

152

PURIFICAÇÃO DE QUITINASES DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*. Lucélia Santi, Caroline K. de Moraes, Marilene H. Vainstein, Augusto Schrank (Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, UFRGS)

O controle biológico é uma alternativa viável e vantajosa em relação ao controle químico, principalmente quanto ao impacto ambiental, custo, especificidade e desenvolvimento de resistência. *Metarhizium anisopliae* é um fungo entomopatogênico usado para o controle de um grande número de insetos. A infecção ocorre pela penetração direta na cutícula do hospedeiro, mediada pela combinação de pressão mecânica e degradação enzimática (principalmente por lipases, quitinases e proteases). O presente trabalho tem por objetivo purificar as quitinases produzidas por *M. anisopliae* em condições de indução. Inicialmente estamos comparando métodos usuais de concentração de proteínas, aplicando-os as quitinases. Foram usados quatro métodos para concentração: ultrafiltração, centrifugação em Centriprep, liofilização e precipitação com sulfato de amônia ((NH₄)₂SO₄). As amostras foram dialisadas e realizados ensaios de quantificação de proteína total e enzimáticos para determinação de quitinases com os seguintes substratos: quitina coloidal, N,N'- diacetylchitobiose, N,N',N''- triacetylchitotriose e N,N',N'',N'''- tetracetylchitotetraose. Pelos resultados obtidos, pôde-se verificar que a centrifugação em Centriprep é o método mais eficiente para concentração destas enzimas, acarretando uma menor perda de quitinase do que os outros métodos utilizados. Em aplicações Industriais, os refratários são constantemente submetidos a variações térmicas, mecânicas e químicas. O presente trabalho tem por objetivo, estudar a variação da resistência ao choque térmico da zirconita (ZrSiO₄), através da aditivação por uma mistura do sistema alumina-titânia: (Al₂O₃ – TiO₂ – Al₂TiO₅), obtida pela calcinação de um rejeito industrial rico em titânia e alumina hidratada. Foram preparadas composições com teores de 10 a 50% desta mistura, com um restante de zirconita. As amostras foram prensadas uniaxialmente e queimadas a 1100°C por 4h. A resistência mecânica após o choque térmico em água foi medida por meio de flexão a quatro pontos. Pelos resultados obtidos, pôde-se verificar o aumento da resistência mecânica de um refratário à base de zirconita pela adição, do rejeito industrial constituído de Al₂O₃ – TiO₂. As composições aditivadas com 30-40% de Al₂O₃ – TiO₂ produziram os maiores efeitos no aumento da resistência ao choque térmico. O fungo entomopatogênicos, comparados a outros sistemas utilizados em controle biológico, apresentam um mecanismo especial de infecção que ocorre pela penetração nos hospedeiros, sem necessariamente haver ingestão. *Metarhizium anisopliae* é um patógeno de insetos. A infecção ocorre pela penetração direta na cutícula do hospedeiro, mediada pela combinação de pressão mecânica e degradação enzimática (principalmente por lipases, quitinases e proteases) Esta cutícula é composta por uma camada externa fina composta de proteínas e lipídios e uma camada interna grossa de proteínas e, principalmente quitina (St. Leger et al., 1999). Materiais e métodos: O fungo foi crescido em meio de Cove com quitina como substrato (0,8% quitina, 0,3% extrato de levedura, 0,6% NaNO₃, e, após autoclavagem, adicionados 2% solução de sais e 0,04% elementos traços) com inóculo de 10⁸ esporos/ml em shaker durante 7 dias a 30°C, 200rpm. Após o crescimento, o meio foi filtrado, o micélio foi pesado e separado e o sobrenadante foi dialisado. Depois de dialisado, o sobrenadante foi separado em alíquotas para teste de diferentes métodos de concentração de proteínas. O micélio foi congelado com N₂ líquido, macerado e o material foi ressuscitado em tampão.. M tris-HCl pH... Foi feito ensaio enzimático para dosar a atividade da quitinase em diferentes substratos.