



**ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA**  
**INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO**

**Degradação Fúngica de Substratos Recalcitrantes – Estudo  
de Alguns Parâmetros Bioquímicos Durante a Colonização  
de Cortiça pelo Ascomicota *Penicillium glandicola* :  
Ergosterol (Biomassa) e Proteoma Fúngico.**

**Engenharia Florestal**

**Relatório do Trabalho de Fim de Curso**

**Cátia Filipa Mendes Rodrigues**

—◆—  
**CASTELO BRANCO**

**2006**

## Índice

<b>ORIENTADORES E LOCAL DE ESTÁGIO .....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1- <i>PENICILLIUM GLANDICOLA</i> .....	1
1.2- MÉTODOS DE MONITORIZAÇÃO DE COLONIZAÇÃO FÚNGICA.....	2
1.2.1- Ergosterol .....	2
1.2.2- Cultura líquida: densidade óptica.....	2
1.2.3- Cultura sólida: diâmetro.....	3
1.3- IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS NO DECAIMENTO DOS COMPÓSITOS NATURAIS.....	3
1.3.1- Biodeteorização .....	3
1.3.2- Compostagem .....	4
1.3.3- Bioremediação.....	4
1.4- PRODUÇÃO DE METABOLITOS SECUNDÁRIOS.....	5
1.4.1- Micotoxinas.....	5
1.4.2- Antibióticos .....	5
1.5- CORTIÇA.....	6
1.5.1- Constituição química .....	6
1.6- PAREDE CELULAR DAS PAREDES DAS PLANTAS.....	7
1.7- DEGRADAÇÃO DA LENHINA/SUBERINA POR FUNGOS .....	8
1.8- PROTEÓMICA .....	9
1.8.1- Electroforese 2-D.....	9
1.8.1.1- Aspectos experimentais.....	10
1.8.1.1.1- Preparação da amostra.....	11
1.8.1.1.2- Focagem isoelectrica .....	11
1.8.1.1.3- SDS-PAGE .....	12
1.8.1.1.4- Detecção, quantificação e identificação das proteínas .....	12
<b>CAPÍTULO 2- MÉTODOS GERAIS .....</b>	<b>13</b>
2.1- MATERIAL BIOLÓGICO.....	13
2.2- CORTIÇA EXTRACTADA .....	13
2.3- SELECÇÃO MEIO DE CULTURA.....	14
2.4- PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS .....	15
2.5- CULTURAS FÚNGICAS .....	16
2.6- AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO .....	17
2.6.1- Diâmetro.....	17
2.6.2- Peso seco.....	17
2.7- EXTRACÇÃO DO ERGOSTEROL.....	18
2.7.1- HPLC.....	19
2.7.1.1 - Colunas.....	20
2.7.1.2 – Injector.....	21
2.7.1.3 - Bomba.....	21
2.7.1.4 - Detector .....	21
2.7.1.5 – Sistema de HPLC utilizado.....	21

2.7.1.6 – Optimizações realizadas .....	21
2.8- MÉTODOS DE EXTRACÇÃO PROTEICA.....	22
2.8.1- Preparação da amostra .....	22
2.8.2- Quantificação da proteína.....	24
2.8.3- Separação na primeira dimensão – Focagem isoelectrica .....	24
2.8.4- Separação na segunda dimensão – SDS-PAGE .....	25
2.8.5- Coloração do gel.....	25
2.8.6- Análise de imagem dos géis .....	26
<b>CAPÍTULO 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
3.1- PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS .....	28
3.2- CURVAS DE CRESCIMENTO.....	29
3.2.1- Meio sólido .....	29
3.2.2- Meio semi-sólido.....	31
3.2.3- Meio líquido .....	32
3.3- ERGOSTEROL.....	33
3.3.1 - Estimativa do crescimento em função do ergosterol .....	37
3.4- PROTEÓMICA .....	39
3.4.1- Optimização da extracção proteica.....	39
3.4.2- Comparação entre perfis proteicos .....	40
<b>CAPÍTULO 4- CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>44</b>
4.1- CURVAS DE CRESCIMENTO.....	44
4.2- ERGOSTEROL.....	44
4.3- PROTEÓMICA .....	45
4.4- PERSPECTIVAS FUTURAS.....	45
<b>CAPITULO 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO I</b>	
<b>ANEXO II</b>	

## Resumo

O *Penicillium glandicola* é um dos fungos presentes nas pranchas de cortiça, e por isso torna-se essencial, principalmente para as corticeiras, o seu estudo ao nível da metabolização dos principais componentes da cortiça. O objectivo deste trabalho de fim de curso foi a compreensão dos mecanismos de colonização da cortiça por fungos através da execução de várias técnicas dispersas por diferentes objectivos. Dentro das técnicas a desenvolver destacou-se a necessidade de otimizar um método para quantificação de ergosterol, por HPLC, a fim de normalizar a biomassa produzida pelo fungo durante a colonização de substratos insolúveis em água. As amostras utilizadas foram obtidas através de culturas sólidas, semi-sólidas e líquidas e tendo como fontes de carbono, sacarose, cortiça ou glucose. Através dos resultados obtidos, verificou-se que o ergosterol é um bom indicador para a quantificação de biomassa fúngica. Posteriormente, procedeu-se à extracção e separação das proteínas, por electroforese bidimensional, de culturas líquidas com cortiça ou glucose (fracção intracelular e extracelular). A análise do proteoma do fungo expresso na presença de diferentes substratos permite identificar as enzimas especificamente associadas à degradação dos constituintes da cortiça (celulose, lenhina e suberina).

**Palavras-chave:** *Penicillium glandicola*, Cortiça, Ergosterol, Proteoma, Electroforese bidimensional.