastante estudados como camada sensora para detecção de voláteis e os nanomateriais, como os nanotubos de carbono, vem ganhando bastante destaque e, estudam revelam que propriedades distintas de cada material são reforçadas quando estes são acoplados (SALVATIERRA; OLIVEIRA; ZARBIN, 2010).

Frente a estes problemas, justifica-se a realização deste trabalho que visa desenvolver sensores nanoestruturados de cantilever, funcionalizados com Pani/MWNT para detectar o feromônio do *Euschistus Heros*, praga da cultura de soja.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Desenvolvimento das camadas sensitivas

Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas (MWNTs): Os MWNTs (Nanoamor[®]) com 95% de pureza, diâmetro interno de 5-10 nm, diâmetro externo de 60-100 nm e comprimento de 5-15 µm, foram cedidos pelo Centro Universitário Franciscano (UNIFRA). Foram submetidos a um tratamento ácido com o objetivo de melhorar sua miscibilidade e processabilidade de acordo com Souza Filho e Fagan (2007). Para a oxidação ácida, foram adicionados 20 mg de MWNT a uma mistura de ácido sulfúrico (Merck 95%) e nítrico (HNO₃) (Química Moderna 65%) na proporção 3:1 (v/v) e mantidos em ultrassom (Unique modelo USC-1800) a 70°C por 24 h (WU; LIN, 2006).

Após o tratamento ácido, os MWNT_COOH (Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas Carboxilados) foram lavados por cinco vezes com água ultrapura, seguidas de centrifugação (MPW-351R) por 5 min a 5000 rpm até a solução sobrenadante se apresentar levemente ácida com pH próximo a 6,0. Após, o sobrenadante foi retirado e a solução remanescente seca em estufa a 90°C por 2 h, resultando em um pó negro. O pó obtido foi armazenado em frasco âmbar para proteção da luz e da degradação da ação do oxigênio. Todos os experimentos posteriores foram desenvolvidos utilizando os MWNT carboxilados.

O preparo da dispersão dos MWNT_COOH para filmes de LbL foi realizada com concentração de 0,1 mg. mL⁻¹ de MWNT_COOH, dissolvidas em água ultrapura com pH ajustado em torno de 3,0 (utilizando HCl 0,1 mol. L⁻¹) e, mantidas em ultrassom(Unique modelo USC-1800) por 3 h (SILVA et al., 2014).

Polianilina (Pani): A síntese da Pani foi realizada pela técnica interfacial e o preparo da solução de Pani de acordo com o item 3.2.2.

4.2.2 Funcionalização das superfícies dos cantileveres

Os cantileveres de silício foram obtidos comercialmente (Budget Sensors[®]) com frequência de ressonância de 13 ± 4 kHz e constante de mola (K) de 0,2 N.m⁻¹, comprimento de 450 μ m, largura de 50 μ m e espessura de 2 μ m, revestido com uma camada de 30 nm de alumínio.

Foram desenvolvidos sensores de cantilever com uma camada sensitiva de Pani/MWNT por meio da técnica de LbL, além de um sensor sem camada ativa, denominado de branco, para avaliação da resposta frente aos compostos feromonais avaliados.

As deposições realizadas pela técnica de LbL, de acordo com item 3.2.6, diferindo apenas no tempo de permanência em cada etapa de deposição. Os cantileveres permaneceram por 3 min na solução de Pani e 30 s na solução de lavagem, secando por 15 min, após permaneceram por 10 min na solução de MWNT, 30 s na solução de lavagem e foram secos por 15 min a temperatura ambiente, até a formação de 7 bicamadas (SILVA et al., 2014).

4.2.3 Caracterização dos filmes Pani/MWNT

As análises de caracterização dos filmes por Espectroscopia UV-Visível, difratometria de raios X (DRX), Microscopia de Força Atômica (AFM), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Óptica, Ângulo de Contato foram realizadas conforme descrito no item 3.2.6.

4.2.4 Avaliação dos sensores nanoestruturados de cantilever

Para avaliar a resposta dos sensores nanoestruturados os experimentos foram realizados em um ambiente controlado de umidade e temperatura, em uma a câmara de polipropileno com volume de 6,38 cm³, conforme demonstrado no item, como descrito no item 3.2.7.

4.2.4.1 Preparação das soluções do composto feromonal 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila

Para realização dos testes foi utilizado o principal componente do feromônio sexual do percevejo marrom, o composto 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, sintetizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

O composto é líquido a temperatura ambiente, apresenta densidade de 0.9 ± 0.1 g/cm³e massa molecular de 270 g/mol e foi utilizado em diferentes concentrações (0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 µg/mL), sendo que as diluições foram realizadas com o solvente n-hexano (MERCK 99%) (PIRES e ZARBIN, 2006).

Para avaliar a resposta dos sensores foi calculado (Equação 5) a concentração do composto feromonal, 2,6,10-trimetiltridecanoato, no interior da câmara, considerando a quantidade deste presente na alíquota inserida (20µL), para cada concentração.

Foi utilizado o solvente *n*-hexano para diluir as amostras e auxiliar no carreamento do composto 2,6,10 – trimetiltridecanoato de metila até o sensor. O solvente foi escolhido por apresentar alta volatilidade e por não ser capaz de atrair os percevejos, portanto não interferindo na resposta quando projetada sua utilização no campo (BORGES et al., 1998; ZARBIN et al., 2000; PIRES et al., 2006).

4.2.4.2 Medida de frequência de ressonância em microscópio de força atômica (AFM)

Para realização dos experimentos, primeiramente o cantilever foi colocado em um porta cantilever (canticlipe) para medidas em ar, e encaixado na cabeça do *scanner* piezoelétrico do

AFM. Então, a câmara de acrílico foi encaixada na cabeça do *scanner* que contém o cantilever, sendo vedada com anel de borracha. O sinal do laser foi ajustado na extremidade final do cantilever e ajustado no centro do fotodetector de quatro quadrantes (Nanosurf, Suíça) sendo a intensidade ajustada para próximo de 70%. Para realização das medidas a frequência de ressonância uma alíquota de 20 μ L de cada concentração do feromônio (sempre da menor para maior concentração) foi adicionada, com o auxílio de uma microseringa, sobre um pedaço de papel filtro (Milipore 25 μ m) na câmara e avaliada a resposta a cada 20 s por 5 min.

Também foi avaliada a reposta dos sensores ao ar sintético (White Martins 99%), *n*hexano a cada 20 s por 5 min. Em todos os experimentos a temperatura foi controlado e monitoradas com um controlador de temperatura (Nanosurf) e um sistema de resfriamento do AFM conforme descrito no item 3.2.7.

4.2.4.3 Caracterização da resposta dos sensores de Pani/MWNT ao feromônio

Foi avaliado a resposta dos sensores sem funcionalização (branco) e funcionalizados com Pani/MWNT expostos a diferentes concentrações do 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila.

Os sensores foram avaliados pelas medidas de frequência de ressonância e caracterizados quanto ao tempo de resposta, sensitividade, limite de detecção, reversibilidade, repetibilidade, histerese e durabilidade, sendo todos experimentos realizados em triplicata, de acordo com os itens 3.2.7.1.

4.2.4.4 Avaliação de interferentes na resposta dos sensores nanoestruturados

A resposta dos sensores a substâncias quimicamente semelhantes ao 2,6,10trimetiltridecanoato de metila foi avaliada utilizando os compostos 4-oxo-(E)-2-hexenal, tridecano e o 2-(E)-4-(Z)-decadienoato de metila, e utilizados na concentração de 0,005 μ g/mL, de acordo com o item 3.2.7.2.

4.2.4.5 Análise Estatística

Os resultados de sensitividade e limite de detecção, referentes a durabilidade, e os dados de rugosidade foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 95% de confiança, utilizando o *software* Origin 8.5.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização dos filmes

Na Figura 31 é mostrada a espectroscopia de UV-Vis da dispersão de MWNT_COOH, onde se verifica que os elétrons π presentes no orbital molecular dos átomos de carbono dos MWNTs participam da formação da nova ligação com as carboxilas. Esses picos observados (220 e 300 nm) através de Uv-Vis, para MWNTs carboxilados, indicam a transição π para π * de um par de elétrons ligantes da ligação -C=O dos grupos carboxílicos (-COOH) inseridos nas superfícies dos nanotubos (LU et al., 2014; YADAV et al., 2013).





Fonte: o autor.

Esse pico (220 nm) de absorção já foi observado por Jiang e colaboradores (2003) para MWNTs purificados com tratamento ácido, revelando que a funcionalização química com grupos carboxílicos dos MWNTs foi realizada com sucesso.

Também foi realizado o DRX dos MWNT para avaliar a cristalinidade desse material, ilustrado na Figura 32. Observa-se um pico em 26,5° atribuído ao plano dos nanotubos de carbono, correspondendo à distância entre as folhas concêntricas de grafeno nos NTC de paredes múltiplas (MANIWA et al., 2007).

Observa-se também um pequeno pico em torno de 45° que pode estar relacionado a presença de alguns resíduos metálicos, oriundos da fabricação, como o ferro.





Fonte: o autor.

4.3.2 Caracterização dos filmes de Pani/MWNT

Na Figura 33a é demonstrado o espectro de absorção dos filmes de Pani/MWNT até a sétima bicamada, onde verifica-se uma maior banda de absorbância em 260 nm (transição $\pi - \pi^*$), característico dos NTC e dos anéis benzenóides da Pani em 450 nm (transição π^* para banda polarônica) (SILVERSTEIN et al., 1994).

Os espectros dos MWNT na forma de filmes apresentam um máximo de absorbância em torno de 260 nm, e de acordo com Agoet et al. (1991) essa banda é intensificada com a presença de grupos funcionais, relacionados a carboxilação.

O crescimento do filme de Pani/MWNT, com absorção máxima em 260 nm com relação ao número de bicamadas indicou um crescimento linear do filme ($R^2 = 0,99$) ao longo das sete bicamadas, com deposição de quantidades semelhantes de material em cada bicamada, indicando que a técnica de LbL, utilizada para funcionalização, foi eficiente, gerando filmes uniformes (Figura 33b).



Figura 33 - Espectros de absorção no UV-Vis do filme de Pani/MWNT a cada bicamada formada (a) e crescimento das bicamadas de Pani/MWNT em 260nm (b).

Fonte: o autor.

Em cada camada depositada de Pani/MWNT foi avaliada a frequência de ressonância dos cantileveres no AFM em modo dinâmico, em triplicata, com temperatura e umidade de 25°C±0,3°C e 64%±0,9% (Figura 34). Verifica-se um decréscimo da frequência de ressonância após cada bicamada depositada, e este pode ser relacionado diretamente com a massa (m) e a constante de mola (k), demostrando assim a deposição dos filmes nos sensores.

Observou-se uma redução na frequência de ressonância inicial de 5,9% após a deposição da sétima bicamada, com de coeficiente de correlção de 0,98, indicando uma contribuição semelhante de massa a cada bicamada. Desse modo, essa uniformidade das camadas é de extrema importância nas características no sensor, como sensitividade e limite de detecção.

Figura 34 - Frequência de ressonância e massa do cantilever a cada bicamada de Pani/MWNT depositada sobre os microcantileveres.



Fonte: o autor.

Avaliou-se também possíveis alterações na rigidez do cantilever, que se relacionam com o K, que podem acontecer devido a funcionalização dos sensores, e de acordo com a equação 6, do item 3.2.5, verificou-se que a constante de mola do cantilever permaneceu 0,2 N.m⁻¹, mesmo após a funcionalização. Verificou-se que a massa adicionada em ng a cada bicamada aumentou, obtendo-se uma massa final de 124,33 ng, indicando um aumento de 7,5%.

Os sensores nanoestruturados avaliados apresentaram um decréscimo gradual da frequência de ressonância após cada bicamada depositada, e este pode ser relacionado diretamente com a massa (m) e a constante de mola (k), de acordo com a equação 5, presente no item 3.2.5, sugerindo assim a deposição dos filmes nos sensores.

Na Figura 35 estão apresentadas as imagens em 3D das superfícies dos sensores de AFM após a deposição da 1^a, 3^a, 5^a e 7^a bicamada de Pani/MWNT. As imagens em AFM permitem observar uma deposição sobre a superfície.

As imagens de AFM mostram a formação de estruturas globulares associadas a estruturas cilindricas pontiagudas com regiões de aglomeração, visualizados pelas regiões mais claras, caracteristicas da formação de nanocompósitos de Pani/MWNT.



у:5 µm

x: 5 um

Figura 35 - Imagens de AFM em 3D dos filmes de Pani/MWNT obtidos com as técnicas LbL após a 1ª bicamada, 3ª bicamada, 5ª bicamada e 7ª bicamada.

Fonte: o autor.

y:5 µm

Os filmes de Pani/MWNT obtidos pela técnica de LbL apresentaram um aumento da rugosidade a cada bicamada depositada (3,64 nm para 13,62 nm), sendo um indicativo da deposição do filme sobre a superfície e assim, uma quantidade maior de sítios de adsorção e ainda a vantagem de ao associar a Pani com os MWNT, se aumenta muita a área superficial, reduzindo-se os defeitos e a falta de uniformidade dos filmes. Eising et al. (2016), desenvolveu filmes de Pani/MWNT, atraves da tecnica de automontagem com polimerização em sistema bifásico, contendo diferentes concentrações de Pani, e observou que a rugosidade do filme aumenta com o aumento da concentração de Pani, chegando a 157 nm com a maior concentração de Pani (50 μ L de Pani) e 42,06 nm (para 5 μ L de Pani). A técnica que utilizamos permitiu a formação de filmes mais delgados.

x: 5 um

A espessura obtida para o filme de Pani/MWNT foi de 61 nm, confirmando com as medidas de frequência de ressonância, que mostram a pequena quantidade de massa adicionada ao cantilever (próximo a 10 ng), que formou-se um filme fino (Figura 35). Esses dados permitem que este filme seja considerado como um filme nanométrico (AZCONA et al., 2016).

As medidas de ângulo de contato das superfícies não funcionalizadas e funcionalizadas com de Pani/MWNT, esta apresentada na Figura 36 e Figura 37. O filme de Pani/MWNT apresentou ângulo de contato de 100,37°, enquanto que a superfície não funcionalizada

apresentou um ângulo de contato de 80,01°, indicando que ocorreu uma alteração na característica da superfície e que o filme apresenta característica hidrofóbica.

Essa caracteristica também foi vizualizada por Zhao et al. (2014) que ao desenvolverem uma membrana contendo com poliamidas e MWNT, conforme aumentaram a concentração dos nanotubos, o ângulo de contato aumentava, indicando maior hidrofobicidade, reduzindo a interferencia da umidade nos sensores e também facilitando a interação com o composto em questão, 2,6,10 trimetiltridecanoato de metila.

Figura 36 - Perfil do ângulo de contato nos ensaios de molhabilidade, realizados com água, dos filmes de Pani/MWNT.



Fonte: o autor.

De acordo com Werder, Walter e Koumoutsakos (2014) ao avaliarem as caracteristicas dos MWNT encontraram ângulo de contato que variou de 103,3° a 106,9°, semelhante aos valores encontrados neste estudo (100,37°). Li (2013) produziu MWNT a partir da pirólise de ferroceno e acetileno, por deposição de vapor químico, e atingiram ângulo de contato de 156,4°. Esses resultados mostram que os MWNT apresentam caracteristicas hidrofóbicas mas que vários fatores podem interferir nos valores observados, desde a forma de obtenção dos MWNT até a concentração utilizada na fabricação dos filmes.





Fonte: o autor.

A Microscopia Eletrônica de Varredura mostra a microestrutura do filme de Pani/MWNT, sendo que a Pani foi preparada pela técnica interfacial e os filmes desenvolvidos pela técnica de automontagem, LbL, sob uma superfície de silício. A Figura 38 apresenta os filmes de Pani/MWNT, com magnificação de 5000 vezes, mostrando MWNT revestidos com Pani, e de acordo com Gupta e Miura (2016), quanto maior a concentração de Pani, maiores e mais distantes os aglomerados de Pani/MWNT, quando a Pani representa mais de 73% no compósito, os revestimentos dos MWNT pela Pani cessam e ela se deposita livremente no filme, neste experimento a relação foi de 50%.

Figura 38 - Micrografias das amostras de filmes de Pani/MWNT sobre superfícies de silício.



Fonte: o autor.

4.3.3 Resposta dos sensores nanoestruturados funcionalizados com Pani/MWNT ao feromônio

A resposta dos sensores sem funcionalização e com camada ativa Pani/MWNT foi avaliada na detecção de diferentes concentrações (0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 μ g/mL) do feromonio 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, sendo realizadas as caracterizações de sensitividade, limite de detecção, reversibilidade, histerese e tempo de resposta. A temperatura e umidade relativa foram de 25°C±0,3°C e 67%±0,8%, respectivamente.

As Figuras 39 e 40 apresenta de frequência de ressonância a diferentes concentrações de feromônio, ao ar sintético e ao *n*-hexano. Pode-se observar que os sensores funcionalizados com Pani/MWNT foram sensíveis ao composto feromonal 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, respondendo de forma linear (R²=0,93). Por outro lado, o sensor não funcionalizado (Branco) não apresentou alteração da resposta nas diferentes concentrações do composto, indicando que o filme de Pani/MWNT é responsável pela detecção de feromônio. As medidas realizadas com o ar sintético e com o n-hexano foram semelhantes, não mostrando alteração da frequência de ressonancia, indicando que o solvente não interfere nas medidas realizadas.

A sensitividade foi de 2,62 Hz/fg.mL⁻¹ obtida pelo coeficiente angular da concentração do composto versus a frequência de ressonância. O limite de detecção dos sensores obtido de acordo com IUPAC (IUPAC, 1976), que considera 3 vezes o desvio padrão do branco em relação a sensitividade foi de 2,18 ppq_v. Quando é necessária a investigação de substâncias em nivel de traço, normalmente são utilizadas técnicas de HPLC ou GC , e os sensores baseados em cantileveres podem detectar vestígios de substancias em ppb, ppt e até ppq (VASHIST et al., 2010).

106

Figura 39 - Resposta do sensor funcionalizado de Pani//MWNT ao composto 2,6,10 trimetiltridecanoato de metila e do não funcionalizado (Branco) frente ao composto feromonal.



Fonte: o autor.

Figura 40 - Resposta do sensor funcionalizado de Pani//MWNT ao ar e ao hexano.



Fonte: o autor.

A possibilidade de detecção do 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila na ordem de fentogramas, representa um avanço no estudo de alternativas para detecção precoce do *E. heros* no campo. O baixo limite de detecção observado nesse sensor, esta relacionado a efetividade

da camada ativa desenvolvida, de Pani/MWNT. O mecanismo de resposta ocorre por meio interação da camada sensitiva de Pani/MWNT do sensor e o feromonio, resultando na adsorção de moléculas sobre o sensor e induzindo a alterações na frequência de ressonância, que foram detectadas em ppq_v.

O desenvolvimento de nanocompósitos vem mostrando vantagens e são estudados para aplicações em diferentes areas, como para sensores e biossensores. Estudos mostram os nanocompósitos (Pani/MWNT) podem melhorar as características individuais do polímero como a rigidez mecânica, condutividade elétrica e estabilidade térmica (MOHANTY; SAHOO; AKHTAR, 2015; BHATTACHARYA, 2016), além de melhorar a sensitividade e a especificidade da detecção de biomoléculas (ZHANG; ERBILGIN; SEYBOLD, 2008).

Aghamiri et al. (2018), desenvolveram sensores de MWNT com o intuito de imobilizar citocromo-c para aplicações em biossensores, e obtiveram limite de detecção de 1 μ mol.L⁻¹ para detecção de peróxido de hidrogeno, para sensores funcionalizados somente com Pani obtiveram limite de detecção de 0,8 μ mol.L⁻¹ e quando desenvolveram filme de Pani/MWNT por eletropolimerização, conseguiram limite de detecção de 0,2 μ mol.L⁻¹ e sensibilidade de 97,6 nA μ M⁻¹.

O limite de detecção de 2,18 fg/mL obtido neste estudo, para sensores nanoestruturados de Pani/MWNT gera interesse na realização de estudos mais avançados, como para compreensão do mecanismo de interação, uma vez que consegue detectar as pequenas quantidades de feromônios liberadas pelo *E. heros*

Para determinação da histerese, o sensor foi submetido a um ciclo de aumento (0,005 μ g/mL para 0,3 μ g/mL) e redução (0,3 μ g/mL para 0,005 μ g/mL) da concentração do feromônio, e observou-se uma histerese média de 0,03%, com diferença máxima na concentração de 0,3 μ g/mL (Figura 41). Os sensores desenvolvidos apresentam baixa histerese, indicando que o os respostas observadas, independente da ordem dos estímulos, exibem variações mínimas, caracteristica importante para fabricação de sensores.


Figura 41 - Avaliação da histerese dos sensores de Pani/MWNT.

Fonte: o autor.

A estabilidade da resposta dos sensores durante 30 dias de estocagem, em relação ao limite de detecção e sensitividade estão apresentado na Figura 42. Verifica-se um aumento do limite de detecção e uma diminuição da sensitividade, com diferença significativa (p<0,05) entre os dias avaliados. Contudo os sensores conseguem detectar pequenas quantidades dos voláteis, na ordem de fentograma (10⁻¹⁵), mesmo após 30 dias de estocagem.

Figura 42 - Durabilidade dos sensores de Pani/MWNT.



* Dados apresentados como média (três repetições). Letras iguais nas colunas de mesma cor indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey) entre os diferentes dias avaliados. Fonte: o autor.

O sensor de Pani/MWNT apresentou tempo de resposta de 50,4 s após a exposição a concentração de 0,3 μ g/mL do composto feromonal (Figura 43).



Figura 43 - Tempo de resposta dos sensores de Pani/ MWNT.

Fonte: o autor.

A reversibilidade dos sensores de cantileveres funcionalizados com Pani/MWNT foi de 80%. Verifica-se que durante os 2 primeiros ciclos, o mesmo retornou os valores de frequência de ressonância a origem (linha de base) conforme Figura 44.

Figura 44 - Repetibilidade dos sensores de Pani/MWNT durante 8 ciclos.



Fonte: o autor.

Após o 3 ciclo não conseguiu retornar a linha de base, o que pode indicar que o sensor pode saturar, impedindo que ele retorne à frequência de ressonância inicial, no período estabelecido. De acordo com Hromadka et al. (2018) os sensores deveriam responder com a mesma precisão por um longo periodo de tempo, porem os sensores podem saturar com o uso repetitivo, impedindo que responda da mesma maneira.

Outro fator que pode ter interferido se relaciona ao mecanismo de interação entre as moléculas e a camada sensitiva, uma vez que a dessorção pode levar mais tempo para acontecer, sendo que em 1 min não foi suficiente para dessorver o analito e retornar a condição de origem.

4.3.4 Avaliação de interferentes na resposta do sensor

Compostos semelhantes (4-oxo-(E)-2-hexenal, do tridecano e do 2-(E)-4-(Z)decadienoato de metila) ao feronomio do percevejo *E. Heros* foram utilizados como interferentes para avaliar a reposta do sensor de Pani/MWNT (Figura 45).





Fonte: o autor.

A concentração avaliada foi de 0,005µg/mL, onde verifica-se que o sensor de Pani/MWNT não conseguiu diferenciar os três compostos testados, porem, observou-se uma redução na frequência de ressonância após a exposição aos interferentes, em relação ao ar . Esses resultados se relacionam com a especificidade do sensor e mostram que o sensor nanoestruturado de Pani/MWNT responde a voláteis liberados por percevejos de outras espécies, alem do percevejo marrom.

Importante destacar que mesmo que o sensor responder aos compostos interferentes, essa resposta foi diferente da apresentada ao feromonio 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila apresentou uma resposta distinta.

4.4 CONCLUSÕES

O sensor nanoestruturado de Pani/MWNT foi funcionalizado de forma efetiva pela técnica de LbL, sendo observada a deposição de massa com redução da frequência de ressonância bem como o aumento da absorbância e o aumento da rugosidade a cada bicamada depositada. As imagens de MEV mostram que a formação do nanocompósito foi possível, visualizando-se estruturas globulares e cilíndricas, relacionadas a Pani e aos MWNT, interligadas.

Em relação as respostas do sensor de Pani/MWNT frente ao feromônio do *E. heros*, apresentou limite de detecção de 2,18 fg/mL e foi capaz de detectar na ordem de fentograma, mesmo após 30 dias de estocagem, apresentando um tempo de resposta de 50,4 s e repetibilidade de 2 ciclos, e quando avaliados em relação a resposta frente a interferentes, 4-oxo-(E) -2-hexenal, tridecano e o 2-(E)-4-(Z)-decadienoato de metila, apresentaram uma pequena variação na frequência de ressonância, quando comparado com os valores da exposição ao ar.

As respostas dos sensores de Pani/MWNT estão relacionadas a camada ativa, uma vez que os sensores sem funcionalização não apresentaram sensitividade ao feromônio.

4.5 REFERÊNCIAS

AZCONA, F. J.; JHA, A.; YANEZ, C.; ATASHKHOOEI, R.; ROYO, S. Microcantilever displacement measurement using a mechanically optical feedback interferometer. **Sensors**, v. 17, n. 7, p. 997-999, 2016.

BHATTACHARYA, M. Polymer nanocomposites-A comparison between carbon nanotubes, graphene, and clay as nanofillers. **Materials**, v. 9, n. 4, p. 1-35, 2016.

BORGES, M.; MORI, K.; COSTA, M. L. M.; SUJJI, E. R. Behavioral evidence of methyl-2-6-10 trimethyltridecanoate a sex pheromone of Euschistus heros (Het., Pentatsmidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 122, p. 335-338, 1998a.

HENLEY, S. J.; GUO, A. S. Enhancement of Polymer Luminescence by Excitation- Energy Transfer from Multi-Walled Carbon Nanotubes. **Energy Fuels**, v. 32306, n. 11, p. 1927-1933, 2007.

LU, Y.; YAO, Y.; ZHA]NG, Q.; ZHANG, D.; ZHUANG, S.; LI, H., LIU, Q. Olfactory biosensor for insect semiochemicals analysis by impedance sensing of odorant-binding proteins on interdigitated electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 662-669, 2015.

MANIWA, Y.; MATSUDA, K.; KYAKUNO, H.; OGASAWARA, S.; HIBI, T.; KADOWAKI, H.; SUZUKI, S.; ACHIBA, Y.; KATAURA, H. Water-filled single-wall carbon nanotubes as molecular nanovalves.**Nature Materials**, v. 6, p. 135-141, 2007.

MOHANTY, G.; SAHOO, B. K.; AKHTAR, J. Comparative analysis for reflectivity of graphene based SPR biosensor. **Optical and Quantum Electronics**, v. 47, n. 7, p. 1911-1918, 2015.

PIRES, C. S. S.; ZARBIN, P. H. G. 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**, v. 7, p. 70-77, 2006

SALVATIERRA, R. V.; OLIVEIRA, M. M.; ZARBIN, A. J. G. One-pot synthesis and processing of transparent, conducting, and freestanding carbon nanotubes/polyaniline composite films. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 18, p. 5222-5234, 2010

SILVA, J. S.; BARROS, A.; CONSTANTINO, C. J. L.; SIMÕES, F. R.; FERREIRA, M.; SOROCABA, C. J.; Layer-by-Layer Films Based on Carbon Nanotubes and Polyaniline for Detecting 2-Chlorophenol. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 14, p. 6586-6592, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1994.

SINGAMANENI, S.; LEMIEUX, M. C.; LANG, H. P.; GERBER, C.; LAM, Y.; ZAUSCHER, S.; DATSKOS, P.G.; LAVRIK, N. V.; JIANK, H.; NAIK, R.R.; BUNNING, T. J.; TSUKRUK,

V.V. Bimaterial microcantilevers as a hybrid sensing platform. Advanced Materials, v. 20, n. 4, p. 653–680, 2008.

SOUZA FILHO, A. G.; FAGAN, S. B. Funcionalização de Nanotubos de Carbono. **Quimica** Nova, v. 30, n. 7, p. 1695-1703, 2007.

THUNDAT, T. Microcantilevers for physical, chemical, and biological sensing. **Sensors and Sensing in Biology and Engineering**, p. 337-355, 2003 2003.

YADAV, S. K., MAHAOATRA, S. S; YADAV, M. K; DUTTA, P. K. D. Mechanically robust biocomposite films of chitosan grafted carbon nanotubes via [2+1] cycloaddition of nitrene. **RSC Advances**, n. 45, 2013.

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B.; LEAL, W. S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrtural de feromônios de insetos. **Química Nova**, v. 22, n. 2, 1999.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M. Química Nova, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

ZHANG, A.; BORGES, M.; ALDRICH, J. R.; CAMP, M. Stimulatory Male Volatiles for the Neotropical Brown Stink Bug, Euschistus heros (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 713-717, 2003.

ZHANG, Q. H.; ERBILGIN, N.; SEYBOLD, S. J. GC-EAD responses to semiochemicals by eight beetles in the subcortical community associated with Monterey pine trees in coastal California: Similarities and disparities across three trophic levels. **Chemoecology**, v. 18, n. 4, p. 243-254, 2008.



CAPÍTULO V

DETECÇÃO DE FEROMÔNIO DE PERCEVEJO COM SENSORES DE CANTILEVER FUNCIONALIZADOS COM PANI/OG

5.1 INTRODUÇÃO

Os feromônios são semioquímicos que atuam como armas de comunicação poderosa, coordenando comportamentos intra e interespécies (VERHEGGEN; HAUBRUGE; MESCHER, 2010).

Dentre os feromônios, os sexuais são os mais estudados e já identificados em várias classes de insetos, podendo ser produzidos por qualquer sexo com o objetivo de atrair um parceiro. Esses feromônios vem sendo foco de diversos estudos e o principal interese é utilizalo no monitoramento e no controle de pragas (GINZEL, 2010).

Nesse contexto surge o interesse em desenvolver sensores para detecção do feromônio sexual do percevejo marrom, importante praga da cultura da soja, responsável por perda na quantidade e qualidade dos grãos. Os sensores baseados em cantileveres podem ser uma alternativa, uma vez que por apresentarem-se minuaturizados, e dependendo da camada ativa desenvolvida, podem detectar quantidades diminutas de analitos, como seria o caso dos feromônios sexuais.

A escolha da camada ativa adequada e da forma de funcionalização é uma etapa fundamental no desenvolvimento dos sensores e dentre as diversas camadas ativas que podem ser utilizadas para fabricação de sensores, os nanomateriais estão sendo explorados por melhorarem as caracteristicas dos sensores, uma vez que apresentam uma grande área superficial. E estes vem sendo explorados em sensores para detecção de voláteis.

O grafeno se apresenta como uma folha plana de átomos de carbono, sendo base para a formação de nanotubos de carbono e fulerenos e apresenta alta resistência mecânica (200 vezes maior que o aço), alta condutividade elétrica (60x mais que os NTC), alem da elasticidade e condutividade térmica (JUSTINO et al., 2017). O óxido de grafeno é um derivado do grafeno e se apresenta como folhas de grafeno em camadas oxigenadas contendo grupos funcionai , como alcoois e carboxilas nas bordas (BOLLELA et al., 2017).

A associação entre nanomateriais, como o oxido de grafeno com polímeros condutores também é atrativa para fabricação de sensores pois podem potencializar as características individuais de cada composto, culminando no desenvolvimento de sensores ultra sensíveis.

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sensor de cantilever nanoestruturado com um polimero condutor (polianilina) e um nanomaterial (óxido de grafeno) e aplicar na detecção de feromonio de percevejo (*E. heros*).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item serão descritos os materiais e métodos utilizados para fabricação dos sensores nanoestruturados de cantilever de Pani/OG, assim como a metodologia utilizada para avaliar a resposta destes na detecção do composto 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila e dos compostos utilizados como interferentes, tridecano, 4-oxo-(E)-2-hexenal e 2-(E)-4-(Z)-decadienoato de metila.

5.2.1 Cantileveres

Os cantileveres de silício utilizados para funcionalização com Pani/OG foram adquiridos comercialmente (Budget Sensors[®]), com frequência de ressonância de 13 ± 4 kHz e constante de mola de 0,2 N.m⁻¹, comprimento de 450 µm, largura de 50 µm e espessura de 2 µm, revestidos com 30 nm de alumínio.

Antes da funcionalização foram colocados em uma solução de álcool isopropílico por 2 min, para limpeza, e secos por 30 min, a temperatura ambiente.

5.2.2 Desenvolvimento das camadas sensitivas

5.2.2.1 Preparo da solução de OG para formação dos filmes LbL

O OG utilizado neste experimento 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 (NaNO₃) mantendo em agitação em banho de gelo. Em seguida adicionaram 375 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e 22,5 g de permanganato de potássio (KMnO₄), mantendo a mistura em agitação (em banho de gelo) por 2 h e após mantido em agitação a temperatura ambiente por 5 dias, até a formação de um liquido viscoso castanho escuro, que indicam que o grafite foi oxidado com sucesso.

Em seguida, iniciaram a segunda oxidação adicionando a mistura 700 mL de solução aquosa de H₂SO₄ (5%) e mantendo 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 iniciaram

os processos de lavagem e para tanto a temperatura foi reduzida para 60°C e adicionado 15 mL de H_2O_2 a mistura para reduzir materiais residuais presentes na amostra e mantidos por 2h em ultrassom, e após por 12 h em repouso.

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.

Após foi lavado com água deionizado e centrifugado, o sobrenadante foi deixado em dessecador até estar seco, originado o pó de grafeno. O OG foi disperso em água (acidificada com HCl até pH 3) na concentração de 0,1 mg. mL⁻¹.

5.2.2.2 Preparo da solução de Pani para formação dos filmes LbL

A Pani foi polimerizada pela técnica interfacial, como descrito no item 3.2.2 e a solução para realização da funcionalização foi preparada de acordo com o item o item 3.2.3, obtendo uma solução com concentração final de 1 mg.mL⁻¹.

5.2.2.3 Funcionalização das superfícies dos cantileveres

A funcionalização com Pani/OG foi realizada pela técnica de automontagem (LbL), de acordo com a metodologia de Raposo et al. (1997), até a formação de sete bicamadas, com deposição alternada dos polímeros de cargas opostas (poliânion e policátion) sobre ambos os lados do cantilever (superfície superior e inferior).

Para obter o sensor de Pani/OG, foi utilizado como poliânion a solução de OG (descritas no item 5.2.2.1), com concentração final de 0,1 mg. mL⁻¹ e como policátion solução de Pani (descrita no item 3.2.3), com concentração final de 1 mg.mL⁻¹.

As bicamadas de Pani/OG foram obtidas de acordo com o item 3.2.5, mantendo o cantilever por 3 min na solução de Pani, 1 min da solução de lavagem (pH 3) e secos por 15 minutos, após foram colocados em uma solução de OG por 3 min, 1 min na solução pH3 e secos novamente por 15 minutos, obtendo-se assim, a primeira bicamada. O procedimento foi repetido por 7x, até a formação e 7 bicamadas.

5.2.3.1 Espectroscopia de Infravermelho de Reflexão e Absorção de Modulação por Polarização (PM-IRRAS)

As análises foram realizadas de acordo com a técnica descrita no item 3.2.6.

5.2.3.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Os cantileveres, com constante de mola 0,2 N.m⁻¹ e frequência de ressonância de 13 KHz (*Budget sensors*[®]), funcionalizados por LbL com Pani/OG foram acoplados, através de um canticlipe para medidas no ar, ao *scanner* piezoelétrico do AFM, e após o alinhamento do laser, foram realizadas medidas de frequência de ressonância a cada bicamada depositada, sempre em triplicata, ajustando o equipamento para realização de medidas no ar e no modo dinâmico.

5.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e por emissão de campo (MEV)

A técnica foi realizada de acordo com o item 3.2.6.

5.2.3.4 Microscopia Óptica

As imagens de microscopia óptica foram realizadas de acordo com o item 3.2.6.

5.2.3.5 Ângulo de Contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas de acordo com o item 3.2.6, em uma superfície de silício funcionalizada com Pani/OG pela técnica de LbL.

5.2.4 Avaliação dos sensores nanoestruturados de cantilever

5.2.4.1 Câmara para detecção dos feromônios e interferentes

119

Para avaliar a resposta dos sensores nanoestruturados de Pani/OG foi projetada uma câmara de polipropileno com volume de 6,38 cm³, como apresentado no item 3.2.7.1.

5.2.4.2 Preparação das soluções do composto feromonal 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila

O composto 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, componente do feromônio sexual do *E. heros*, foi sintetizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, e foi utilizado em diferentes concentrações $(0,005 - 0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,3 \mu g/mL)$, sendo que as diluições foram realizadas com o solvente *n*-hexano (MERCK 99%) (PIRES e ZARBIN, 2006).

Para avaliar a resposta dos sensores foi calculado a concentração do composto feromonal, 2,6,10-trimetiltridecanoato, no interior da câmara, considerando a quantidade deste presente na alíquota inserida (20μ L), para cada concentração, de acordo com a equação 7 descrito no item 3.2.7. A concentração do composto presente na câmara para cada concentração preparada foi de 1,4 fg/mL, 2,8 fg/mL, 14 fg/mL, 28,2 fg/mL, 52,4 fg/mL e 78,6 fg/mL.

5.2.4.3 Medida de frequência de ressonância em microscópio de força atômica (AFM)

As medidas de frequência de ressonância dos sensores de Pani/OG foram realizadas de acordo com o item 3.2.7.

5.2.4.4 Caracterização da resposta dos sensores frente ao composto 2,6,10trimetiltridecanoato de metila

Foi avaliado a resposta dos sensores sem funcionalização (branco) e funcionalizados com Pani/OG expostos a diferentes concentrações do 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila.

Os sensores foram avaliados pelas medidas de frequência de ressonância e caracterizados quanto ao tempo de resposta, sensitividade, limite de detecção, repetibilidade, histerese e durabilidade, sendo todos experimentos realizados em triplicata, testes que foram realizados de acordo com os itens 3.2.7.1.

5.2.4.5 Avaliação de interferentes

Além do feromônio 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, os sensores foram avaliados quanto a exposição aos compostos do 4-oxo-(E)-2-hexenal, do tridecano e do2-(E)-4-(Z)- decadienoato de metila, na concentração de $0,005\mu g/mL$. Os testes foram realizados da mesma forma que os testes com o 2,6,10 trimetiltridecanoato de metila, com temperatura em torno de $25\pm0,6^{\circ}$ C e umidade em torno de $65\%\pm0,9\%$, e os resultados estão expressos na Figura 65.

5.2.4.6 Análise Estatística

Os resultados de sensitividade e limite de detecção, referentes a durabilidade, e os dados de rugosidade foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 95% de confiança, utilizando o *software* Origin 8.5.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 PM-IRRAS

A Figura 46 mostra os espectros de PM-IRRAS absorção com os picos de absorção, mostrando que houve uma alteração nos picos apresentados em relação a superfície de silício.

Observou-se bandas de absorção em 1145, 2307 e 3707 cm⁻¹. Essas bandas também foram observadas por Wu et al. (2013) e se relacionam, respectivamente, a ligação C-H do anel aromático da Pani, ao estiramento assimétrico do C-H e ao estiramento 0-H, bandas características para absorção para OG (WESSLING, 1998).

Figura 46 - Espectro de PM-IRRAS dos filmes de Pani/OG desenvolvidos sobre a superfície de silício.



Fonte: o autor.

5.3.2 MEV

A Microscopia Eletrônica de Varredura mostra a microestrutura do filme de Pani/OG, sendo que a Pani foi preparada pela técnica interfacial e os filmes desenvolvidos pela técnica de automontagem, LbL, sob uma superfície de silício (Figura 47).

Pode-se observar uma estrutura em forma de malha, porosa, com regiões mais aglomeradas. De acordo com Wu et al. (2013) essa estrutura é característica dos nanocompósitos de Pani/OG, onde o OG atua como um suporte e a Pani é adsorvida, formando películas com grande área superficial de Pani/OG.

Figura 47 - Micrografias das amostras de filmes de Pani/OG sob superfície de silício, com aumento de 5000 vezes.



Fonte: o autor.

5.3.3 Microscopia de Força Atômica

5.3.3.1 Avaliação da deposição das bicamadas de Pani/OG

Em cada camada da funcionalização, realizada pela técnica de LbL nos sensores de Pani/OG, foi avaliada a frequência de ressonância dos cantileveres (Tabela 5). Os sensores nanoestruturados avaliados apresentaram um decréscimo de aproximadamente 5,5% na frequência de ressonância, após a deposição da sétima bicamada de Pani/OG e um aumento de 15% na massa adicionada (ng). Esse aumento de massa demostra a deposição do material sobre a superfície do cantilever.

A constante de mola após a deposição de cada bicamada foi calculada de acordo com a equação 6 e não apresentou alterações, essa avaliação é importante pois a alteração na rigidez do cantilever também pode alterar a frequência de ressonância.

Deposição das bicamadas	K (N.m ⁻¹)	Massa (ng)	Frequência de ressonancia (Hz)
Sem funcionalização	0,20	85,00	15723
1ª bicamada	0,20	88,1	15443
2ª bicamada	0,20	90,18	15265
3ª bicamada	0,20	91,50	15155
4ª bicamada	0,20	93,81	15074
5ª bicamada	0,20	95,89	14996
6ª bicamada	0,20	97,00	14908
7ª bicamada	0,20	97,51	14868

Tabela 5 - Valores da frequência de ressonância (fres), constante de mola (k) e variação de massa para as etapas de construção do sensor de microcantilever com e Pani/OG.

Fonte: o autor.

5.3.4 Microscopia Óptica

Para verificar a mudança da superfície de silício com a funcionalização utilizando Pani/OG a microscopia óptica foi empregada. Na Figura 48 verifica-se um aspecto liso e uniforme para a superficie de silicio, enquanto na funcionalizada são observados grumos. Podese observar que ocorreu a deposição do filme, indicando que houve a funcionalização, porém não foi de maneira uniforme. Embora a técnica de LbL seja apropriada para desenvolvimento de filmes finos para sensores, a principal dificuldade é controlar a uniformidade do filme (RAPOSO; OLIVEIRA JR, 1998).

Figura 48 - Imagens de microscopia óptica das superfícies dos cantileveres funcionalizados com PANI/OG e não funcionalizados (silício) (Imagens com aumento de 100X).



Fonte: o autor.

5.3.5 Ângulo de Contato

Foi avaliado o ângulo de contato da superficie do cantilever (sem deposição) e com a deposição do filme Pani/OG obtendo-se valores de 80,01° e 73,5°, respectivamente (Figura 49).

Figura 49 - Valor do ângulo de contato do substrato de silício funcionalizado com Pani/OG e não funcionalizado.



Fonte: o autor.

Em estudo realizado por Akin et al. (2014) com óxido de grafeno depositado sobre uma superficie de silício encontraram valor de ângulo de contato, para água, de aproximadamente 100°. Porém, quando associado a Pani o ângulo de contato foi de 72°. No presente estudo a deposição da camada de Pani/OG também reduziu o ângulo de contato em relação a superfície sem funcionalizar, podendo ter ocorrido a migração espontânea dos componentes hidrofílicos para a interface silício/água que esta relacionado a associação da Pani, tornando assim, o nanocompósito mais hidrofílico.

5.3.6 Resposta dos sensores funcionalizados com Pani/OG frente ao composto feromonal 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila

A resposta dos sensores sem funcionalização e com camada ativa de Pani/OG foi avaliada em relaçao a sensitividade e o limite de detecção usando diferentes concentrações $(0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 \,\mu\text{g/mL})$ do feromonio e ao *n*-hexano e ar sintético (Figura 50 e 51). Pode-se observar que os sensores funcionalizados com Pani/OG (R²=0,93) apresentaram mudança de frequencia de ressonancia na exposição ao composto feromonal 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, enquanto que o sensor não funcionalizado (branco) não apresentou alteração da resposta. Também os sensores funcionalizados não sofreram alterações na frequência de ressonância, quando submetidos ao ar e n-hexano, assim esses compostos não interferem na resposta do sensor.

Figura 50 - Resposta do sensor funcionalizado de Pani/OG ao composto 2,6,10 trimetiltridecanoato de metila e do não funcionalizado (Branco) frente ao composto feromonal.







Fonte: o autor

A sensitividade e o limite de detecção foram de 6,24 Hz/fg.mL⁻¹ e 0,91 fg/mL. Os sensores funcionalizados com Pani/OG apresentaram limite de detecção e sensitividade excelentes podendo estar relacionado ao efeito sinérgico, que potencializa as caracteristicas individuais, entre o óxido de grafeno e a Pani. De acordo com Bhattacharya (2016), a mistura de derivados de grafeno a compostos poliméricos alem de melhorar as caracteristicas mecanicas e elétricas, apresenta como diferencial o aumento da área superficial dos polímeros, aumentando os sítios de ligação com as moléculas de interesse e consequentemente podendo ter contribuído para as respostas observadas para o sensor nanoestruturado de Pani/OG.

O sensor funcionalizado com Pani/OG no foi capaz de detectar o feromonio sexual do *E. heros* em quantidades muito pequenas, na ordem de fentograma, na literatura não encontramos sensores desenvolvidos com esta camada sensitiva para detecção de feromonios de insetos. Wu et al. (2013) desenvolveram um sensor baseado em nanocompósitos de Pani/Grafeno para detecção de amônia e verificam um aumento na sensitividade (5 vezes) quando comparado com o sensor somente de Pani, relacionando essa eficiência principalmente ao aumento da area superficial.

Estudos para detecção de feromonios de insetos atraves de sensores são encontrados na literatura. Lu et al. (2014) encontrou limite de detecção em micromoles para detecção de

feromonios de abelha e odores florais, com biossensor de impedância eletroquímica revestidos com proteínas olfativas da abelha,

Mitsuno et al. (2015) encontrou limite de dtecção de ppb para detecção de feromonios com sensor baseado em receptores de células odoríferas de insetos. Moitra el al. (2016) também encontrou limite de detecção na ordem de fentograma para sensores de MEMS miniaturizado, e funcionalizados covalentemente para a detecção óptica, através da medição da frequência de ressonância, por vibrometria Doppler, para detecção de feromônios sexuais de *Helicoverpa armigera*.

Os valores de limite de detecção para o sensor de Pani/OG que foram observados no estudo, de 0,91 fg/mL são de extrema importancia para continuação de estudos que busquem o monitoramento e detecção precoce de insetos-praga no campo, uma vez que foi capaz de detectar quantidades diminutas do principal componente do feromonio sexual do *E. heros*.

Os valores de histerese foram determinados por meio da diferença do valor médio a cada concentração avaliada de forma ascendente e descendente, e observou-se uma histerese média 0,02% com valor máximo na concentração de 0,05 µg/mL (Figura 52).





Fonte: o autor.

A Figura 53 apresenta a estabilidade da resposta dos sensores de cantileveres, avaliados a cada 10 dias durante 30 dias. Após 30 dias de estocagem, os sensores desenvolvidos com Pani/OG apresentaram diferenças em relação ao limite de detecção de 0,91 para 5,71 fg/mL.

Em relação a sensitividade, o sensor de Pani/OG apresentou diferença significativa a partir do 20º dia de estocagem.



Figura 53 - Avaliação da resposta do sensor de Pani/OG durante 30 dias.

Fonte: o autor

Para verificar o tempo de resposta, obteve-se primeiramente, uma linha base (ar) por 2 minutos, e após os sensores foram expostos a concentração de 0,3µg/mL do composto feromonal, como pode ser visualizado na Figura 54. O tempo de resposta é uma importante característica dos sensores, pois se relaciona com o tempo necessário para que o sensor responda de forma efetiva, os sensores de Pani/OG apresentaram o melhor tempo de resposta, 25s.

Figura 54 - Tempo de resposta dos sensores de Pani/ OG.



Fonte: o autor.

Em relação a reversibililidade na concentração de 0,3µg/mL do composto feromonal 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila e de ar sintético, os resultados indicam que o sensor de Pani/OG pode ser utilizado de forma consecutiva para determinação da presença do composto feromonal, pois ambos obtiveram recuperação de 97,3% após consecutivos ciclos (Figura 55).



Figura 55 - Reversibilidade dos sensores de Pani/OG ao feromônio.

Fonte: o autor.

De acordo com Wu et al. (2013) os nanocompositos com Pani/OG se organizam sobre o substrato na forma de malhas porosas e esses poros, aumentam a area superficial, e contribuem para a resposta dos sensores de volateis, reduzindo o tempo de resposta e melhorando a reversibilidade dos sensores, uma vez que as moleculas de gas se difundem mais facilmente.

5.3.7 Interferentes

Foram avaliados os interferentes do 4-oxo-(E)-2-hexenal, do tridecano e do2-(E)-4-(Z)decadienoato de metila, na concentração de 0,005µg/mL, na resposta dos sensores (Figura 56). Os sensores nanoestruturados de Pani/OG responderam aos três compostos de forma diferente, apresentando uma redução na frequência de ressonância após a exposição de cada um deles. A resposta apresentada frente a estes interferentes foi diferente da resposta obtida da exposição ao 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, e diferente também da resposta obtida quando o sensor é exposto ao ar.



Figura 56 - Avaliação de interferentes na resposta dos sensores de Pani/OG.

Fonte: o autor.

A avaliação de interferentes traz informações importantes a respeito da seletividade dos sensores, e indica que ele é capaz de detectar outros compostos liberados pelos *E. heros* e por outras espécies de percevejos, mesmo sendo diferente, o sensor apresentara uma redução na frequência de ressonância frente a estes compostos.

5.4 CONCLUSÕES

O sensor de Pani/OG apresentou ótimos resultados para reversibilidade (97,3%), reprodutividade e tempo de resposta (25s), bem como apresentou baixo limite de detecção e alta sensitividade, indicando que a síntese de filmes nanoestruturados através da técnica de LbL, com a associação entre do óxido de grafeno, derivado de carbono, e um polímero, a polianilina, foi efetiva para detecção do composto feromonal do *E. heros*, sendo capaz, de detectar também, compostos semelhantes liberados por outras espécies de percevejos.

5.5 REFERÊNCIAS

AKIN, I., ZOR, E., BINGOL, H., ERSOZ, T. Green Synthesis of Reduced Graphene Oxide/Polyaniline Composite and Its Application for Salt Rejection by Polysulfone-Based Composite Membranes. The Journal of Physical Chemistry B, v. 118, n. 21, p. 5707-5716.

BHATTACHARYA, M. Polymer nanocomposites-A comparison between carbon nanotubes, graphene, and clay as nanofillers. **Materials**, v. 9, n. 4, p. 1–35, 2016.

BOLLELLA, P., FUSCO, C., TORTOLINI, G., SANZO, G., FAVERO, L. GORTON, R. Beyond graphene: electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection, **Biosens. Bioelectron**, v. 89, n. 21, p. 152-166, 2017

GINZEL, M. D., Olfactory signals. Encycloedia of animal behavior, v. 44, n.3, p. 584-588, 2010.

JUSTINO, C. L., GOMES, A. R., FREITAS, A. C., DUARTE, A. C., SANTOS, T. A. P. Graphene based sensors and biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 91, n. 6, p. 53-66, 2017.

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. Reduced graphene oxide prepared at low temperature thermal treatment as transparent conductors for organic electronic applications. **Organic Electronics**, v. 49, n. 7, p. 165-173, 2017.

LU, Y.; YAO, Y.; ZHA]NG, Q.; ZHANG, D.; ZHUANG, S.; LI, H., LIU, Q. Olfactory biosensor for insect semiochemicals analysis by impedance sensing of odorant-binding proteins on interdigitated electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 662–669, 2015.

MITSUNO H, SAKURAI T, NAMIKI S, MITSUHASHI H, KANZAKI R. Novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors. **Biosensors Bioelectronical**, v. 65, p.287-294, 2015.

PIRES, C. S. S.; ZARBIN, P. H. G. 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**, v. 7, p. 70–77, 2006.

RAPOSO, M.; OLIVEIRA JR, O. N. Adsorption mechanisms in layer-by-layer films. **Brazilian Journal of Physics**, v. 28, n. 4, p. 00–00, 1998.

VERHEGGEN, F. J., HAUBRUGE, E., MESCHER, M. C. Alarm pheromone - Chemical signaling in response to danger. **Vitamins and Hormones**, v. 83, n. 2, p. 215-235, 2010.

WU, T. M., YEN, W. L. Doped polyaniline/multi walled carbono nanotube composites: preparation, characterizationand properties. **Polymer**, v. 47, n. 8, p. 3576-3582, 2006.



CAPÍTULO VI

EXPERIMENTO *in vivo* PARA DETECÇÃO DE COMPOSTOS FEROMONAIS LIBERADOS PELO PERCEVEJO *E. Heros* POR SENSORES NANOESTRUTURADOS DE CANTILEVERES

6.1 INTRODUÇÃO

Insetos praga, como o percevejo marrom, presente na cultura da soja, podem reduzir significativamente os rendimentos da safra, de 20% a 40% anualmente, conforme estimado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), que também projeta que a produção de alimentos deve aumentar mais de 60% para alimentar a crescente população até 2050 (KOUROUS, 2016).

E neste contexto, para satisfazer as necessidades alimentares da população mundial, a produção deve ser otimizada, reduzindo as perdas causadas por insetos praga. No caso do percevejo *E. heros*, agricultores e pesquisadores desenvolveram, ao longo do tempo, métodos para detectar a sua presença na lavoura e realizar o controle, no entanto, esses métodos, como o pano de batida, exigem mão de obra qualificada, tempo e nem sempre é realizado da forma correta e assim novos métodos podem ser introduzidos, como a utilização de armadilhas contendo feromônios desses insetos.

Os feromônios são semioquimicos liberados pelos insetos para comunicação intra e interespécies, e podem ser vislumbrados para aplicação na agricultura, para captura em massa, monitoramento de espécies, alteração na reprodução entre outros. Para detecção destes semioquimicos em traços, a utilização de sensores de voláteis pode trazer grandes benefícios para a agricultura. Porém é uma tecnologia ainda pouco explorada, pois exige sensitividade e seletividade em um único dispositivo, e assim a escolha da camada sensitiva adequada é fundamental.

O uso de nanomateriais como elemento sensitivo tais como os polímeros condutores, nanotubos de carbono e grafeno podem ser promissores, e dentre as caracteristicas salientamse a estrutura organizada e bem definida e a elevada razão superfície-volume, permitindo grande reatividade e um aumento significativo da sensibilidade e do limite de detecção, possibilitando que sejam necessárias poucas moléculas de analito ou espécie alvo para garantir a sua detecção (SANTOS et al., 2014).

Assim, o objetivo do estudo foi aplicar sensores nanoestruturados de cantileveres, de Pani/PSS, Pani/MWNT e Pani/OG para detecção dos compostos feromonais liberados por percevejos *E. heros, in vivo*.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Ambiente de teste com percevejo marrom Euschistus heros

Para obtenção dos volateis (feromônios) liberados pelo percevejo marrom *Euschistus heros* foram coletados 39 insetos, machos e fêmeas em diferentes estágios de desenvolvimento. Estes foram capturados em uma lavoura de soja na localidade de Rio Toldo, distrito de Getúlio Vargas, RS (latitude: 27º 45' 42,4" S e longitude 52º 0,9' 35,7" W) e levados até o laboratório de termodinâmica da URI em uma caixa de polipropileno contendo também soja e água, no ano de 2017. Assim que chegaram no laboratório foram separados, uma vez que outras espécies de percevejo, também presentes na cultura de soja, foram capturadas junto com o *E. heros* (Figura 57). Para separação das espécies obteve-se o auxílio de um agrônomo especialista no assunto.

Figura 57 - Percevejo marrom, E. heros, selecionados para o experimento in vivo.



Fonte: o autor.

Os percevejos, após a separação, foram mantidos em uma caixa de acrílico (21 cm x 30 cm), fechada na parte superior com um filme plástico com aberturas para entrada de ar, por 3 dias para adaptação as condições experimentais (MEAKIN et al., 2014).

Para a manutenção dos percevejos, os mesmos foram alimentados com vagem de soja e grãos de amendoim e água *ad libitum* (sem restrição de quantidade), substituída a cada 2 dias (ZHANG et al., 2003), como mostra a Figura 58. A temperatura e umidade relativa interna da caixa foram monitoradas por um sensor comercial (Sensirium Kit EK-H5), a cada 60 s. A sala onde os insetos estavam acondicionados era climatizada permanecendo a 25 °C. Os animais

foram mantidos com fotoperíodo de 14 h de luz (7h às 21h) e 10 h de escuro (21h às 7h), esse fotoperiodo era mantido pela claridade natural da sala e lampadas (ZHANG et al., 2003).

Figura 58 - (a) Experimento *in vivo*, com 39 percevejos *Euschistus heros* (fêmeas e machos), vagens de soja, amendoim, água (seta preta) e sensor de umidade e temperatura (seta vermelha),
(b) detalhe dos percevejos.



Fonte: o autor.

Paralelamente um experimento foi realizado em uma caixa de acrilico sem a presença dos insetos para avaliar a possível interferência dos semioquímicos liberados pela alimentação dos mesmos. A mesma quantidade de alimentos e água foi inserida nesta camara, sendo vedada na parte superior com um filme plástico e com aberturas para entrada e sáida de ar.

6.2.1.4 Resposta dos sensores nanoestruturados in vivo

Os sensores nanoestruturados de Pani/PSS, Pani/MWNT e Pani/OG obtidos conforme descrito nos itens 3.2.5, 4.2.1 e 5.2.2.3, foram utilizados na detecção dos feromônios liberados por percevejos *in vivo*.

Após os três dias de adaptação dos insetos, iniciou-se as coletas dos voláteis presentes no ambiente de teste (caixa de acrilico) e, para tanto, uma seringa de 10 mL foi inserida no interior da caixa (Figura 59) para coleta dos voláteis.

Figura 59 - Coleta dos voláteis presentes no ambiente de confinamento com o auxílio de uma seringa de 10 mL.



Fonte: o autor.

Os voláteis foram introduzidos na câmara acoplada ao AFM para realização das medidas de frequência de ressonância dos sensores nanoestruturados de cantilever. Para as medidas de frequencia de ressonância utilizou-se um equipamento de AFM (Nanosurf, Suiça), no modo dinâmico acoplado a uma camara de gases com um volume de 6,38 cm³. Primeiramente injetou-se 10 mL de ar sintético na câmara acoplada ao AFM, com a saída aberta, para limpeza. Após injetou-se 2 mL de ar sintético e monitorou-se a resposta do sensor a cada 20s, por 2 min. Na sequência, injetou-se 10 mL dos semioquímicos coletados na camara de confinamento com os percevejos com a saída aberta, e em seguida fechou-se a saída da camara e injetou-se mais 2 mL dos semioquímicos coletados para avaliação da resposta do sensor. As medidas foram realizadas a cada 20 s por 5 min. A analise foi repetida a cada 24 h, por 7 dias, com todos os sensores nanoestruturados de cantilever desenvolvidos e também com o não funcionalizado, denominado como branco. O mesmo procedimento foi realizado para o ambinente sem a presença dos percevejos.

Os experimentos foram realizados em triplicata, e entre as medidas sempre era realizada a limpeza com 10 mL de ar sintético. Na Figura 60 são apresentados detalhes do experimento de detecção dos voláteis liberados pelos insetos e da câmara de gases. Figura 60 - Experimento in vivo. (a) detalhe do scanner piezoelétrico do AFM. (b) sensor fixado no canticlipe e acoplado ao AFM. (c) câmara para injeção dos voláteis para avaliação da frequência de ressonância. (d, e, f) Acoplamento da câmara com o *scanner* do AFM. (g) seringa acoplada a mangueira para carrear os voláteis até a câmara.



Fonte: o autor.

6.2.1.5 Analise de componentes principais (PCA)

Os valores de frequência de ressonância finais dos sensoress nanoestruturados avaliados durante os 7 dias de coleta dos voláteis nas câmaras com a presença e a ausencia de insetos foram avaliados usando a analise de componentes principais usndo o sofware OriginPro 9.0 (© Origin Lab Corporation).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Experimento in vivo

A resposta dos sensores nanoestruturados de Pani/PSS, Pani/MWNT e Pani/OG aos semioquímicos naturais liberados pelos percevejos *E. heros* do experimento *in vivo* foram avaliadas no início do confinamento e a cada 24 h (Figura 61) (após o período de adaptação de 3 dias) por 7 dias (Figura 63). Para o sensor de Pani/OG, as medidas foram realizadas por 3 dias, uma vez que o sensor foi danificado.

Pode-se observar que os sensores de Pani/PSS, Pani/MWNT e Pani/OG (Figura 61 a, 61 b e 61 c) quando expostos aos voláteis presentes no ambiente contendo os percevejos e alimentação reduziu a frequência de ressonância, em relação ao ar, indicando que ocorreu uma interação entre a camada sensitiva e os voláteis, causando uma alteração na massa do cantilever e consequente redução na frequência de ressonância. Quando o sensor foi exposto aos voláteis presentes no ambiente sem a presença dos percevejos, somente com água e alimentação, observa-se que não apresentou mudança na frequência de ressonancia, permanecendo com sinal semelhante ao do ar sintético .

O sensor não funcionalizado, branco, também não respondeu aos voláteis presentes no ambiente com a presença dos percevejos, indicando que a camada sensitiva é responsável pela interação entre o sensor e os voláteis.

Figura 61 - Resposta do sensor de Pani/PSS (a) Pani/MWNT (b) e Pani/OG (c) em experimento *in vivo*.



Fonte: o autor.

Se compararmos a exposição do sensor de Pani/PSS nos ensaios com o composto sintético, 2,6,10 trimetiltridecanoato de metila (Figura 62), e nos ensaios *in vivo*, percebe-se que a redução na frequência de ressonância com o composto sintético foi de 2,3%, enquanto que no *in vivo*, essa variação foi menor, de aproximadamente 0,4%, sugerindo que a quantidade de semioquímicos liberados pelos percevejos *E. heros*, durante 24 h é extremamente pequena, causando uma variação na frequência de ressonância menor do que a concentração de 0,005µg/mL, menor concentração avaliada no experimento com o composto sintético. Essa relação é possível pois sabe-se que a frequência de ressonância é inversamente proporcional a massa depositada sobre o cantilever.

Figura 62 – Frequência de ressonância inicial e final dos sensores de Pani/PSS, Pani/MWNT e Pani/OG expostos a concentração de 0,005 µg/mL do feromônio sintético.



Fonte: o autor.

A redução da frequência de ressonância quando o sensor de Pani/MWNT (Figura 62) foi exposto ao feromônio sintético foi de 3,8%, enquanto que a redução para o experimento *in vivo* foi de aproximadamente 0,2%, podendo ser um indicativo que a quantidade do composto de interesse presente é menor que 0,005µg/mL.

No experimento com o composto sintético, o sensor de OG (Figura 62) apresentou os melhores resultados, apresentando redução na frequência de ressonância de 0,1%, igual a redução observada no experimento *in vivo*, frente aos voláteis liberados pelos percevejos.

A resposta do sensor de Pani/PSS ao longo de 7 dias foi linear, reduzindo a frequência de ressonância com o passar dos dias, indicando um aumento na massa adsorvida pelo sensor, até 96 h, após esse período não foi possível diferenciar as medidas de frequência de ressonância. A partir desses dados, foi realizado um teste com uma concentração conhecida (0,3µg/mL) do composto sintético, 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, para avaliar se o sensor continuava respondendo a presença do composto de interesse. Verificou-se que o sensor apresentou resposta a este composto, podendo ser um indicativo que após 96 h de exposição, o sensor apresentava o máximo de adsorção, não conseguindo captar concentrações maiores ou que o ambiente com os percevejos, após esse período, apresentava a concentração máxima de voláteis de interesse (Figura 63 a)

O sensor de Pani/MWNT (Figura 63 b), respondeu de forma constante, reduzindo a frequência de ressonância, até 48 h após o confinamento. Já o sensor de Pani/OG, respondeu a presença dos voláteis, reduzindo a frequencia de ressonancia, até 72h (Figura 63 c)



Figura 63 - Resposta do sensor de Pani/PSS (a) Pani/MWNT (b) e Pani/OG (c) em experimento.

A Figura 64 mostra um esquema das interações no experimento *in vivo* contendo os percevejos, além dos alimentos presentes na caixa. Esses compostos coletados e avaliados pelos sensores nanoestruturados de cantilever conseguiram reconhecer somente os compostos liberados pelos percevejos, e esssas respostas foram detectadas pela redução da frequência de ressonância, indicando uma deposição de massa sobre o sensor.

Figura 64 - Esquema do experimento in vivo. Simulação das condições ambientais do *H. heros*, com presença de alimentos (vagem de soja e amendoim) e água, temperatura e umidade controladas, com o objetivo de avaliar a eficiência dos diferentes sensores.



Fonte: o autor.

Na literatura encontramos poucos estudos que simulam o ambiente no campo e realizam experimentos *in vivo* em laboratório. Moitra el al., (2016) desenvolveram um dispositivo MEMS miniaturizado, para detecção de feromônios sexuais de *Helicoverpa armigera*, através da variação da frequência de ressonância e realizam em conjunto um experimento *in vivo* com a presença das pragas e de plantas de tomate e verificaram que o sensor foi capaz de detectar tanto o composto sintético quanto o composto liberado pelos insetos, com limite de detecção na ordem fentograma.

6.3.2 Análise de PCA

As respostas dos sensores nanoestruturados com e sem a presença dos voláteis dos insetos foram analisadas pela técnica estatística de análise de componentes principais (PCA)
durante os 7 dias. Verifica-se que os sensores conseguem discriminar a presença dos volateis na câmara, e também dos diferentes tempos de análise (Figura 65). Além disso, foram levadas em consideração as variâncias dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) gerando 98,31% do total de informações coletadas pelos sensores.

Figura 65 - Gráficos de PCA (a) dos sensores nanoestruturados aos voláteis coletados na câmara sem e com a presença de insetos durante 7 dias.



Fonte: o autor.

6.4. CONCLUSÃO

No experimento realizado *in vivo*, com 39 percevejos, mimetizando as condições naturais do *Euschistus heros*, todos os sensores avaliados responderam, com redução da frequência de ressonância, quando expostos aos voláteis presentes no ambiente do confinamento, essas respostas foram avaliadas no início do experimento e a cada 24 h, após os 3 dias de adaptação. Os sensores de Pani/PSS conseguiram detectar os voláteis de forma linear por 96 h, os sensores de Pani/MWNT por 48h e os sensores de grafeno responderam de foram linear até 72 h após o confinamento. Após esse período, os sensores conseguiam detectar os voláteis, porem a frequência de ressonância não alteravam com o passar dos dias.

Os sensores sem funcionalização não apresentaram sensitividade aos voláteis presentes no experimento *in vivo*, indicando que a camada ativa (Pani/PSS, Pani/MWNT e Pani/OG), sobre os sensores, se mostrou eficiente para detecção dos compostos de interesse

6.5 REFERÊNCIAS

KOUROUS, G. Global pact against plant pests marks 60 years in action, http://www.fao.org/news/story/en/item/131114/icode, Acessado setembro (2018).

MOITRA, P., BHAGAT, D., PRATAP, R., BHATTACHARYA, S. A novel bio-engineering approach to generate an eminent surface-functionalized template for selective detection of female sex pheromone of Helicoverpa armigera. **Sci Rep**, v. 28., n. 6, p. 373-377, 2016.

SANTOS, J. M., RODRIGUES, S. M., RIBEIRO, D. M., PRIOR, J. V. Perspectivas e utilização de nanomateriais no diagnóstico. Acta Farmaceutica Portuguesa, v. 3, n. 1, p. 3-12, 2014.

ZHANG, A.; BORGES, M.; ALDRICH, J R.; CAMP, M. Stimulatory Male Volatiles for the Neotropical Brown Stink Bug, Euschistus heros (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 713–717, 2003.



CAPÍTULO VII

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral, pode-se concluir que o desenvolvimento de sensores nanoestruturados de cantileveres de Pani/PSS, Pani/MWNT e Pani/OG mostram-se promissores para detecção do principal componente do feromônio sexual do percevejo *E. heros*, 2,6,10 trimetiltridecanoato de metila, bem como aos voláteis liberados pelos insetos no experimento *in vivo*.

Por meio das análises realizadas foi possível verificar que a funcionalização através da técnica de LbL com Pani/PSS, Pani/MWNT e Pani/OG ocorreu de forma eficiente, sendo observada a deposição de massa com redução da frequência de ressonância a cada bicamada depositada, característica observada também pela espectroscopia de UV-Vis, também pelas imagens de morfologia realizadas no AFM e MEV demostrando que a cada bicamada depositada ocorreu uma mudança na superfície dos sensores, aumentando a rugosidade também.

Em relação as respostas dos sensores nanoestruturados de cantileveres, todos apresentaram baixo limite de detecção (1,44 fg/mL, 2,18 fg/mL e 0,91 fg/mL) permitindo assim, avaliar diferentes concentrações do principal componente do feromônio sexual do percevejo marrom, 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila. Além disso, a avaliação da durabilidade demostrou que continuam apresentando limites de detecção e sensitividade na ordem de fentogramas, mesmo após 30 dias de avaliação.

Os sensores de Pani/PSS apresentaram tempo de resposta de 37,8 s, o sensor de Pani/MWNT, de 50,4s e os sensores de Pani/OG apresentaram o melhor tempo de resposta, de 25s. Outra característica avaliada que está relacionada com a qualidade dos sensores é a capacidade de reversibilidade e repetibilidade, e os sensores de Pani/PSS e Pani/OG apresentaram capacidade de repetibilidade por 8 ciclos, com reversibilidade superior a 90%, enquanto que o sensor de Pani/MWNT apresentou repetibilidade por 2 ciclos com reversibilidade de 80%.

Todos os sensores foram avaliados em relação a resposta frente a interferentes, 4-oxo-(E) -2-hexenal, tridecano e o 2-(E)-4-(Z)-decadienoato de metila, apresentando uma pequena variação na frequência de ressonância, quando comparado com os valores da exposição ao ar, e somente o sensor de Pani/OG conseguiu diferenciar os 3 compostos.

Nos experimentos realizados *in vivo*, todos os sensores avaliados responderam a presença dos feromônios liberados pelos percevejos, com redução da frequência de ressonância, Os sensores de Pani/PSS conseguiram detectar os voláteis de forma linear por 96 h, os sensores

de Pani/MWNT por 48h e os sensores de grafeno responderam de foram linear até 72 h após o confinamento. Após esse período, os sensores conseguiam detectar os voláteis, porem a frequência de ressonância não alterava com o passar dos dias.

Os sensores sem funcionalização não apresentaram sensitividade ao feromônio sintético e nem aos voláteis presentes no experimento *in vivo*, indicando que a camada ativa (Pani/PSS, Pani/MWNT e Pani/OG), sobre os sensores, se mostrou eficiente para detecção dos compostos de interesse.

Esses resultados, embora preliminares, são bastante promissores, uma vez que abrem caminho para o desenvolvimento de estudos que busquem alternativas para detecção precoce de insetos-praga, como o percevejo marrom, reduzindo prejuízos e utilização de agroquímicos na agricultura.

7.2 TRABALHOS FUTUROS

A seguir são apresentadas sugestões de trabalhos futuros relacionadas ao desenvolvimento de sensores nanoestruturados para detecção de feromônios de insetos-praga:

- 1. Avaliação das taxas de liberação dos feromônios na câmara desenvolvida;
- 2. Testes com outros interferentes e em diferentes concentrações, bem como experimentos *in vivo* com outros percevejos, para avaliar a especificidade dos sensores;
- Testes com septos contendo feromônios em concentração conhecida para avaliar a resposta dos sensores;
- Buscar alternativas para desenvolver sensores, com base nas camadas ativas avaliadas e no mecanismo de ação proposto, que possam ser testados *real time* nas lavouras;
- Desenvolvimento de aplicativo para captar as informações dos sensores e assim avaliar precocemente as infestações nas lavouras;



CAPÍTULO VIII

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

8.1 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Os resultados das pesquisas realizadas, até o presente momento, geraram trabalhos na forma de artigo e publicações em congressos nacionais e internacionais. Além disso, algumas contribuições foram feitas gerando artigos com co-autoria. A seguir estão descriminados os respectivos trabalhos.

- BREZOLIN, A. N.; CEZARO, A. M; RIGO, A. A.; MUENCHEN, D. K.; MARTINAZZO, J.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J; MORAES, M. C. B.; BORGES, M. Tools for detecting insect semiochemicals: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, p. 1-18, 2018.

- STEFFENS, C.; BREZOLIN, A. N.; STEFFENS, J. Conducting Polymer-Based Cantilever Sensors for Detection Humidity. **Scanning**, v. 2018, p. 1-6, 2018.

- NAVA, A.; MARTINAZZO, J.; MUENCHEN, D. K.; RIGO, A. A.; CEZARO, A. M.; MANZOLI, A.; NAVA, A. L.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; MORAES, M. C. B. . Funcionalização de cantilever com bicamadas de polianilina e nanotubos de carbono. In: Anais do 2 International Congress of Management, Techonology and Innovation. Erechim: Edifapes, 2016.

- NAVA, A.; MARTINAZZO, J.; MUENCHEN, D. K.; RIGO, A. A.; CEZARO, A. M.; NAVA, A. L.; MANZOLI, A.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; MORAES, M. C. B. Desenvolvimento de nanosensor para detecção de feromônios. Anais do 2 International Congress of Management, Techonology and Innovation. Erechim: Edifapes, 2016.

- GIARETTON, B. E. K.; CEZARO, A. M. ; NAVA, A.; MANZOLI, A.; RIGO, A. A.; STEFFENS, C.; MUENCHEN, D. K.; NAVA, A. L.; MARTINAZZO, J.; STEFFENS, J.; MORAES, M. C. B. Caracterização por UV-VIS E DRX da síntese interfacial de polianilina. In. Anais do III CONIGTI - Congresso Internacional De Gestão Tecnologia e Inovação, 2017.

- GAYESKI, L.; CEZARO, A. M.; MANZOLI, A.; NAVA, A.; RIGO, A. A.; STEFFENS, C.; NAVA, A. L; MUENCHEN, D. K.; MARTINAZZO, J.; STEFFENS, J.; MORAES, M. C. B.
Funcionalização ácida de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e caracterização por UV-VIS E DRX. In: III CONIGTI - Congresso Internacional De Gestão Tecnologia E Inovação, 2017, Erechim. Anais Do III Conigti - Congresso Internacional De Gestão Tecnologia E Inovação, 2017.

- NAVA, A.; MARTINAZZO, J.; MUENCHEN, D. K.; RIGO, A. A.; CEZARO, A. M.; MANZOLI, A.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J. Funcionalização de microcantilever com bicamadas de Pani. Anais da Mostra Científica das Ciências Agrárias e Ciências Biológicas da URI - Erechim. Erechim: Edifapes, 2016. v. 3.

- NAVA, A.; MARTINAZZO, J.; RIGO, A. A.; MUENCHEN, D. K.; MANZOLI, A.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; MORAES, M. C. B. Funcionalização com Pani/PSS através da técnica de layer by layer. Anais do SIIC- XXIII Seminário Institucional De Iniciação Científica, XXI Seminário De Integração De Pesquisa E Pós Graduação E XV Seminário De Extensão, 2017.