

Proposta Interdisciplinar para o Ensino de Química no Ensino Médio: Controle Biológico de Inseto Praga

Interdisciplinary Proposal for Teaching Chemistry in High School: Biological Control of Insect Pests

Igor Oliveira de Almeida,^a  **Luís Felipe Costa Ramos,^a**  **Cristiane Dinis AnoBom,^a** 
Danielle Maria Perpétua de Oliveira^{a,*} 

^a *Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Ilha do Fundão, Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, CEP 21941-909, Rio de Janeiro-RJ, Brasil*

*danioliveira@iq.ufrj.br

• **Manutenção dos insetos no laboratório de pesquisa (Laboratório de Bioquímica Estrutural de Proteínas – LABEP – Instituto de Química – UFRJ)**

A colônia de *A. gemmatalis* foi mantida em laboratório, obtida após doação de insetos pela EMBRAPA Soja (através de termo de transferência de material - TTM). As lagartas e os animais adultos foram alimentados utilizando dieta artificial contendo feijão carioquinha, gérmen de trigo, proteína da soja, caseína (leite em pó desnatado), levedura, ágar, ácido ascórbico, ácido sórbico, nipagina, antibiótico (amoxicilina), complexo vitamínico e formaldeído, nas proporções indicadas (Hoffmann-Campo *et al.*,1985).¹ A colônia foi mantida a 25 ± 3 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 horas (luz/escuro). Os adultos foram mantidos em caixas de plástico, recobertas internamente por folhas de papel branco, onde as fêmeas faziam a postura de ovos durante o período escuro. As folhas de papel foram retiradas após 24 h de postura, e os ovos coletados foram postos em potes de plástico com a dieta artificial. As lagartas eclodidas foram alimentadas até atingir o estágio de pupa (metamorfose), e transferidas para as gaiolas, onde emergiram em adultos, reiniciando o ciclo. A preparação da dieta está detalhada no Quadro 1.



Quadro 1. Preparo de dieta artificial de lagartas (modificado de Hoffmann-Campo *et al.*,1985)¹

Nutriente	Para 500 mL
Feijão (seco e moído)	31,2 g
Gérmen de trigo	25 g
Proteína de soja	12,5 g
Leite em pó desnatado	12,5 g
Levedura	15,6 g
Ágar	10 g
Ácido ascórbico	1,5 g
Ácido sórbico	0,75 g
Nipagina	1,25 g
Antibiótico	1 cápsula
Polivitamínico	2 comprimidos
Formaldeído	1,5 mL
Água destilada	500 mL (completar)

O feijão deve ser seco em estufa a 100 °C por duas horas e, em seguida, triturado em liquidificador e peneirado. Os ingredientes devem ser misturados com a água até o ágar em liquidificador e, posteriormente, aquecidos no micro-ondas por cinco minutos; após misturar, aquecer por mais três minutos. Deve-se aguardar o resfriamento até que seja possível tocar a preparação com as mãos e, então, adicionar os demais ingredientes antes do completo resfriamento. Por fim, a preparação deve ser mantida em geladeira até o momento do uso.

Referências Bibliográficas

1. Hoffmann-Campo, C. B.; Moscardi, F.; Corrêa-Ferreira, B. S.; Oliveira, L. J.; Sosa-Gomez, D. R.; Panizzi, A. R.; Corso, I. C.; Gazzoni, D. L.; Oliveira, E. B.; *Pragas da Soja no Brasil e seu Manejo Integrado*, 1a. ed., Embrapa Soja: Londrina, 2000. (Circular Técnica, 30). [\[Link\]](#)



- **Protocolo de extração, diagnóstico e estoque de toxinas Bt e *Bacillus thuringiensis* a partir de células liofilizadas em papel**

1. Pré-inóculo a partir do papel

- Preparar e autoclavar previamente o caldo nutriente (*nutrient broth*, Himedia, 13 g L⁻¹).
- Utilizar o fluxo laminar estéril. Deixar sob a luz UV por 20 min: pinça, bécher com álcool 95% (comercial), lamparina, fósforos/isqueiro, tubos tipo Falcon estéreis de 50 mL, fita adesiva.
- Transferir 5 mL de caldo nutriente para tubos tipo Falcon de 50 mL: 1 tubo para cada cepa e um controle.
- Acender a lamparina.
- No fluxo, abrir o pacote contendo os papéis.
- Flambar a pinça e com ela mergulhar a ponta de um papel no meio líquido em cada tubo. Flambar novamente.
- Tampar os tubos tipo Falcon e incubar em 35-37 °C, sob agitação de 230 rpm, por 48 h. Checar turbidez do controle.
- Selar o pacote com fita adesiva dentro do fluxo.

2. Estoque em glicerol

- Preparar e autoclavar previamente glicerol 50%.
- Utilizar o fluxo laminar estéril. Deixar sob luz UV por 20 min: pipeta P-1000, ponteiros estéreis, glicerol, eppendorfs estéreis.
- Transferir 0,7 mL do pré-inóculo e 0,3 mL de glicerol 50% para um eppendorf estéril. (concentração final de glicerol: 15%).
- Armazenar em freezer -80 °C.

3. Estoque em meio sólido

- Preparar e autoclavar previamente ágar nutriente (*nutrient agar*, Himedia, 28 g L⁻¹), tubos *Slant*.



- Utilizar o fluxo laminar estéril. Deixar sob luz UV por 20 min: *Slants* estéreis (3 para cada cepa), pipetas P-20, ponteiros estéreis, Tubos tipo Falcon contendo álcool 95% (comercial), alça microbiológica de platina, lamparina, fósforos/isqueiro.
- Derreter o ágar nutriente. No fluxo laminar, transferir para *Slants* de modo que levemente inclinados, o meio cubra toda a superfície inferior. Deixar esfriar inclinados e abertos no fluxo.
- Acender a lamparina.
- Transferir 20 µL do pré-inóculo para a superfície do meio. Flambar a alça, deixar esfriar encostando-a no meio e distribuir as células pela superfície. Flambar novamente.
- Atarraxar levemente a tampa e incubar os tubos a 37 °C em estufa sem agitação, por 3-4 dias.
- Atarraxar bem e estocar em geladeira.

Obs: A cepa *kurstaki* H:3q3b3c LFB-FIOCRUZ 475, por esse método, não forma colônias esparsas, mas sim uma película na superfície do meio.

4. Pré-inóculo a partir de *Slants*

- Preparar e autoclavar previamente caldo nutriente.
- Utilizar o fluxo laminar estéril. Deixar sob luz UV por 20 min: pipeta P-1000, ponteiros, tubos tipo Falcon com álcool 95% (comercial), lamparina, fósforos/isqueiro, alça microbiológica, tubos tipo Falcon estéreis de 50 mL.
- Transferir 5 mL de caldo nutriente para tubos tipo Falcon de 50 mL: 1 tubo para cada cepa e um controle.
- Acender a lamparina.
- No fluxo laminar, abrir os *Slants*.
- Flambar a alça microbiológica e com ela pegar algumas colônias do meio sólido. Mergulhar e distribuí-las no meio líquido em cada tubo. Flambar novamente.
- Tampar os tubos e incubar em 35-37 °C, sob agitação de 230 rpm, por 48 h. Checar turbidez do controle.
- Atarraxar os *Slants* e estocar em geladeira para novos pré-inóculos.



5. Obtenção de esporos para extração de toxinas

- Preparar e autoclavar previamente caldo nutriente e frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL (volume de 5 a 10 vezes o volume de cultura a ser crescida, preferencialmente 10 X).
- Utilizar o fluxo laminar estéril. Deixar sob luz UV por 20 min: pipeta P-1000, ponteiras estéreis, Frascos tipo Erlenmeyer estéreis, tubos tipo Falcon 50 mL estéreis.
- Transferir 25 mL (ou o volume de cultura a ser crescido) de caldo nutriente para os tubos (um para cada cepa e um controle). Misturar com 1 ou 5 mL de pré-inóculo em cada tubo, menos no controle. Passar para os frascos tipo Erlenmeyer e tampá-los.
- Deixar agitando a 200 rpm e 37 °C por 5 dias. Checar turbidez do controle.
- Centrifugar a cultura a 7500 g por 30 min a 4 °C. Descartar o meio sobrenadante e congelar o precipitado de células.

6. Extração de pré-toxinas solúveis

- Ressuspender o precipitado de células em 25 mL (volume igual ao da cultura crescida) de solução de NaCl 1 mol L⁻¹, 0,1% Triton X-100. Centrifugar a 7500 g, 4 °C por 15 min. Descartar o sobrenadante.
- Ressuspender o precipitado em 25 mL (volume igual ao da cultura crescida) de H₂O MilliQ. Centrifugar a 7500 g, 4 °C por 15 min. Descartar o sobrenadante.
- Incubar os precipitados em 1,25 mL (20 vezes menos o volume da cultura crescida) de tampão Na₂CO₃ 50 mM, 0,1% β-mercaptoetanol, pH 9,6 por 2 h a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 16000 g, 4 °C por 30 min. O sobrenadante contém a pré-toxina solubilizada.
- Diagnóstico: Observação em eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE 10%). No sobrenadante observa-se banda em aproximadamente 130 kDa equivalente à toxina.



- **Questionário inicial do estudante**

Caro estudante,

Apresentamos a seguir um questionário com perguntas cujas respostas são muito importantes para que possamos avaliar o projeto que trabalharemos. Vale salientar que não é necessário se identificar nesse documento.

Obrigado!

1. Nessa etapa da sua formação, em que está cursando o Ensino Médio, você espera:

- ser preparado para entrar na universidade.
- ser preparado para no futuro ter uma profissão.
- ser preparado para aprender coisas práticas para o seu dia a dia.
- outro: _____

2. Em geral, o que você tem aprendido na escola:

- é completamente inútil para a sua vida.
- não tem nenhuma importância para o que lhe interessa.
- tem coisas úteis e inúteis em número equilibrado.
- tem tudo a ver com o que você necessita para o seu futuro.
- outro: _____

3. Já sabe o que vai fazer quando terminar o Ensino Médio?

- Sim.
- Não.

Comentários:

4. Escreva pelo menos uma qualidade que você considera indispensável em um professor.

- I. _____
- II. _____
- III. _____

5. Você tem facilidade para aprender Química? Justifique em poucas palavras a alternativa que marcou.

- Sim.
- Não.

Comentários:



6. Você se sente estimulado a estudar Química?

Sim.

Não.

Comentários:

7. Os professores das disciplinas de Ciências da Natureza (Biologia, Química e Física) tratam os assuntos dessas matérias relacionando a Biologia, a Química e a Física?

Sim.

Não.

Comentários:

8. Você consegue relacionar os conceitos que você aprende em Química com as demais Ciências da Natureza?

Sim.

Não.

Comentários:

9. Você consegue relacionar os conteúdos que você aprende em Química com o seu dia a dia?

Sim.

Não.

Comentários:

10. Você acredita que o conteúdo de Química seria melhor aprendido com aulas experimentais?

Sim.

Não.

Comentários:

11. Você sente dificuldade em compreender o assunto de Soluções Químicas? Se sua resposta for sim, qual o fator que você atribui essa dificuldade.

Sim.

Não.

Comentários:



12. Em relação ao conteúdo de Soluções Químicas, conceitue:

I. Soluções:

II. Concentrações de soluções:

III. Diluição de Soluções:

13. Você sabe o que é um agrotóxico?

Sim.

Não.

Comentários:

14. Indique até três palavras relacionadas ao tema agrotóxico

I. _____

II. _____

III. _____

15. Já ouviu ou leu alguma reportagem sobre a temática agrotóxicos? Se sim, em qual(is) meio(s) de comunicação?

Sim. (_____)

Não.

16. Você teve ou tem contato com agrotóxicos?

Sim.

Não.

Comentários:

17. Você já ouviu falar em Pesticidas Biológicos? Se sua resposta for “sim”, diga, em poucas palavras, o que você entende sobre esses pesticidas.

Sim.

Não.



18. Você sabe se há diferença entre um Pesticida Químico e um Pesticida Biológico? Comente sua resposta.

Sim.

Não.

19. Faça uma relação entre concentrações e diluições de soluções com a eficácia dos pesticidas.

20. Escreva a primeira ideia que vem a sua cabeça quando se pensa em Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente.

FIM

Ufa, terminamos!

Muito obrigado por tua contribuição, tuas respostas são muito importantes para nossa pesquisa!

Um grande abraço e até a próxima!



- **Questionário Final do Estudante**

Caro estudante,

Apresentamos a seguir um questionário com perguntas cujas respostas são muito importantes para que possamos avaliar o projeto que trabalharemos. Vale salientar que não é necessário se identificar nesse documento.

Obrigado!

1. Em relação ao conteúdo de Soluções Químicas, conceitue:

I. Soluções:

II. Concentrações de soluções:

III. Diluição de Soluções:

2. Você sabe o que é um agrotóxico?

Sim.

Não.

Comentários:

3. Indique até três palavras relacionadas ao tema agrotóxico

I. _____

II. _____

III. _____

4. Você teve ou tem contato com agrotóxicos?

Sim.

Não

Comentários:

5. Você já ouviu falar em Pesticidas Biológicos? Se sua resposta for “sim”, diga, em poucas palavras, o que você entende sobre esses pesticidas.

Sim.

Não.

6. Você sabe se há diferença entre um Pesticida Químico e um Pesticida Biológico? Comente sua resposta.

Sim.

Não



Comentários:

7. Faça uma relação entre concentrações e diluições de soluções com a eficácia dos pesticidas.

8. Escreva a primeira ideia que vem à sua cabeça quando se pensa em Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente.

9. Escreva o que você achou sobre os nossos encontros, destacando o que mais te marcou.

10. Você acredita que esses encontros foram válidos para a sua formação acadêmica e como cidadão? Comente.

11. Os conceitos de soluções e diluições químicas ficaram mais claros agora que você participou desses encontros? Comente.

Sim.

Não

Chegamos ao fim dos nossos encontros nessa oficina. Eu espero que tenha sido tão proveitoso e divertido para você como foi para mim.

Mais uma vez, muito obrigado por tua contribuição e participação, sua participação foi importante para nossa pesquisa!

Um grande abraço e até a próxima!



Roteiro para experimento de sobrevivência de lagartas frente ao desafio alimentar

Parte da oficina de Química para a Segunda Série do Ensino Médio

Coordenação: Professor Igor Oliveira de Almeida

Supervisão: Professora Danielle Maria M. de O. Santos (UFRJ)

Parceria Escola / Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da UFRJ

Objetivos:

Acompanhar a mudança de peso corporal e a sobrevivência de lagartas de 4^o / 5^o ínstar da espécie *Anticarsia gemmatalis* (praga agrícola de folhas de soja no Brasil) após desafio alimentar utilizando pesticidas químico e biológico em concentrações diferentes.

Material utilizado:

- Lagartas de 4^o / 5^o instar
- Dieta artificial de lagarta da soja – (1 g de alimento/ lagarta)
- Potes de sorvete com tampa (com furos pequenos)
- Tampinhas de garrafa de plástico
- Solução aquosa contendo esporos de Bt (*Bacillus thuringiensis*) 0,5 mg mL⁻¹
- Solução aquosa de Dimy Pel[®] (preparo comercial de Bt) 10 mg mL⁻¹
- Solução aquosa de Deltametrina (inseticida químico comercial, marca Forth[®]) 1 mg mL⁻¹
- Balança de precisão para pesagem dos insetos
- Provetas, pipetas de vidro, bécheres e espátulas
- Canetas e etiquetas

Procedimentos (para cada grupo):

- 1) Cada grupo irá receber 4 potes contendo 5 lagartas cada. Será feita a identificação e pesagem de cada pote com as lagartas;
- 2) Cada grupo irá preparar as diluições do componente que recebeu para o teste na comida usando a vidraria do laboratório (serão 3 diluições diferentes do componente recebido **sempre em água**);
- 3) O grupo irá misturar a diluição (no volume de ____ mL) à dieta artificial usando espátula e acondicionar a mistura na tampinha de plástico. Esta será inserida no pote correspondente contendo os insetos;
- 4) Lembrando que o grupo CONTROLE não terá nenhum composto misturado, apenas o volume do diluente (água);
- 5) Observar a sobrevivência dos insetos nos três dias seguintes, se possível sempre nos mesmos horários, e fazer a pesagem do pote (retirando a tampinha com a dieta);
- 6) Anotar todas as observações, fazendo os registros visuais e fotográficos (caso queiram).

Preparo das soluções:

Os alunos irão preparar 3 soluções diluídas do composto recebido para o teste, para volume final de 5 mL, nas diluições: _____; _____; _____
(cada grupo irá preparar os cálculos das diluições previstas para o seu grupo)



Grupo: _____

Componentes: _____

Composto testado: _____

Concentrações de uso: _____

Pesagem:

Dia da Pesagem	Pote 1 (Controle)	Pote 2	Pote 3	Pote 4

Observações dia 1:

Observações dia 2:

Observações dia 3:

Observações dia 4:

Observações finais:

