

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WELLINGTON BALMANT

MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO MICROSCÓPICO DE
FUNGOS FILAMENTOSOS EM SUPERFÍCIES SÓLIDAS

CURITIBA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WELLINGTON BALMANT

MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO MICROSCÓPICO DE
FUNGOS FILAMENTOSOS EM SUPERFÍCIES SÓLIDAS

Tese de Doutorado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

WELLINGTON BALMANT

MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO MICROSCÓPICO DE
FUNGOS FILAMENTOSOS EM SUPERFÍCIES SÓLIDAS

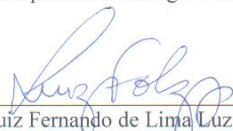
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de
Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



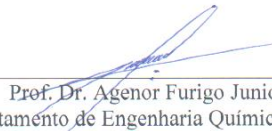
Prof. Dr. David Alexander Mitchell
Orientador – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Prof. Dr. Luiz Fernando de Lima Luz Junior
Departamento de Engenharia Química, UFPR



Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Departamento de Engenharia Química, UFSC



Prof.^a Dr.^a Graciele Viccini Isaka
Instituto Federal de Santa Catarina

Curitiba, 29 de outubro 2013.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. David A. Mitchell, por toda a liberdade e apoio a mim concedidos, e por toda confiança em mim depositada desde as primeiras aulas de Bioquímica da graduação, agradeço. Por sempre acreditar na minha capacidade, pelos sábios conselhos sobre ciência e sobre a vida, serei sempre grato.

Agradeço em especial a doutoranda Maura Sugai, por todo auxílio prestado durante a realização desse trabalho. Provavelmente sem sua contribuição eu não teria completado este trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto, em especial aos alunos do laboratório de fermentações na Bioquímica, em especial a Alessandra, Fernanda, Luana, Francine e Edgar. Ao laboratório de tecnologia enzimática em especial a Diniara. Ao NPDEAS em especial o Professor José Vargas e André Mariano.

À Coordenação da Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular e à UFPR, agradeço por proporcionarem um ensino de qualidade e de valor para a sociedade. Agradeço igualmente à CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca, professor Agenor Furigo Jr., professor Emmnuel Maltempi, professor Luiz Fernando de Lima Luz Jr e a Professora Gracielle Viccini, agradeço pelas contribuições ao trabalho.

A toda minha família, agradeço pelo carinho! Aos meus pais, Tereza e Luiz, faltam palavras para expressar a gratidão. A minha irmã, Bruna, igualmente. Foram eles que sempre me apoiaram nas decisões e indecisões durante toda a minha vida, e principalmente estiveram presentes nos períodos críticos durante a realização deste trabalho. Agradecer é pouco!

E agradeço a Deus, pela constante inspiração...

Resumo

O crescimento microscópico de fungos filamentosos sobre superfícies sólidas envolve uma série de processos, como translocação de nutrientes, ramificação, alongamento da hifa e diferenciação celular. Uma ferramenta capaz de integrar e compreender todos esses processos ao mesmo tempo é modelagem matemática. Porém devido a complexidade do sistema, se torna difícil a obtenção diretamente um modelo matemático global que descreva todos os processos simultaneamente. Dessa forma, é necessário dividir o sistema em sub-sistemas para que cada processo possa ser modelados separadamente e depois fundidos em um modelo global. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver dois modelos matemáticos para descrever dois processos que envolvem o crescimento microscópico de fungos filamentosos sobre superfícies sólidas. O primeiro modelo foi proposto para descrever os mecanismos de translocação de nutrientes e de alongamento de uma única hifa. Nesse modelo a hifa é representada como sendo composta de cubos, que podem ser tratados como tanques em série bem agitados. A fonte de maltose (nutriente limitante) se encontrava na base da hifa e são translocados por difusão e convecção dentro da hifa. Dentro da hifa a maltose é convertida em vesículas que são transportadas até ponta por convecção. Na ponta da hifa as vesículas se fundem e alongam o comprimento da hifa. O modelo foi calibrado para descrever o comprimento de uma hifa reprodutiva de *Rhizopus oligosporus* com 24 horas de alongamento. Através da análise paramétrica do modelo, os parâmetros que mais influenciaram o alongamento da hifa foram os parâmetros relacionados ao fornecimento de maltose para hifa. O segundo modelo foi proposto para descrever as regras de ramificação e os processos de diferenciação. Neste modelo o sistema foi dividido em camadas de 140 μm onde os segmentos de hifa podem alongar a ramificar em ângulos fixos de 90°. Esse modelo foi proposto tanto para descrição das hifas aéreas quanto penetrantes. As hifas aéreas foram descritas como sendo compostas por hifas vegetativas e reprodutivas. As hifas penetrantes foram descritas como sendo compostas por hifas vegetativas e desbravadoras. Esse modelo foi capaz de descrever com precisão tanto as hifas aéreas, quanto as hifas penetrantes. Os dois modelos propostos nesse trabalho podem ser fundidos em único modelo que seria capaz de descrever a maioria dos processos que ocorrem durante o crescimento microscópico de fungos filamentosos sobre superfícies sólidas.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. Modelagem matemática. Tanques em séries. Hifas penetrantes. Hifas aéreas. Distribuição Normal.

ABSTRACT

The microscopic growth of filamentous fungi on a solid surface involves a series of processes such as transport of nutrients, branching, hyphal elongation and cell differentiation. A tool able to integrate and understand all these processes simultaneously is the mathematical modeling. However due to the complexity of the system, it becomes difficult to obtain directly a mathematical model that describes all global processes simultaneously. Thus, it is necessary to divide the system into sub-systems so that each process can be modeled separately and then merged into a global model. In this context, the aim of this study was to develop two mathematical models to describe two processes involving the growth of microscopic filamentous fungi on solid surfaces. The first model was proposed to describe the mechanisms for transport of nutrients and single hyphal elongation. In this model, the hypha is represented as being composed of cubes, which can be treated as well stirred tanks in series. The source of maltose (limiting nutrient) is at the basis of the hyphae and are translocated by diffusion and convection within the hyphae. Within the hyphae maltose is converted into vesicles that are transported by convection to tip. At the tip of hyphae vesicles merge and expand the length of the hyphae. The model was calibrated to describe the length of a reproductive hypha *Rhizopus oligosporus* with 24 hours of elongation. Through parametric analysis of the model, the parameters that most influenced the elongation of hyphae were the parameters related to the supply of maltose hyphae. The second model was proposed to describe the rules of branching and differentiation processes. In this model system is divided into layers 140 μm hyphal segments which can lengthen the branch angle fixed at 90° . This model was proposed to describe both the aerial hyphae as penetrating hyphae. The aerial hyphae were described as being composed of reproductive and vegetative hyphae. The penetrating hyphae have been described as being composed of pioneer and vegetative hyphae. This model was able to accurately describe both the aerial hyphae and the penetrating hyphae. The two models proposed in this work can be merged in a single model that would be able to describe most of the processes that occur during the microscopic growth of filamentous fungi on solid surfaces.

Keywords: Filamentous fungi. Mathematical modeling. Tanks in series. Penetrating hyphae. Aerial hyphae. Normal distribution.

Lista de figuras

FIGURA 2.1 TIPOS DE HIFA: (A) SEPTADA E (B) ASSEPTADA.	16
FIGURA 2.2 DESCRIÇÃO DE UMA PARTE DE UM MICÉLIO DE UM FUNGO SEPTADO.	16
FIGURA 2.3 O CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS SOBRE SUPERFÍCIES SÓLIDAS.	17
FIGURA 2.4 MECANISMOS DE CRESCIMENTO FÚNGICO A PARTIR DE UM ESPORO.	18
FIGURA 2.5 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO REPRESENTANDO UMA HIFA SEPTADA.	20
FIGURA 2.6 DIAGRAMA DOS DOIS TIPOS DE MODELO, (A) MODELO DISCRETO E (B) MODELO PSEUDO-HOMOGÊNEO.	25
FIGURA 2.7. DIAGRAMA DO SISTEMA MODELADO POR PROSSER e TRINCI 1979.	26
FIGURA 2.8 FORMAÇÃO DA RAMIFICAÇÃO INTERCALAR.	28
FIGURA 2.9. PADRÃO DE RAMIFICAÇÕES SIMULADO PELO MODELO DE PROSSER e TRINCI (1979).	29
FIGURA 2.10. PADRÃO DE RAMIFICAÇÃO EXPERIMENTAL OBTIDO POR TRINCI (1974).	30
FIGURA 2.11 DESENHO ESQUEMÁTICO DAS REGIÕES ONDE OCORREM TRANSFERÊNCIA DE MASSA E CINÉTICA DE CRESCIMENTO NO MODELO DE LÓPEZ-ISUNZA ET AL. (1997).	31
FIGURA 2.12. SIMULAÇÕES DO MODELO LÓPEZ-ISUNZA ET AL (1997) E OS RESULTADOS PARCIAIS DE LARRALDE-CORONA (1996)	33
FIGURA 2.13. DADOS EXPERIMENTAIS DE LARRALDE-CORONA (1996) .	34
FIGURA 2.14. DESENHO ESQUEMÁTICO DE UMA CÉLULA HEXAGONAL	37
FIGURA 2.15. DESCRIÇÃO DO MICÉLIO ATRAVÉS DE CÉLULAS HEXAGONAIS.	37
FIGURA 2.16 DIVISÃO DO SISTEMA NO MODELO DE CORADIN et al (2011).	39
FIGURA 2.17 EXEMPLO DE COMO A REDE DO MICÉLIO É ORIGINADA A PARTIR DE UM ESPORO	40
FIGURA 2.18 – AJUSTE DO MODELO AOS DADOS EXPERIMENTAIS DE NOPHARATANA ET AL. (2003) PARA O CRESCIMENTO DA BIOMASSA AÉREA DO FUNGO <i>Rhizopus oligosporus</i> SOBRE PDA.	40

FIGURA 2.19 DIVISÃO DA HIFA EM TANQUES CONTÍNUOS	41
FIGURA 2.20. SENTIDO DE EXPANSÃO DAS PONTAS	43
FIGURA 2.21. DIAGRAMA DO PROCESSO DE GERAÇÃO DE BIOMASSA ATRAVÉS DO DESLOCAMENTO DA PONTA EM 3 VOLUMES DE CONTROLE	44
FIGURA 2.22. DIAGRAMA DO PROCESSO DE RAMIFICAÇÃO E ANAMASTOSE EM 3 VOLUMES DE CONTROLE.....	45
FIGURA 2.23. DIAGRAMA DO SISTEMA PROPOSTO POR EDELSTEIN (1982).....	46
FIGURA 2.24. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO SUBSTRATO INTERNO DENTRO DA HIFA EM UMA SUPERFÍCIE DE CONTROLE COM ÁREA A. ..	49
FIGURA 2.25. “SHIFT” METABÓLICO PROPOSTO POR EDELSTEIN e SEGEL (1983) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO PARA A VELOCIDADE DE ALONGAMENTO DA HIFA E DO ESTADO METABÓLICO.	50
FIGURA 2.26 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO SISTEMA MODELADO POR NOPHARATANA, HOWES E MITCHELL (1998)	60
FIGURA 2.27 – PERFIS SIMULADOS E EXPERIMENTAIS DO CRESCIMENTO DE HIFAS AÉREAS.....	62
FIGURA 2.28 ORIGEM DOS MODELOS MATEMÁTICOS MICROSCÓPICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS CRESCENDO EM SUBSTRATO SÓLIDOS. 65	
FIGURA 4.1. SISTEMA MICROSCÓPICO DE CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS, INDICANDO OS TRÊS TIPOS DE HIFAS PRESENTES... 68	
FIGURA 4.3. DIAGRAMA DO SISTEMA.....	71
FIGURA 4.4. PERFIL DE ALONGAMENTO DA HIFA EM FUNÇÃO DO TEMPO	77
FIGURA 4.5 CONCENTRAÇÃO DE MALTOSE EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DA HIFA EM DIFERENTES TEMPOS SEGUNDO O MODELO MATEMÁTICO.....	78
FIGURA 4.6.- CONCENTRAÇÃO DE MALTOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO EM DIFERENTES TANQUES DE HIFA SEGUNDO O MODELO MATEMÁTICO. 79	
FIGURA 4.7. CONCENTRAÇÃO DE VESÍCULAS EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DA HIFA EM DIFERENTES TEMPOS SEGUNDO AS PREVISÕES DO MODELO.....	80
FIGURA 4.8. INFLUENCIA DE G_{RES} SOBRE O COMPRIMENTO DA HIFA ALCANÇADO EM 24 H DE SIMULAÇÃO (L_{24}).	82
FIGURA 4.9. INFLUENCIA DE v SOBRE O COMPRIMENTO DA HIFA ALCANÇADO EM 24 H DE SIMULAÇÃO (L_{24}).	83

FIGURA 5.1. AJUSTE DA DISTRIBUIÇÃO NORMAL DA BIOMASSA AÉREA COM 16 HORAS AOS RESULTADOS DE NOPHARATANA ET AL (2003). ...	91
FIGURA 5.2. AJUSTE DA DISTRIBUIÇÃO NORMAL DA BIOMASSA AÉREA COM 40 HORAS AOS RESULTADOS DE NOPHARATANA ET AL (2003). ...	92
FIGURA 5.3. GRÁFICO DE AJUSTE DA DISTRIBUIÇÃO NORMAL COM DUAS POPULAÇÕES DA HIFA AÉREA 40 HORAS DE CULTIVO.	94
FIGURA 5.4. GRÁFICO DE AJUSTE DA DISTRIBUIÇÃO NORMAL COM DUAS POPULAÇÕES DA HIFA PENETRANTES 16 HORAS DE CULTIVO. .	94
FIGURA 5.5 GRÁFICO DE AJUSTE DA DISTRIBUIÇÃO NORMAL COM DUAS POPULAÇÕES DA HIFA PENETRANTES 40 HORAS DE CULTIVO.	95
FIGURA 5.6. DESCRIÇÃO DO SISTEMA EM CAMADAS	96
FIGURA 5.7: FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS ADOTADOS NO MODELO DISCRETO PARA DESCREVER AS HIFAS AÉREAS.....	98
FIGURA 5.8. COMPARAÇÃO DA SIMULAÇÃO DO MODELO COM RESULTADOS EXPERIMENTAIS INTERPOLADOS DA HIFA AÉREA COM 16 HORAS DE CULTIVO.....	100
FIGURA 5.9. COMPARAÇÃO DA SIMULAÇÃO DO MODELO COM RESULTADOS EXPERIMENTAIS INTERPOLADOS DA HIFA AÉREA COM 40 HORAS DE CULTIVO.....	101
FIGURA 5.10. MICROGRAFIAS DE NOPHARATANA ET AL (2003) DAS HIFAS PENETRANTES CRESCENDO EM PDA COM 16 (A) E 64 HORAS (B) DE CULTIVO.....	103
FIGURA 5.18. COMPARAÇÃO DA SIMULAÇÃO DO MODELO COM RESULTADOS EXPERIMENTAIS INTERPOLADOS DA HIFA PENETRANTE COM 16 HORAS DE CULTIVO.....	105
FIGURA 5.19 COMPARAÇÃO DA SIMULAÇÃO DO MODELO COM RESULTADOS EXPERIMENTAIS INTERPOLADOS DA HIFA PENETRANTE COM 40 HORAS DE CULTIVO.....	106

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 CRESCIMENTO DE FUNGOS EM MATRIZES SÓLIDAS	14
2.1.1 Fenômenos envolvidos no crescimento de fungos em matrizes sólidas.....	15
2.1.2 Germinação	18
2.1.3 Alongamento da hifa	19
2.1.4 Ramificação	21
2.1.5 Diferenciação	22
2.1.6 Absorção e translocação de nutrientes.....	23
2.2 MODELOS MATEMÁTICOS PARA DESCRIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROSCÓPICO DE FUNGOS	24
2.2.1 Modelos Discretos	26
2.2.1.2. Modelo de LÓPEZ-ISUNZA et al. (1997)	30
2.2.1.3 Modelo de Boswell <i>et al.</i> (2007).....	36
2.2.1.4 O modelo de Coradin <i>et al.</i> (2011).....	38
2.2.1.5 CORADIN (2010).....	41
2.2.2 Modelos pseudo-homogêneos.....	42
2.2.2.1. Modelo de Edelstein (1982) e Edelstein e Segel (1983)	42
2.2.2.2 Modelo de Davidson et al. (1996)	51
2.2.2.3. Modelo de Davidson (1998).....	52
2.2.2.3 Modelo de Davidson e Olsson (2000).....	55
2.2.2.4 Modelo de Nopharatana et al (1998)	59
2.2.3 Resumo dos modelos	63
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	66
4 MODELO MATEMÁTICO FENOMENOLÓGICO	68
4.1 DESCRIÇÃO DOS FENÔMENOS PRESENTES NA HIFA REPRODUTIVA EM COMPARAÇÃO COM A HIFA VEGETATIVA.....	69
4.2 SIMPLIFICAÇÕES DO MODELO	69
4.3 MODELAGEM MATEMÁTICA DO SISTEMA	70
4.4 ESTIMAÇÃO DOS VALORES DOS PARÂMETROS DO MODELO.....	74
4.5 RESULTADOS.....	76
4.5.1 Calibração do modelo	76

4.5.2 Análise paramétrica	80
4.6 DISCUSSÃO	83
4.6.1 Modelo híbrido completo.....	84
4.6.2 Inovações do modelo.....	85
4.6.3 Extensão do modelo para descrever outros tipos de hifas	86
4.6.4 Limitações e possíveis melhoramentos do modelo para hifas reprodutivas	87
4.6.5 Delineamento dos experimentos necessários para a validação do modelo	88
4.7 CONCLUSÃO	89
5 MODELO DE DISTRIBUIÇÕES DE PROBABILIDADES.....	90
5.1 AJUSTES DAS DISTRIBUIÇÕES ESTATÍSTICAS	90
5.2 MODELO MATEMÁTICO PARA DESCRIÇÃO DO ALONGAMENTO E RAMIFICAÇÃO DA HIFA AÉREA.....	95
5.2.1 Resultados e discussão das simulações do modelo das hifas aéreas	99
5.3 MODELO MATEMÁTICO PARA HIFAS PENETRANTES	101
5.3.1 Resultados e discussão do modelo de hifas penetrantes	104
5.4 CONCLUSÕES GERAIS SOBRE OS MODELOS DE DISTRIBUIÇÃO DE PROBABILIDADES.....	106
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
Referências	108

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos muito versáteis, podendo colonizar vários ambientes que envolvem matrizes sólidas em contato com o ar, onde toda a água permanece adsorvida no sólido. Entre esses ambientes podem ser destacados o solo, matéria orgânica em decomposição, plantas e substratos sólidos umedecidos. O crescimento de fungos nesse tipo de sistema também é importante do ponto de vista biotecnológico, como por exemplo, na fermentação no estado sólido (FES).

O crescimento microscópico de fungos filamentosos em substratos sólidos envolve muitos fenômenos complexos que ocorrem simultaneamente. Dentre esses fenômenos pode ser destacado o alongamento e ramificação das hifas e o transporte de nutrientes da matriz sólida para dentro da hifa. Um modelo matemático que integrasse todos esses fenômenos seria uma ferramenta muito útil para compreender melhor quais são as variáveis que limitam o desenvolvimento dos fungos em substratos sólidos.

No caso do crescimento microscópico de fungos filamentosos sobre superfícies sólidas, seria interessante um modelo que fosse capaz de prever em diferentes condições (concentração de nutrientes, tipo de substrato, tipo de inoculação) como micélio do fungo se desenvolve no espaço, prevendo como o fungo distribui as hifas dentro e acima do sólido. Um modelo matemático desse tipo poderia ser utilizado para entender como funciona o comportamento do fungo em diversos tipos de ecossistemas onde o fungo se desenvolve sobre superfícies sólidas. Por exemplo, o modelo poderia prever a interação planta e fungo durante a simbiose ou num processo de infecção que ocorre no crescimento de fungos no solo. Poderia ser utilizado também na descrição de fenômenos que ocorrem em micro-escala em FES, como o entrelaçamento das hifas e a compactação do leito.

Os modelos matemáticos propostos na literatura descrevem apenas uma parte dos fenômenos envolvidos no crescimento microscópico de fungos sobre substratos sólidos. Além disso, muitos modelos descrevem esses fenômenos de uma maneira muito simplificada, ignorando fenômenos biológicos importantes que ocorrem dentro da hifa. Outra limitação dos

modelos propostos é que eles, na sua maioria, descrevem apenas um tipo de população de hifa. Mas os fungos se desenvolvendo em substratos sólidos possuem vários tipos de população de hifas, como as hifas vegetativas, penetrantes e reprodutivas.

Tendo em vista essas limitações dos modelos propostos na literatura, esta tese trata do desenvolvimento de dois modelos: um modelo que descreva os fenômenos importantes que ocorrem dentro da hifa e um modelo que descreva as regras de ramificação dos fungos. Esses dois modelos servirão de base para um modelo completo do crescimento microscópico de fungos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica é dividida em duas partes. A primeira parte descreve os fenômenos microscópicos que ocorrem no crescimento de fungos sobre matrizes sólidas. Visto que é necessário um conhecimento detalhado da fisiologia celular, que servirá de base para a modelagem matemática. A segunda parte apresenta uma análise crítica dos principais modelos matemáticos propostos na literatura para descrever o crescimento de fungos, ao nível microscópico, em matrizes sólidas.

2.1 CRESCIMENTO DE FUNGOS EM MATRIZES SÓLIDAS

Dois sistemas importantes envolvem o crescimento de fungos filamentosos em matrizes sólidas: interação com solo e plantas e o cultivo artificial sobre substratos sólidos.

No caso da interação com solo e plantas a colonização do solo por fungos tem importância ecológica e comercial. Do ponto de vista ecológico, os fungos que se desenvolvem no solo podem servir de alimento para outros seres vivos e também podem modificar a microbiota de um ecossistema, através da interação com plantas, modificando, por exemplo, a fertilidade do solo (GARRET, 1963). Os fungos que crescem sobre o solo também podem atuar como decompositores da matéria orgânica e, desta maneira, contribuir para uma das etapas do ciclo do carbono (WAINWRIGHT, 1988).

Nas plantas, os fungos podem atuar de maneira simbiótica ou patogênica. Nas raízes, eles podem auxiliar na captação de nutrientes, pela formação de micorrizas. Os fungos também podem produzir metabólitos secundários que podem afetar o desenvolvimento da planta, como, por exemplo, o ácido giberélico produzido pelo fungo *Gibberella fujikuroi*. (BERG, 2009).

Outra importante aplicação de fungos é na FES, onde o fungo coloniza substratos umedecidos, como grãos e resíduos agroindustriais, em contato

com o ar. Esta técnica de fermentação pode produzir vários tipos de produtos de interesse comercial, como: enzimas, corantes, ácidos orgânicos e hormônios vegetais. No entanto, esse tipo de fermentação ainda é pouco explorado comercialmente, com exceção do *koji* (molho de soja), do *tempe* e de algumas enzimas como pectinases e celulases, devido a problemas encontrados nos sistemas industriais, como a dificuldade de remoção de calor e problemas na aeração devido a compactação do leito e entrelaçamento das hifas (NIELSEN, 1996).

2.1.1 Fenômenos envolvidos no crescimento de fungos em matrizes sólidas

Os fungos filamentosos são formados por redes de hifas, que são estruturas cilíndricas com raio entre 1 e 10 μm (TINDEMANS; KERN; MULDER, 2006). As hifas podem ser septadas ou asseptadas, sendo que o septo é uma estrutura que separa regiões dentro da hifa (figura 2.1 e 2.2). O conjunto de hifas interligadas de um fungo forma uma estrutura conhecida como micélio. Durante o crescimento de fungos sobre substratos sólidos, as hifas possuem a capacidade de se alongar em três ambientes diferentes: na superfície do sólido, no ar acima do sólido e dentro do sólido, formando, respectivamente, o micélio de superfície, o micélio aéreo e o micélio penetrante (Fig. 2.3).

Resumidamente, o crescimento fúngico pode ser dividido em quatro estágios principais (NIELSEN, 1992): germinação do esporo, crescimento da hifa, ramificação e diferenciação celular (Figura 2.4)

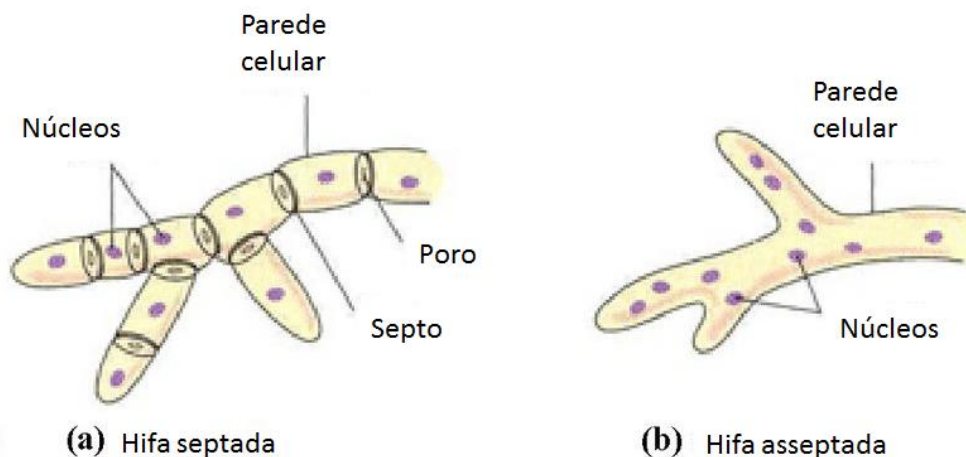


FIGURA 2.1 TIPOS DE HIFA: (A) SEPTADA E (B) ASSEPTADA.
 FONTE: O autor (2013)

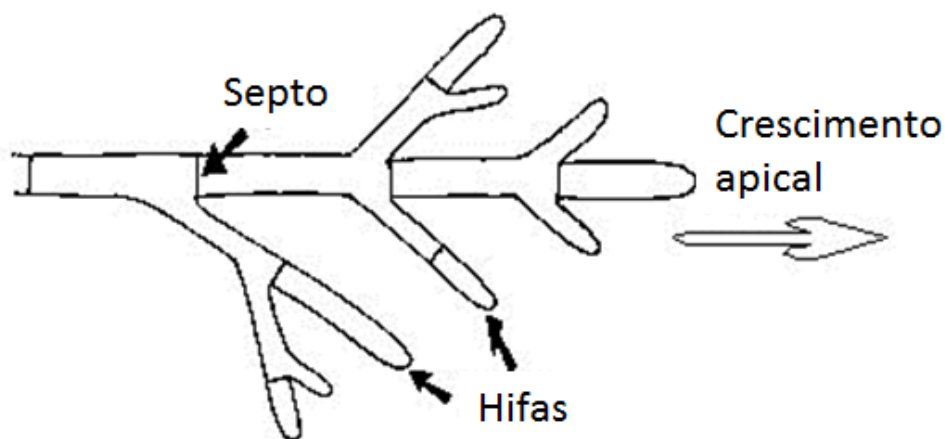


FIGURA 2.2 DESCRIÇÃO DE UMA PARTE DE UM MICÉLIO DE UM FUNGO SEPTADO.
 FONTE: O autor (2013)

O primeiro estágio de desenvolvimento é a germinação. Para que o crescimento tenha início, tipicamente é necessária a presença de esporos ou fragmentos de micélio sob a superfície sólida., onde se forma o tubo germinativo. No segundo estágio, são formadas as hifas que podem alongar nos três ambientes diferentes descritos acima. Além de alongar, as hifas ramificam, formando novas pontas.

As hifas possuem a capacidade de consumir nutrientes e secretar metabólitos e enzimas. Na grande maioria das hifas, os sítios de alongamento das hifas se localizam nas pontas (crescimento apical) onde o alongamento é auxiliado por uma estrutura denominada *Spitzenkörper* que é responsável por

direcionar as vesículas para a ponta (Figura 2.2). Os processos envolvidos na extensão das hifas aéreas (A) e penetrantes (B) são diferentes. No caso das hifas aéreas (A), as hifas devem translocar os nutrientes que são obtidos no meio sólido. Isto é, transportar os nutrientes obtidos do substrato sólido para outras regiões do micélio que não estão em contato com o meio sólido. Os nutrientes utilizados como fonte de carbono e energia podem ser monômeros ou dímeros, que podem ser obtidos a partir de hidrólise enzimática no meio extracelular se o substrato for um polímero. Essa etapa de translocação pode ser uma das etapas importantes na descrição do micélio aéreo. No caso das hifas penetrantes (B), o que limita a velocidade de extensão são as baixas concentrações de oxigênio no meio sólido, que chega por difusão até a matriz sólida.

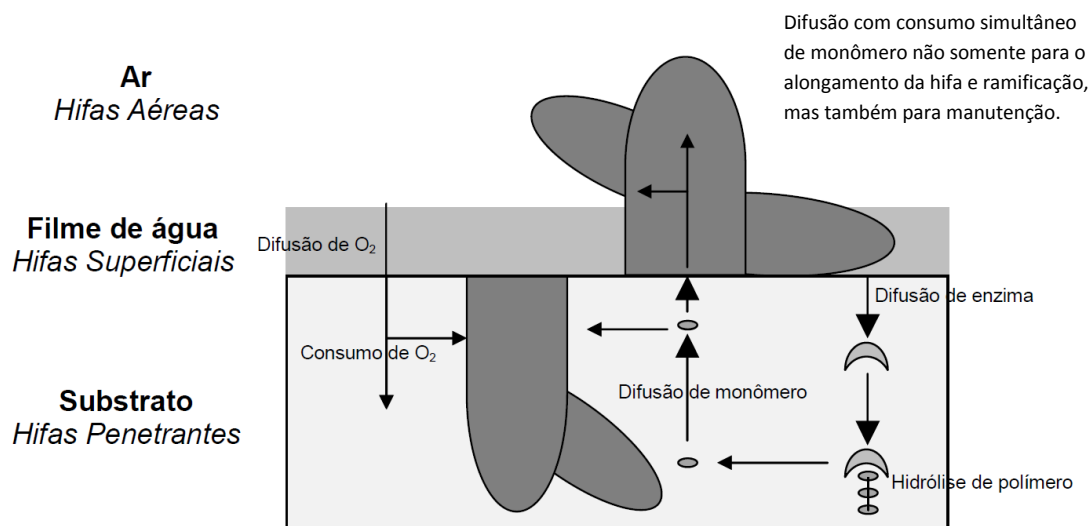


FIGURA 2.3 O CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS SOBRE SUPERFÍCIES SÓLIDAS

FONTE: CORADIN (2010).

Concomitantemente ou após a formação do micélio superficial, penetrante e aéreo, pode haver formação de hifas aéreas diferenciadas, conhecidas como hifas reprodutivas, as quais possuem a função de formar e espalhar os esporos.

Após essa descrição resumida desses quatro estágios de desenvolvimento do fungo, esses serão descritos em maiores detalhes nas

subseções que seguem devido a sua complexidade. Além disso, será descrito em detalhes os mecanismos de translocação de nutrientes em fungos.

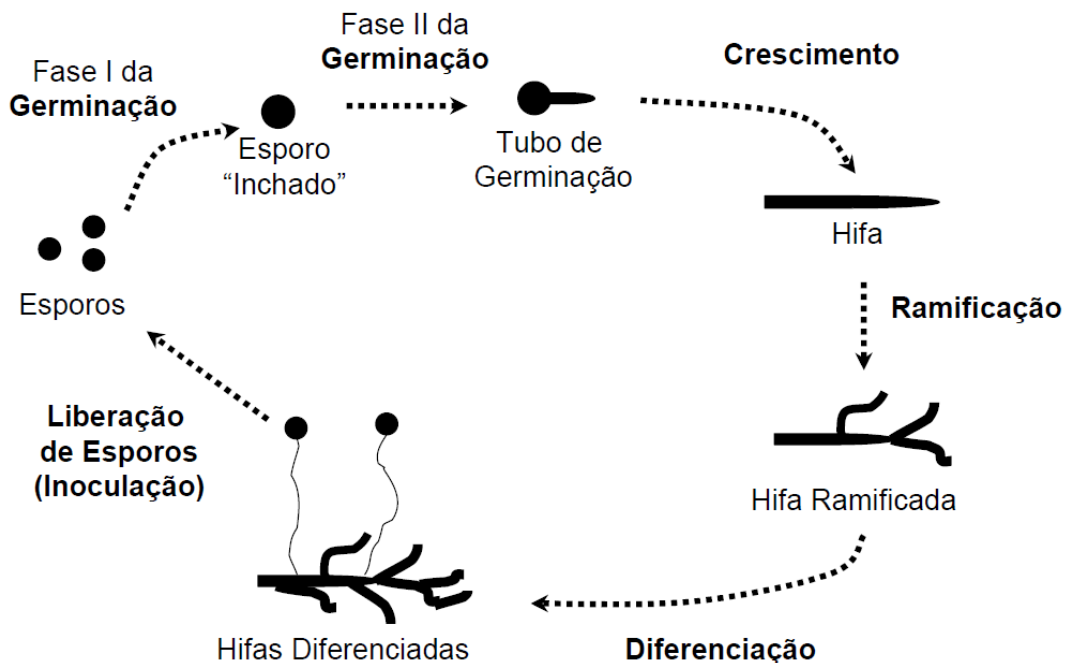


FIGURA 2.4 MECANISMOS DE CRESCIMENTO FÚNGICO A PARTIR DE UM ESPORO

O esporo germina e dá origem a um tubo de germinação, que pode se desenvolver em uma hifa. Após atingir certo tamanho, a hifa se ramifica e novas pontas são formadas. Quando o micélio é maduro, estruturas diferenciadas se desenvolvem para a liberação de esporos e reinício do ciclo vital (a figura não está em escala).

FONTE: NIELSEN (1992)

2.1.2 Germinação

O processo de germinação, que pode ser dividido em duas fases distintas (inchamento e formação do tubo de germinação), como mostra a figura 2.4. A germinação dos esporos depende da temperatura, pH, da atividade de água, e da concentração de CO_2 e O_2 (MEDWID; GRANT, 1984).

Na primeira fase ocorre o inchamento, onde os esporos absorvem água e reativam o seu metabolismo, sintetizando ácidos nucléicos e proteínas a

partir da reserva de nutrientes contida no esporo. Após a reativação do metabolismo, tem início a segunda fase da germinação que consiste na formação de um tubo de germinação que se estende na ponta. Durante essa fase, é necessária tanto uma fonte de carbono, quanto uma fonte externa de nitrogênio, visto que a primeira fase da germinação consome todas as reservas internas do esporo. O processo de germinação pode levar de 3 a 8 horas e termina quando surge a primeira ramificação no tubo germinativo (NIELSEN, 1996).

2.1.3 Alongamento da hifa

Como mencionado anteriormente, os sitios de alongamento se encontram nas pontas (crescimento apical). O crescimento apical das hifas vegetativas envolve a translocação dos nutrientes e dos materiais sintetizados nas regiões distais para a região apical, onde a hifa vai incorporar esse material na síntese de parede celular (figura 2.5).

A região próxima à ponta de uma hifa fúngica vegetativa pode ser dividida em três compartimentos principais: o compartimento apical, o compartimento subapical e a região atrás do compartimento subapical (TRINCI, 1971), conforme mostrado na Figura 2.5. Esse diagrama, embora seja para hifas septadas, também descreve a distribuição dos compartimentos para hifas asseptadas. O termo “compartimento apical” se refere à região entre a ponta e o primeiro septo com poro, para hifas septadas. Em hifas asseptadas, o compartimento apical se refere a uma região que tem uma parede mais fina, ausência de mitocôndrias e de núcleo e uma alta concentração de vesículas. A região que contém septos com poros em hifas septadas é o compartimento subapical. A troca de material entre o compartimento apical e o subapical ocorre porque os septos são perfurados. Como o material pode fluir entre essas duas regiões, elas contribuem para a extensão da ponta e, juntas, recebem o nome “zona de extensão apical” (TRINCI, 1971). Nas hifas asseptadas o comprimento do compartimento subapical é indefinido, uma vez

que não existe nenhum meio físico de barrar a troca de materiais entre as regiões.

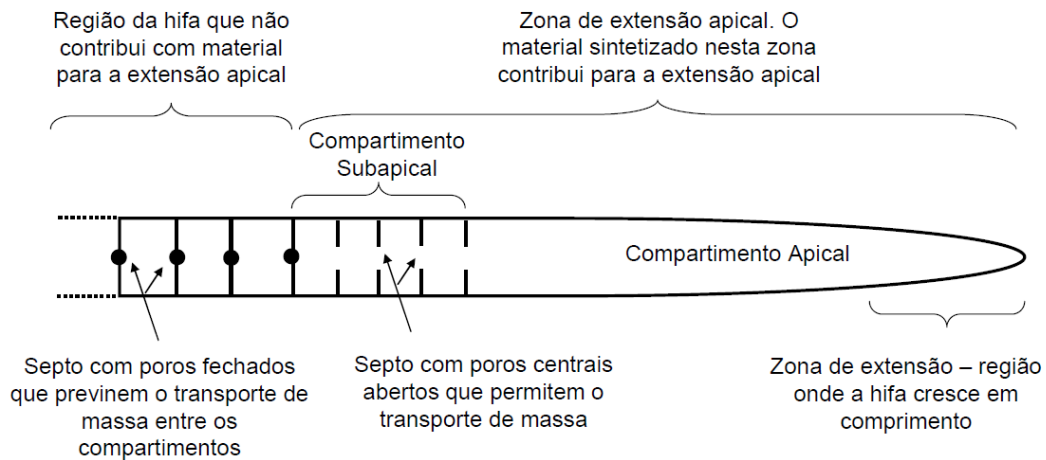


FIGURA 2.5 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO REPRESENTANDO UMA HIFA SEPTADA

O diagrama não está em escala.

FONTE: TRINCI (1971).

Na zona subapical, ocorre a síntese de vesículas que contêm enzimas e açúcares que são transportadas para a ponta, através de microfilamentos de actina (citoesqueleto) e com o auxílio de kinesinas. Na ponta, existe uma estrutura chamada *Spitzenkörper*. Essa estrutura, que fica de 2 a 5 μm da ponta, possui a função de direcionar as vesículas para a ponta. Na ponta, as vesículas se fundem à membrana celular e liberam as enzimas e açúcares que são utilizados para a síntese de parede celular. Isso faz com que ocorra o alongamento da parede celular e da hifa. A velocidade de alongamento da hifa, portanto, depende das velocidades de três processos. Primeiro, depende da velocidade de fornecimento de material oferecido para síntese de vesículas. Segundo, depende da velocidade de incorporação do material das vesículas na ponta, que depende do tamanho da zona de extensão e, portanto, do seu diâmetro e comprimento. Terceiro, depende da velocidade de transporte das vesículas para a ponta (PROSSER e TOUGH, 1991).

2.1.4 Ramificação

A ramificação é um processo onde se produzem novas hifas a partir de uma hifa. A ramificação possui dois objetivos: aumentar a área superficial da colônia, o que auxilia o encontro de nutrientes como açúcares e oxigênio e facilitar eventos de fusão de hifas, onde ocorrem trocas de nutrientes e sinais entre diferentes hifas da colônia. Contudo, pouco se sabe sobre as bases bioquímicas e os sinais que iniciam a ramificação em fungos (HARRIS, 2008).

A formação de ramificações aumenta a velocidade de produção de biomassa no micélio. As pontas tendem a se alongar com velocidade constante. Como o número de pontas aumenta com a ramificação, a velocidade de produção de biomassa seria essencialmente diretamente proporcional ao número de pontas. Nas primeiras horas de crescimento após a germinação, o aumento total de biomassa se mantém exponencial, justamente porque o número de ramificações aumenta exponencialmente. Isso ocorre pelo menos até o esgotamento dos nutrientes nos locais onde há uma concentração muito alta de hifas (PROSSER; TOUGH, 1991).

As ramificações podem ser de dois tipos de origem, subapical ou apical. A ramificação subapical, conhecida também por ramificação lateral, ocorre quando se acumula vesículas atrás dos septos parcialmente fechados (Figura 2.5). O processo de ramificação apical, conhecido também por ramificação dicotômica, ocorre quando as vesículas se acumulam na ponta, ou seja, quando a velocidade do fornecimento de vesículas está maior que a velocidade de incorporação na síntese de parede celular (NIELSEN, 1992). A presença da ramificação apical ocorre em diversos fungos, como, por exemplo, *Aspergillus niger* (REYNAGA-PEÑA; GIERZ; BARTNICKI-GARCIA, 1997) e *Neurospora crassa* (RIQUELME; BARTNICKI-GARCIA, 2004). Em relação à ramificação lateral, há poucos dados disponíveis na literatura (HARRIS, 2008).

2.1.5 Diferenciação

A diferenciação em fungos filamentosos envolve uma mudança regulada de um estado fisiológico-morfológico para outro. Na maioria dos fungos filamentosos, ocorrem dois tipos de diferenciação: mudanças fisiológicas em colônias maduras e produção de hifas reprodutivas, como será explicado a seguir.

Quando a hifa ramifica, ela dá origem a um novo segmento de hifa, chamada de hifa (filha), que se origina de um segmento de hifa preexistente chamada de hifa parental. Em colônias jovens, a hifa parental e a hifa filha possuem aproximadamente a mesma velocidade de extensão, comprimento da zona de extensão e diâmetro. Uma diferenciação a nível celular e fisiológico importante, que geralmente ocorre em colônias maduras, é a diferenciação da hifa parental com relação à hifa filha. Em culturas maduras, a hifa parental possui um diâmetro maior e se estende mais rapidamente do que a hifa filha. O ângulo de ramificação (ângulo entre a hifa parental e a hifa filha) se torna menor e a hifa parental e a hifa filha tendem a se direcionar para a margem da colônia, buscando novas fontes de nutrientes para colonizar (STEEL e TRINCI, 1975). Essa mudança no ângulo de ramificação, do diâmetro e do tropismo da hifa parental ocorre devido a metabólitos secundários que são secretados em colônias maduras (PROSSER e TOUGH, 1991).

Conforme a colônia se expande, outros processos de diferenciação ocorrem devido a mudanças no sistema, principalmente quando os nutrientes do meio vão se esgotando. Quando as condições no centro da colônia se tornam menos favoráveis para o crescimento (escassez de nutrientes ou pH ácido), ocorre a formação de hifas aéreas reprodutivas. Geralmente a fonte de carbono utilizada para a formação da hifa reprodutiva vem da degradação do glicogênio, na forma de maltose. O glicogênio e a maltose se encontram em um "foot-cell" que é uma estrutura que serve de base para a hifa reprodutiva, ao menos em *Streptomyces* (DYSON, 2011). Estas estruturas geralmente fazem com que os esporos sejam liberados de alturas maiores, o que permite que os esporos se espalhem melhor.

Enfim, uma colônia madura consiste de um anel externo de hifas vegetativas que se orientaram para a margem (buscando fontes novas de substrato) e de uma região central de hifas vegetativas maduras, com condições menos favoráveis, que se diferenciaram para produzir estruturas aéreas reprodutivas de esporulação (PROSSER; TOUGH, 1991).

2.1.6 Absorção e translocação de nutrientes

Os fungos filamentosos são muito versáteis devido a sua capacidade de colonizar substratos sólidos e poliméricos para obter fontes de energia e nutrientes. O que torna isso possível é a sua capacidade de secretar enzimas hidrolíticas para hidrolisar substratos poliméricos, liberando monômeros ou dímeros. Essas moléculas podem, então, ser absorvidas pelos fungos, através da parede e da membrana celular de hifas superficiais e penetrantes, que são as hifas que estão em contato com o meio sólido (JENNINGS, 1995).

Após a entrada na célula, os nutrientes são translocados para outras partes do micélio. Essa translocação pode ser feita de três formas, difusão pelo citosol, convecção do citoplasma e transporte vesicular (CAIRNEY, 2005). A difusão ocorre devido ao gradiente de concentração de nutrientes ao longo da hifa e transporte vesicular ocorre no citoesqueleto da hifa através do auxílio de kinesinas (BEREPIKI et al., 2011). Já no caso da convecção, a força motriz para o fluxo até a ponta depende do tipo da hifa. Para hifas em contato com o meio sólido, a força motriz provém do bombeamento de cálcio para dentro da ponta da hifa, que gera uma alta pressão osmótica na ponta e um fluxo de água para a ponta (GERVAIS et al., 1999). Para hifas aéreas, a força motriz provém da evaporação de água na ponta da hifa. (COWAN et al., 1972).

A literatura possui informações conflitantes sobre quais destes processos são mais relevantes na translocação de nutrientes. OLSSON e JENNINGS (1991) estabeleceram que a difusão era o fenômeno mais importante na translocação de nutrientes para três fungos diferentes. Contudo, DAVIDSON e OLSSON (2000) propuseram um modelo matemático para descrever os perfis experimentais, obtidos por PERSSON et al. (2000). Os

perfis experimentais PERSSON et al. (2000) foram obtidos em um experimento onde a fonte de nutrientes se localizava no centro da placa de Petri, que também era o local de inoculação. Além disso, foi incorporado no meio de cultura um marcador radioativo que podia ser detectado em função da distância de alongamento do fungo a partir do centro da placa de petri. Através das simulações do modelo de DAVIDSON e OLSSON (2000), foi constatado que a difusão não consegue explicar a velocidade de transporte do marcador radioativo observada no experimento, principalmente em distâncias superiores a 10 mm da fonte nutrientes. Os autores propuseram que a translocação de nutrientes em hifas próximas à fonte de nutrientes é feita através da difusão, enquanto a convecção é o fenômeno predominante na translocação em hifas distantes da fonte de nutrientes.

2.2 MODELOS MATEMÁTICOS PARA DESCRIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROSCÓPICO DE FUNGOS

Os modelos que descrevem o crescimento microscópico de fungos podem ser classificados como “discretos” ou “pseudo-homogêneos” (Figura 2.6).

Os modelos discretos (Figura 2.6 (A)) possuem a capacidade de descrever as posições dos segmentos de hifa modelados, o que possibilita gerar simulações com uma imagem da estrutura microscópica do micélio com posição e morfologia das hifas. Esse tipo de modelo é bastante útil quando se deseja obter um perfil 2-D ou 3-D do micélio, mostrando, por exemplo, os pontos de ramificação.

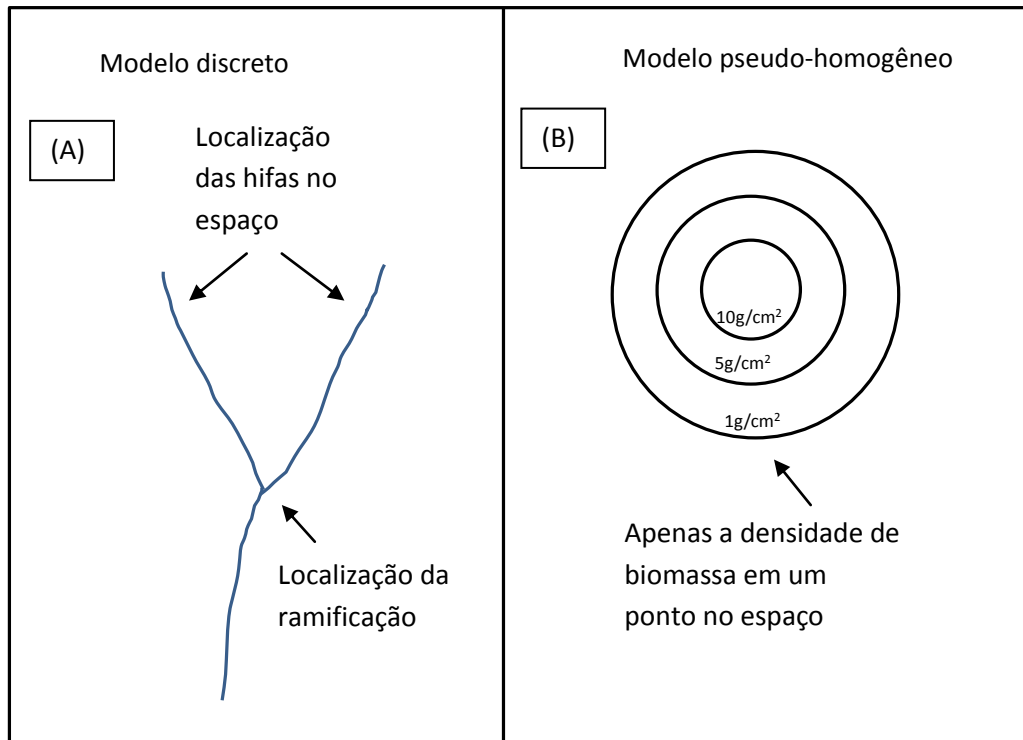


FIGURA 2.6 DIAGRAMA DOS DOIS TIPOS DE MODELO, (A) MODELO DISCRETO E (B) MODELO PSEUDO-HOMOGÊNEO

FONTE: O autor

Os modelos pseudo-homogêneos (Figura 2.6 (B)) tratam o sistema como se as variáveis que o compõe fossem contínuas e homogêneas e que em um determinado ponto do sistema é possível obter um valor médio para cada variável. Essa técnica descreve as variáveis que compõe o micélio (como concentração de pontas e biomassa) como se fossem solutos que se movem em solução. Isso implica, por exemplo, que as pontas em determinado lugar no espaço são representadas como se fossem um soluto misturado no ar sobre o sólido, e não é possível distinguir o local onde está o ar e as pontas. Esse tipo de abordagem simplifica enormemente o sistema, tornando a modelagem do crescimento microscópico um problema semelhante ao de difusão de solutos no espaço, que é tratado com equações diferenciais parciais (EDPs) de difusão-convecção-reação. Nesse caso, geralmente o que interessa são apenas as propriedades macroscópicas do sistema. Logo, nesse tipo de modelo não é possível obter a localização dos pontos de ramificação e a posição das hifas.

O objetivo desta parte da revisão é analisar esses tipos de modelos individualmente, mostrar suas qualidades e limitações. As seções serão divididas entre modelos discretos e pseudo-homogêneos.

2.2.1 Modelos Discretos

2.2.1.1 O Modelo de PROSSER e TRINCI (1979)

No modelo de Prosser e Trinci (1979), o sistema modelado é discretizado em segmentos de hifa de comprimento fixo L_h (10 μm para o *Geotrichum candidum* e 40 μm para o *Aspergillus nidulans*), que podem ou não possuírem septos entre eles (figura 2.7). Além disso, a produção de vesículas é constante em todos os segmentos de hifa, exceto na ponta, e as vesículas são transportadas para a ponta por convecção. O alongamento das hifas é resultado da fusão das vesículas na ponta da hifa. O alongamento da hifa depende da concentração de vesículas na ponta, como mostra a equação 2.2.

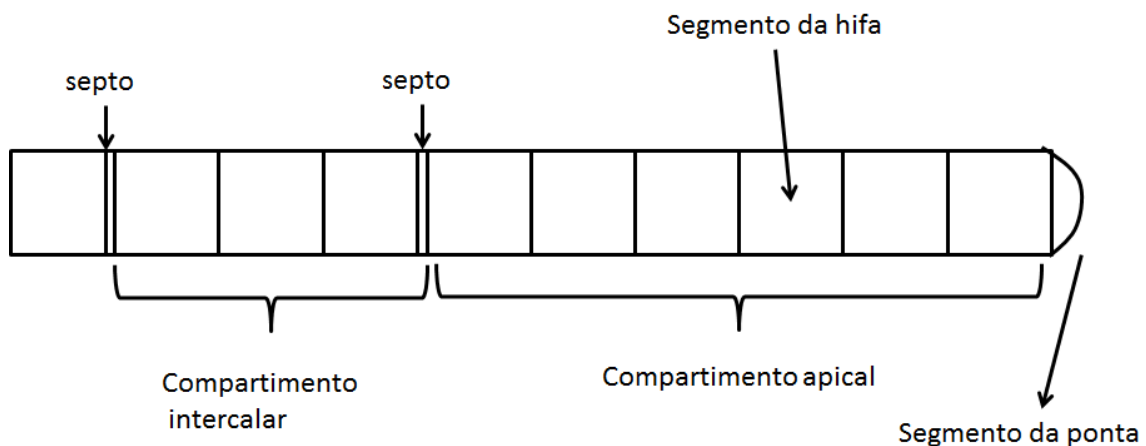


FIGURA 2.7. DIAGRAMA DO SISTEMA MODELADO POR PROSSER e TRINCI 1979.

FONTE: PROSSER e TRINCI (1979)

A ponta é tratada, no início da simulação, como tendo comprimento infinitesimal e não produzindo vesículas, mas apenas recebendo as vesículas que são produzidas nos segmentos distais. Conforme as vesículas são

absorvidas pela ponta, esta vai se alongando continuamente, até atingir um comprimento L_h onde então é adicionado um novo segmento de hifa de tamanho fixo L_h e surge uma nova ponta com comprimento infinitesimal. A absorção de vesículas é descrita através da equação de Michaelis-Menten:

$$R_v = \frac{R_a \cdot \delta t \cdot V_0}{V_0 + K_v} \quad (2.1)$$

onde R_v é a quantidade de vesículas absorvidas na ponta no intervalo de tempo δt , R_a é a velocidade máxima de absorção de vesículas, V_0 é a concentração de vesículas na ponta, K_v é a constante de saturação e δt é o intervalo de tempo onde ocorre a absorção.

O alongamento da hifa no intervalo de tempo δt é dado por

$$E_l = (V_{0(t-\delta t)} - V_{0(\delta t)}) \cdot R_l \quad (2.2)$$

onde E_l é o comprimento que a ponta alongou no intervalo de tempo δt , $V_{0(t-\delta t)}$ é a concentração de vesículas antes da absorção, $V_{0(\delta t)}$ é a concentração de vesículas depois da absorção (calculado pela equação 2.1) e R_l é um coeficiente de rendimento (comprimento alongado por uma vesícula).

A variação de vesículas na ponta em um intervalo de tempo δt é dada por:

$$(V_{0(\delta t)} - V_{0(t-\delta t)}) = \frac{R_a \cdot \delta t \cdot V_{0(t-\delta t)}}{V_{0(t-\delta t)} + K_v} + V_{1(t-\delta t)} \quad (2.3)$$

onde $V_{1(t-\delta t)}$ é a concentração de vesículas no segmento de hifa logo atrás da ponta. O segundo termo da equação se refere ao consumo de vesículas na ponta e o terceiro se refere ao transporte de vesículas para a ponta através do tanque logo atrás da ponta.

A equação 2.2 tem um problema na sua formulação: a variação na concentração de vesículas na ponta em um intervalo de tempo δt não pode ser considerada como sendo responsável pelo alongamento da hifa, porque essa variação pode ocorrer por dois processos, consumo de vesículas (diretamente ligado ao alongamento) e o transporte de vesículas para a ponta.

O modelo descreve também a septação da hifa. Esse fenômeno ocorre quando há duplicação de núcleos dentro de um segmento apical. O processo

de duplicação ocorre quando o compartimento apical atinge um volume citoplasmático crítico, então os núcleos se duplicam. Então é formado o septo no meio do segmento apical, sendo que metade dos núcleos vão para um lado e metade vão para o outro lado do septo.

Outro processo descrito pelo modelo é a ramificação intercalar, que ocorre quando se atinge uma quantidade crítica de vesículas (1000 para o *Geotrichum candidum* e 400 para *Aspergillus nidulans*) atrás do septo em compartimentos intercalares, como mostra a figura 2.8. As vesículas se acumulam atrás dos septos porque estes limitam ou impedem (se o septo estiver totalmente fechado) o fluxo de vesículas para o compartimento apical. Isso implica na formação de uma ramificação atrás de cada septo fechado.

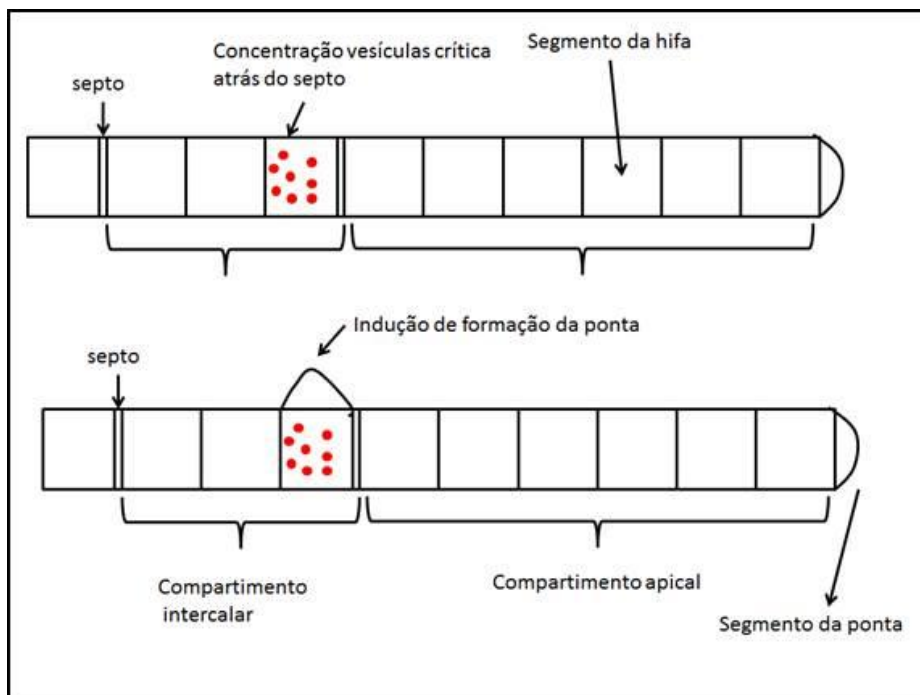


FIGURA 2.8 FORMAÇÃO DA RAMIFICAÇÃO INTERCALAR.

FONTE: O autor

Este modelo foi o primeiro a descrever o papel das vesículas no crescimento de fungos, mas possui limitações na descrição dos fenômenos que estão envolvidos no alongamento da hifa. A primeira grande limitação é que este modelo pode ser utilizado apenas para tentar descrever a fase inicial de crescimento, onde não existe limitação no fornecimento de substrato, uma vez que em um sistema com limitação de substrato a produção de vesículas não

seria constante. A segunda limitação é que as ramificações descritas pelo modelo ocorrem de tal maneira que o espaço de separação entre uma ramificação e outra é sempre o mesmo, como mostra a figura 2.9. Nos resultados de TRINCI (1974) as ramificações apresentam um padrão muito mais randômico que o simulado pelo modelo, como mostra a figura 2.10. A terceira limitação é que o modelo proposto não utiliza equações diferenciais na sua formulação, mas equações de diferença. Isso diminui a eficácia e a acurácia do método numérico utilizado.

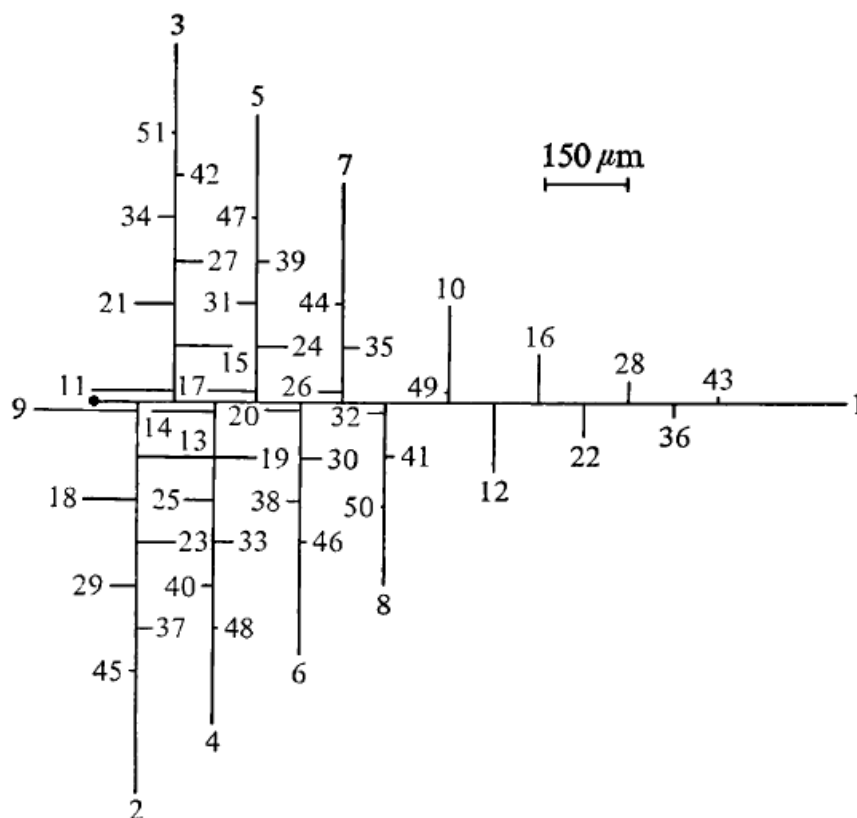


FIGURA 2.9. PADRÃO DE RAMIFICAÇÕES SIMULADO PELO MODELO DE PROSSER e TRINCI (1979)

FONTE: PROSSER e TRINCI (1979)

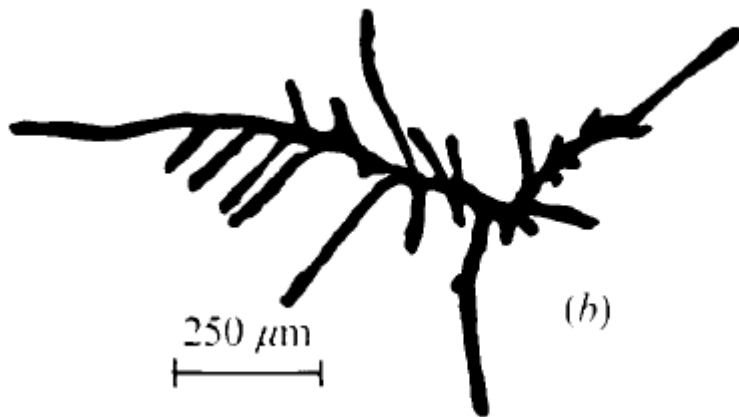


FIGURA 2.10. PADRÃO DE RAMIFICAÇÃO EXPERIMENTAL OBTIDO POR TRINCI (1974).

FONTE: TRINCI (1974)

2.2.1.2. Modelo de LÓPEZ-ISUNZA et al. (1997)

O modelo de López-Isunza et al. (1997) descreve o crescimento do tubo de germinação que se estende de um esporo até a formação da primeira ramificação (figura 2.11). Dessa forma, este modelo descreve o crescimento de uma única hifa tubular, no formato de um cilindro. O meio sólido é a fonte de nutrientes e possui uma concentração de um substrato genérico (S_m). Esse substrato é transportado por uma proteína carreadora (A) (localizada em toda lateral da hifa) para dentro da hifa onde ele é convertido em macro-vesículas (P) e micro-vesículas (Q), sendo que as micro-vesículas só são produzidas na ponta da hifa. Por fim, quando as micro-vesículas e as macro-vesículas se fundem na ponta, ocorre o aumento $Lh(t)$ (comprimento total da hifa). As equações do modelo são deduzidas a partir de equações de balanço de difusão-convecção-reação para os componentes do sistema. Todas as reações que ocorrem no sistema seguem a cinética de Michaelis-Menten. O modelo é totalmente adimensionalizado.

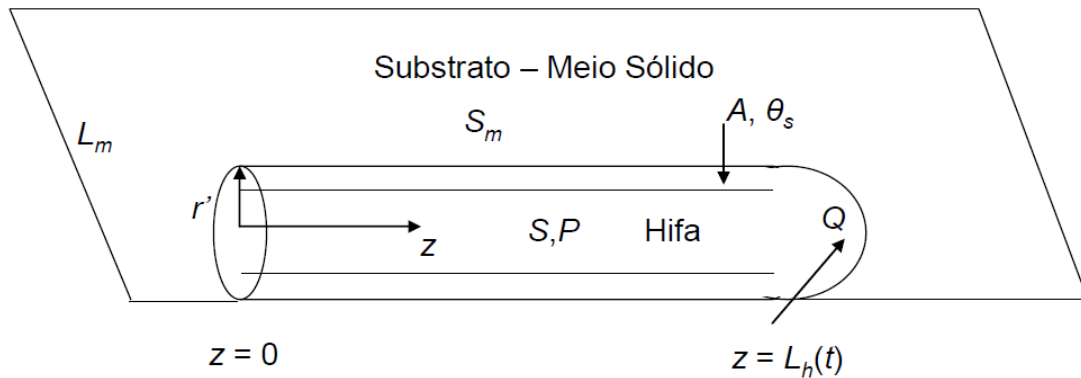


FIGURA 2.11 DESENHO ESQUEMÁTICO DAS REGIÕES ONDE OCORREM TRANSFERÊNCIA DE MASSA E CINÉTICA DE CRESCIMENTO NO MODELO DE LÓPEZ-ISUNZA ET AL. (1997)

Os símbolos são: S_m , substrato no meio sólido; (A, θ_s) carreador e complexo carreador-substrato na membrana; (S,P) substrato e precursor de parede dentro da hifa; (Q) espécie absorvida na ponta para produzir nova parede; L_m comprimento do meio onde ocorre difusão – tipicamente equivalente ao raio de uma placa de Petri e $L_h(t)$ comprimento da hifa, como função do tempo.

FONTE: LÓPEZ-ISUNZA et al. (1997)

Embora este modelo seja o mais completo na descrição da produção e consumo de vesículas a partir de um substrato genérico, ele possui cinco limitações nas suas formulações: (i) a forma como foram escolhidas as constantes para a adimensionalização não é a mais correta, (ii) curvas simuladas do comprimento da hifa em função do tempo não descrevem bem os dados experimentais de Larralde-Corona (1996), (iii) erro de uma adimensionalização de um termo, (iv) equação que descreve o alongamento da hifa apresenta dois problemas e (v) não possui coeficientes de rendimento para os processos de consumo de substratos e produção de vesículas.

A primeira limitação do modelo está na forma como foram escolhidas as constantes para adimensionalização. Por exemplo, o número adimensional de Damköhler (D_{ap}) foi definido como:

$$D_{ap} = \frac{\pi \cdot k_p \cdot D_h^2 \cdot L_c^3}{4 \cdot D_{effp}} \quad (2.4)$$

onde k_p é a constante de Michaelis-Menten para produção de P, D_h é o diâmetro da hifa, L_c é o comprimento que a hifa atinge com 14 h de

crescimento e a D_{eff} é a difusividade efetiva das macrovesículas. Para calcular o valor de D_{ap} , são necessários os valores de D_h e L_c , que só podem ser obtidos experimentalmente. Os dados obtidos experimentalmente estão na tabela 2.1. Isso implica que qualquer condição nova simulada por esse modelo exigirá a determinação experimental de D_h e L_c . Portanto, o modelo somente pode ser usado para descrever resultados já obtidos, não prevê-los.

TABELA 2.1- VALORES DE L_c E D_h DETERMINADOS EXPERIMENTALMENTE

FONTE: LÓPEZ-ISUNZA et al. (1997)

Glucose (g/L)	D_h (μm)	L_c (μm)
10	6,32	461,4
40	5,44	311,5
70	4,95	276,9
120	4,85	157,0
300	3,37	51,9

A segunda limitação é que as curvas simuladas do comprimento da hifa em função do tempo se apresentam exponenciais até 10 horas e depois ficam praticamente lineares, conforme mostra a figura 2.12. Isso não descreve bem os dados experimentais de Larralde-Corona (1996), utilizados para validação do modelo, que mostram perfis sigmóides, como mostra a figura 2.13. De fato, o modelo não é capaz de descrever qualquer desaceleração que ocorre no final da curva.

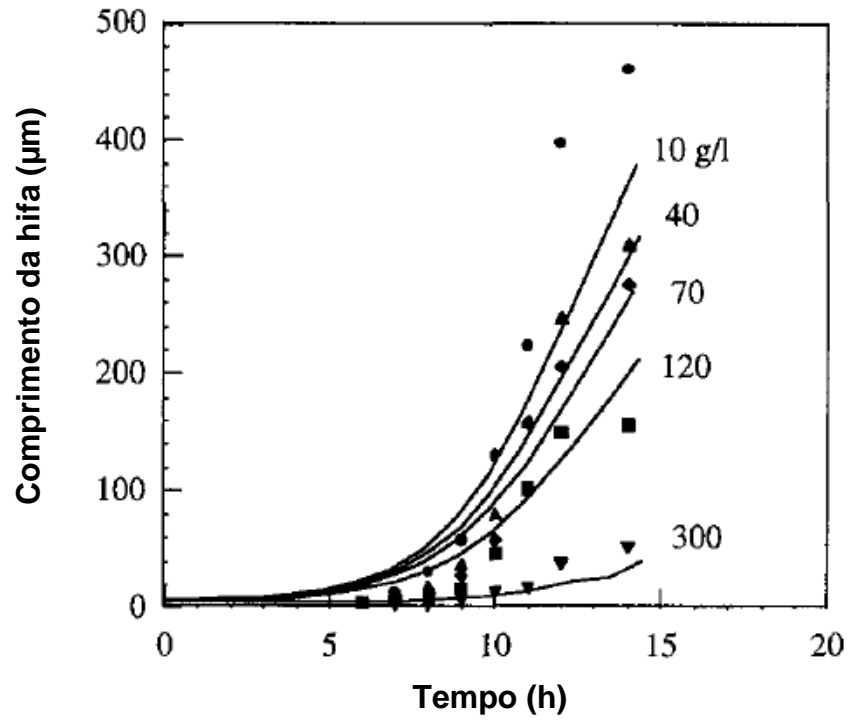


FIGURA 2.12. SIMULAÇÕES DO MODELO LÓPEZ-ISUNZA ET AL (1997) E OS RESULTADOS PARCIAIS DE LARRALDE-CORONA (1996)

Símbolos são os resultados experimentais e as linhas são as simulações em diferentes concentrações de glicose.

FONTE: LÓPEZ-ISUNZA et al. (1997)

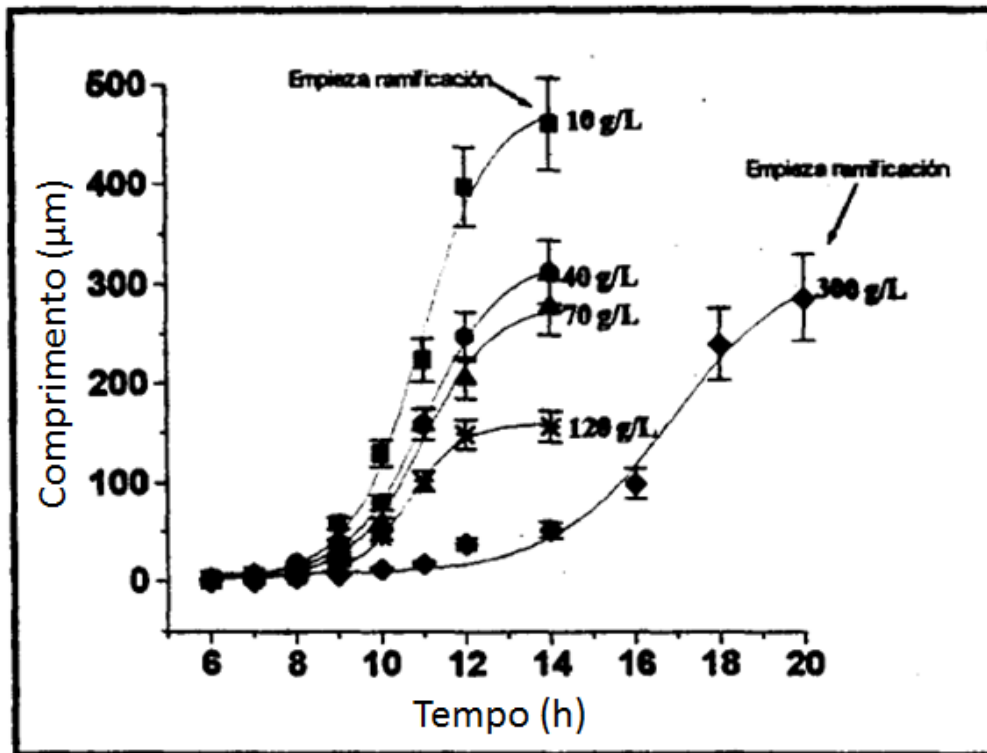


FIGURA 2.13. DADOS EXPERIMENTAIS DE LARRALDE-CORONA (1996)

As curvas são interpolações polinomiais, de LARRALDE-CORONA (1996).

FONTE: LARRALDE-CORONA (1996)

A terceira limitação do modelo é o erro de uma adimensionalização. A concentração de microvesículas Q (g/L) foi adimensionalizada na seguinte forma:

$$q = \frac{Q}{\rho_h \cdot L_h(t)} \quad (2.5)$$

onde q é a concentração de microvesículas adimensional, ρ_h é a densidade de biomassa (g/L) e $L_h(t)$ (μm) é o comprimento total da hifa no tempo t . Ao invés de ser adimensional, q possui a unidade de μm^{-1} , como mostra a análise abaixo:

$$\text{unidades de } q = \frac{(\text{g/L})}{(\text{g/L}) \cdot \mu\text{m}} = \frac{1}{\mu\text{m}} = \mu\text{m}^{-1} \quad (2.6)$$

Essa adimensionalização errada faz com que o modelo tenha unidades erradas durante a sua simulação.

A quarta limitação do modelo se refere a equação que descreve o alongamento da hifa, mostrada abaixo:

$$\frac{d\lambda}{dt} = D_{aw} \cdot \left(\frac{q \cdot p}{K_p + p} \right) \cdot \lambda \quad (2.7)$$

onde λ é o comprimento adimensionalizado da hifa no tempo t ($Lh(t)/Lc$), D_{aw} é o número de Damköhler para produção de parede celular, q é a concentração adimensionalizada de microvesículas na ponta da hifa, p é a concentração adimensionalizada de macrovesículas na ponta da hifa e K_p é constante de saturação de Michelis-Menten adimensionalizada. O primeiro problema aqui é com relação ao termo da direita ser multiplicado pelo comprimento total da hifa: implicitamente os autores estão assumindo que todo o comprimento contribui para o alongamento da hifa. Porém, o alongamento da hifa depende unicamente das concentrações de vesículas encontradas na ponta e não na hifa como um todo. Uma das hipóteses dos autores é que o alongamento depende das concentrações de p e q encontradas na ponta, tanto que as concentrações adimensionais q e p na equação 2.7 se referem às concentrações na ponta da hifa. Como todo comprimento contribui para o alongamento da hifa isso tem como consequência que se as concentrações de q e p se mantiverem constantes, a velocidade de alongamento da hifa será praticamente exponencial. Porém, isso é incoerente com dados experimentais obtidos por Larralde-Corona (1996) que não sustentam uma expansão exponencial do tubo germinativo, mas uma desaceleração a partir de 11 horas de cultivo.

O segundo problema com equação 2.7 é que ela é de 1° ordem com relação a q . Dessa forma a velocidade de alongamento pode aumentar indefinidamente, porque a concentração de q é diretamente proporcional a velocidade sem nenhuma limitação. Porém, em sistemas biológicos, a velocidade dos processos tende a ser limitada, atingindo uma velocidade máxima.

O modelo também não possui coeficientes de rendimento para os processos de consumo de substratos e de produção de vesículas. Assume-se, implicitamente, que a produção de biomassa ocorre sem nenhuma perda de substrato, ou seja, todos os coeficientes de rendimento são iguais a 1. Isso implica afirmar, por exemplo, que durante a produção de vesículas, todo o substrato se converte em vesículas, mas isto não é possível porque parte do

substrato deve ser convertido em ATP para que possam ocorrer reações de biossíntese.

Como já foi explicado, esse modelo é mais completo já proposto para descrição dos mecanismos internos de alongamento da hifa, porém o modelo é bastante limitado.

2.2.1.3 Modelo de Boswell *et al.* (2007)

O modelo de Boswell *et al.* (2007) representa o espaço ocupado pelas hifas como sendo formado por compartimentos hexagonais. A hifa é representada dentro desse hexágono como sendo uma linha vermelha, ou seja, a única dimensão que tem é a dimensão de comprimento. A ponta da hifa, contida no centro do hexágono tem a probabilidade de alongar em uma das cinco direções pontilhadas mostradas na figura 2.14. A ramificação da hifa no sistema pode ocorrer em qualquer parte do micélio. Cada hexágono forma um compartimento que pode se conectar a outros compartimentos através das faces do hexágono

Além disso, o modelo possui um balanço de massa para o substrato interno e para o substrato externo. O substrato externo pode ser transportado para dentro das células hexagonais por transporte ativo. O substrato externo pode também difundir dentro do meio sólido. O substrato interno pode ser transportado entre células hexagonais ocupadas por biomassa que estão conectadas por um dos lados por dois mecanismos: convecção e difusão. O substrato interno é consumido para o alongamento da hifa e para novas ramificações. O modelo apresenta duas equações de probabilidade, uma para o alongamento e uma para a ramificação. A quantidade de substrato interno é utilizada como parâmetro de entrada nessas equações de probabilidade. O alongamento e a ramificação vão ocorrer com mais frequência em células hexagonais com maior concentração de substrato interno. Quando uma ponta da hifa avança e encontra uma célula já ocupada por biomassa, ocorre o fenômeno da anastomose, onde a ponta da hifa é fundida na biomassa.

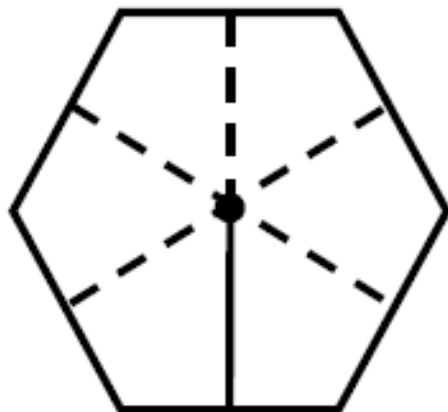


FIGURA 2.14. DESENHO ESQUEMÁTICO DE UMA CÉLULA HEXAGONAL

A ponta da hifa se encontra no centro e pode alongar em uma das cinco direções representadas pelas linhas pontilhadas

FONTE: BOSWELL *et al.* (2007)

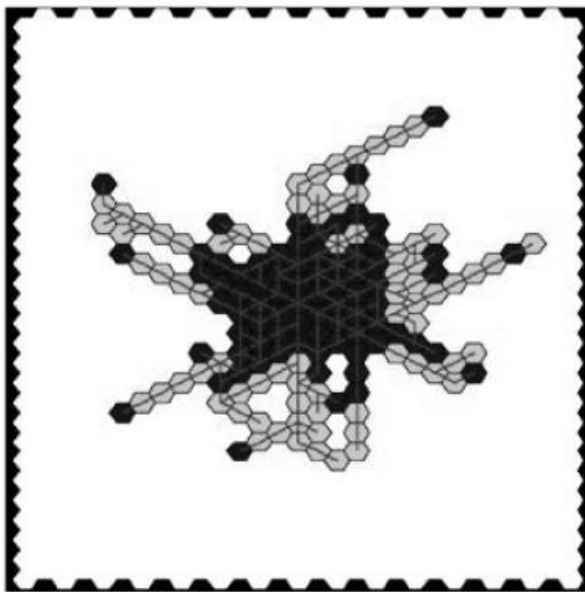


FIGURA 2.15. DESCRIÇÃO DO MICÉLIO ATRAVÉS DE CÉLULAS HEXAGONAIS

Quanto maior a intensidade escura, maior a concentração de substrato intracelular.

FONTE: BOSWELL *et al.* (2007)

A figura 2.15 apresenta uma simulação do micélio através dessa técnica. O modelo embora gere uma imagem bidimensional do micélio, essas imagens simuladas não foram comparadas com imagens reais de fungos crescendo sobre superfícies sólidas. Além disso, a hifa e os compartimentos

hexagonais não possuem um volume, isso implica que a hifa não é descrita de maneira correta, pois a hifa real possui um volume. Isso implica também que o substrato interno está contido dentro de um compartimento que não possui volume. Embora o modelo possa ser resolvido, do ponto de vista físico tanto a hifa quanto o substrato interno precisam estar contidos em um espaço tridimensional. Apesar das limitações, este é o primeiro modelo discreto que fez um balanço de massa para o substrato dentro da hifa e que não descreveu apenas uma única hifa, mas o micélio como um todo.

2.2.1.4 O modelo de Coradin *et al.* (2011)

No modelo de Coradin *et al.* (2011), o espaço foi dividido em um arranjo de cubos com 10 μm de aresta, onde as hifas, que são representadas por trechos de cubos adjacentes, podem alongar e ramificar, segundo regras de probabilidade para a escolha da direção tomada e regras de proibição de movimentos (figura 2.16). A velocidade de alongamento da hifa é considerada como sendo constante e não dependente de substrato para ocorrer. As ramificações e o alongamento da hifa no modelo podem ocorrer em três dimensões, como mostra a figura 2.17. O modelo possui três regras de proibição de movimentos pelas hifas:

1. Caso as pontas dos segmentos de hifas escapem do limite virtual do sistema, os segmentos param de alongar.
2. As pontas não podem entrar em células já ocupadas por biomassa.
3. Duas pontas não podem ocupar uma célula vazia no mesmo momento, se duas pontas tentam fazer isso elas param de alongar.

As simulações do modelo foram comparadas com os resultados experimentais obtidos por Nopharatana *et al.* (2003) com o fungo *Rhizopus oligoporus* cultivado em meio PDA. A partir disso foi possível obter curvas para diferentes tempos de cultivo com a densidade de biomassa em função da altura acima do ágar. O modelo obteve um desempenho razoável na descrição dos

dados experimentais, como mostra a figura 2.18. Porém, alguns pontos da simulação não se ajustaram adequadamente (setas da figura 2.18).

Contudo, o modelo possui quatro limitações. Não descreve o comportamento das hifas penetrantes e superficiais. Não incorpora o efeito dos nutrientes sobre a velocidade de alongamento da hifa e sobre a ramificação, o que limita a aplicação do modelo. No início da simulação, a probabilidade da hifa crescer para cima é muito grande (praticamente 100%), contudo isso não é observado experimentalmente, geralmente as hifas têm a tendência de colonizar a superfície do substrato sólido antes de expandir verticalmente. O ultimo problema do modelo de Coradin et al (2011) é que as regras de probabilidade foram escolhidas de maneira arbitrária.

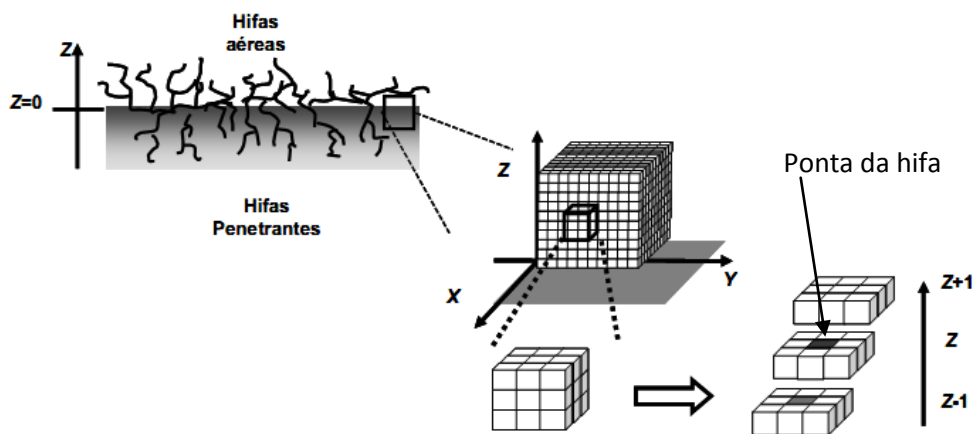


FIGURA 2.16 DIVISÃO DO SISTEMA NO MODELO DE CORADIN et al (2011).

O sistema foi dividido em cubos de $10\ \mu\text{m}$ de aresta sendo que o número máximo de cubos no sistema foi de 1000 ($10 \times 10 \times 10$ cubos), o cubo preto escuro representa a ponta da hifa que tem a probabilidade de alongar em uma das 3 direções: Z-1, Z, e Z+1.

FONTE: CORADIN et al. (2011)

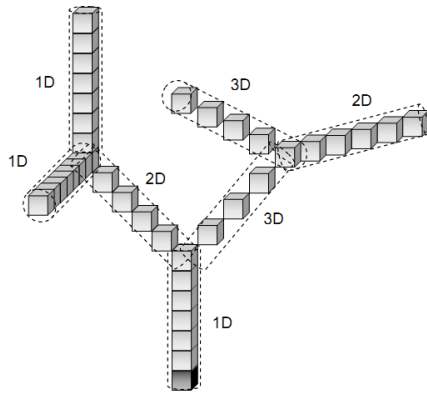


FIGURA 2.17 EXEMPLO DE COMO A REDE DO MICÉLIO É ORIGINADA A PARTIR DE UM ESPORO

O cubo cinza escuro embaixo é o esporo e a rede do micélio é representada em um espaço tridimensional por cubos interconectados. Os cilindros pontilhados mostram como as junções entre vários pontos de ramificação representam segmentos de hifas. As legendas 1D, 2D e 3D indicam as diferentes orientações dos segmentos.

FONTE: CORADIN et al. (2011)

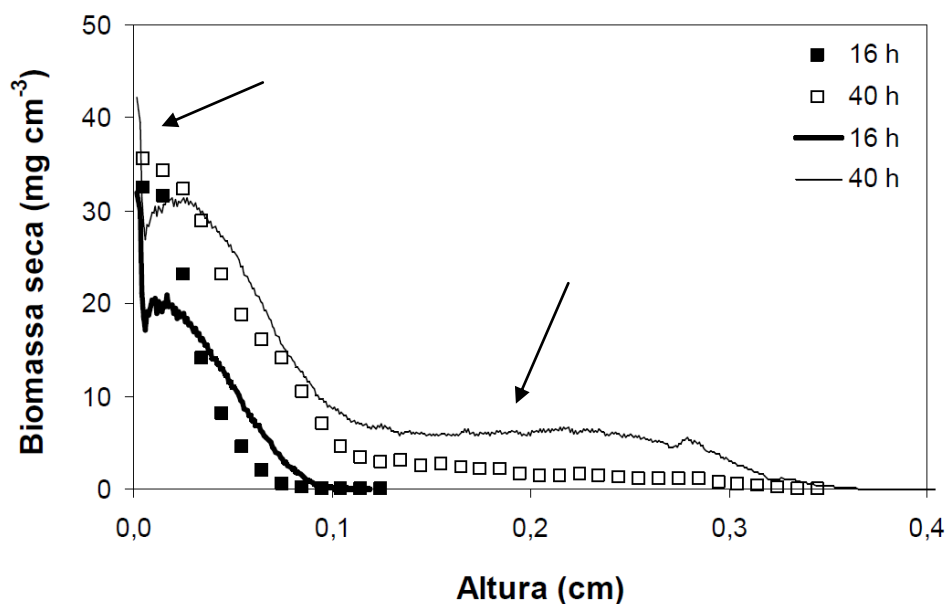


FIGURA 2.18 – AJUSTE DO MODELO AOS DADOS EXPERIMENTAIS DE NOPHARATANA ET AL. (2003) PARA O CRESCIMENTO DA BIOMASSA AÉREA DO FUNGO *Rhizopus oligosporus* SOBRE PDA.

As linhas contínuas são as simulações do modelo e os pontos são os resultados experimentais. As setas indicam os locais onde o modelo não conseguiu um bom ajuste.

FONTE: CORADIN et al. (2011)

2.2.1.5 CORADIN (2010)

Recentemente, Coradin (2010) propôs um modelo, utilizando a técnica denominada de “tanques contínuos em série” (figura 2.19). Nesta técnica, uma hifa aérea é representada como um conjunto tanques adjacentes bem misturados. A fonte de nutrientes se localiza na base da hifa e fornece glucose para o crescimento do fungo, sendo considerada o único nutriente que limita a velocidade de crescimento. É assumido que a hifa possui densidade (biomassa seca por volume ocupado) constante e que a extensão ocorre apenas na ponta da hifa e sem a ocorrência de ramificações. O mecanismo de transporte de glucose é assumido como sendo feito através da convecção e da difusão. O modelo não foi validado experimentalmente, mas foi calibrado para descrever a altura máxima atingida pela hifa com 40 horas de cultivo segundo os resultados experimentais obtidos por Nopharatana *et al.* (2003).

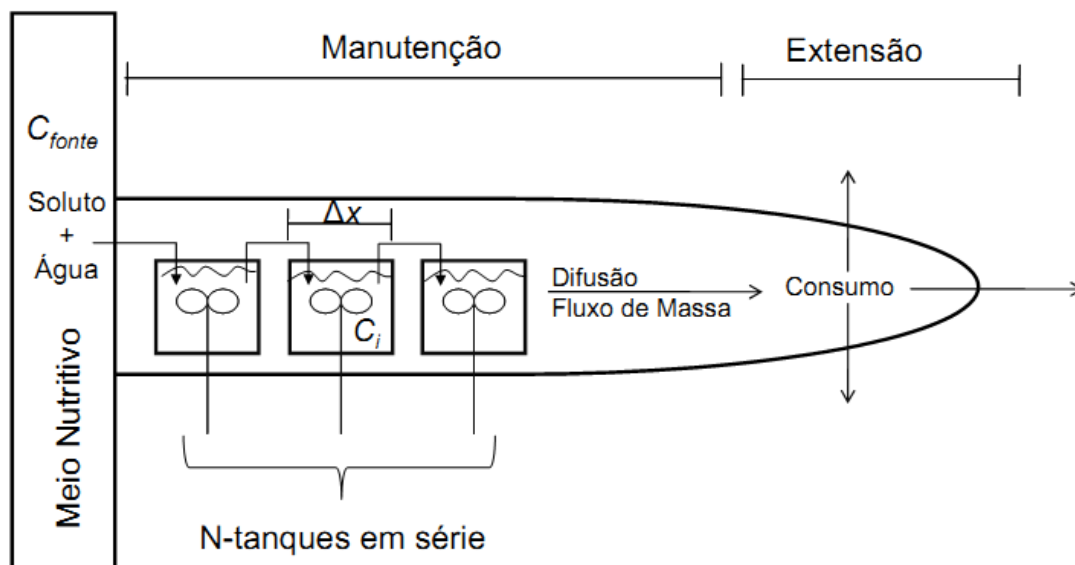


FIGURA 2.19 DIVISÃO DA HIFA EM TANQUES CONTÍNUOS

FONTE: CORADIN (2010)

O modelo proposto apresenta algumas limitações. A primeira limitação é que as simulações do modelo atingiram valores para a concentração de glucose que são incompatíveis com sistemas biológicos, variando na faixa de 100 g/L até 400 g/L em algumas simulações. Valores tão altos acarretariam

problemas na solubilidade da glucose e na pressão osmótica do sistema. A segunda limitação é com relação à ausência da descrição da produção de vesículas e, como foi mostrado na seção 2.1.3, as vesículas são importantes no alongamento da hifa. A terceira limitação se refere à forma como o modelo descreve o comportamento da ponta. O modelo assume que existe uma “biomassa de reserva” que é produzida na ponta sem ocupar nenhum volume no espaço. Quando a biomassa de reserva atinge um valor crítico, um novo tanque é adicionado na ponta e a biomassa de reserva volta a ter o valor de zero. No sistema real, fungos não alongam por saltos, mas de maneira contínua, principalmente quando se quer utilizar o modelo para descrever processos que ocorrem em escala de tempo pequenas.

2.2.2 Modelos pseudo-homogêneos

2.2.2.1. Modelo de Edelstein (1982) e Edelstein e Segel (1983)

Foram propostos dois modelos por Edelstein *et al.* (1982, 1983) para descrever o crescimento de colônias de fungos filamentosos sobre superfícies sólidas. A diferença entre os dois modelos é que no primeiro modelo (EDELSTEIN, 1982) não é incorporada a descrição da influência do substrato sobre o alongamento da hifa no sistema. O único tipo de hifa descrita por esses modelos é a hifa superficial.

O primeiro modelo (EDELSTEIN, 1982) pressupõe que o sistema é pseudo-homogêneo e unidimensional, pois se assume que a colônia possui simetria radial, ou seja, que tem propriedades iguais em distâncias iguais do centro da colônia. O modelo assume também que toda a geração de biomassa se baseia no movimento convectivo das pontas e, dessa forma, é criada uma variável chamada de densidade das pontas (n). As pontas se movem, unidirecionalmente, no sentido da margem da colônia, com velocidade constante (figura 2.20). Esse movimento convectivo das pontas tem duas consequências: altera a densidade das pontas e gera biomassa no sistema,

como mostra a figura 2.21. Além disso, novas pontas são geradas através de ramificações, que podem ser apicais ou sub-apicais (equação 2.8), e pontas podem desaparecer através do processo de anastomose (fusão de uma ponta no micélio) e de desativação de pontas (figura 2.22(a) e 2.22(b)).

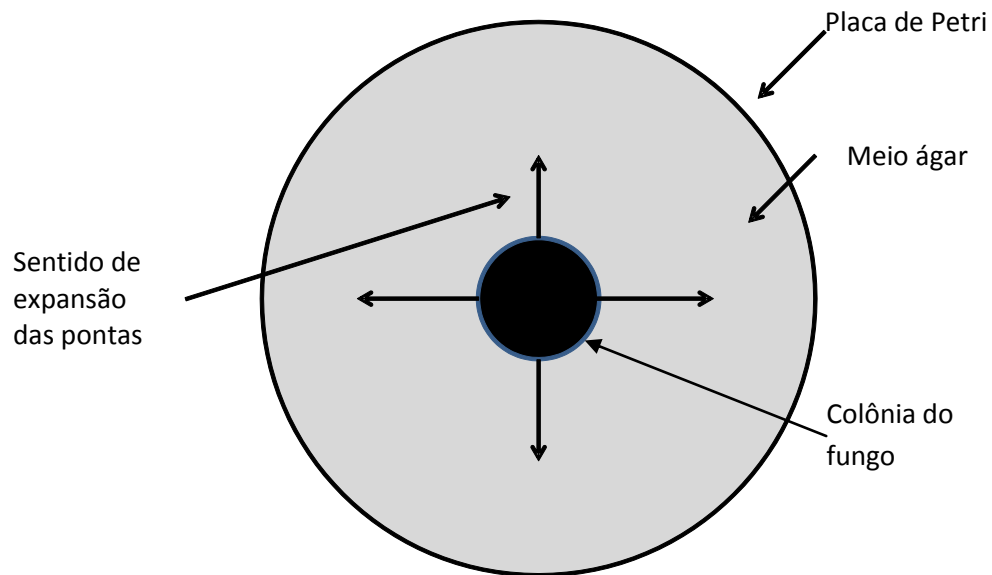


FIGURA 2.20. SENTIDO DE EXPANSÃO DAS PONTAS

O modelo possui uma expansão radial unidimensional

FONTE: O autor

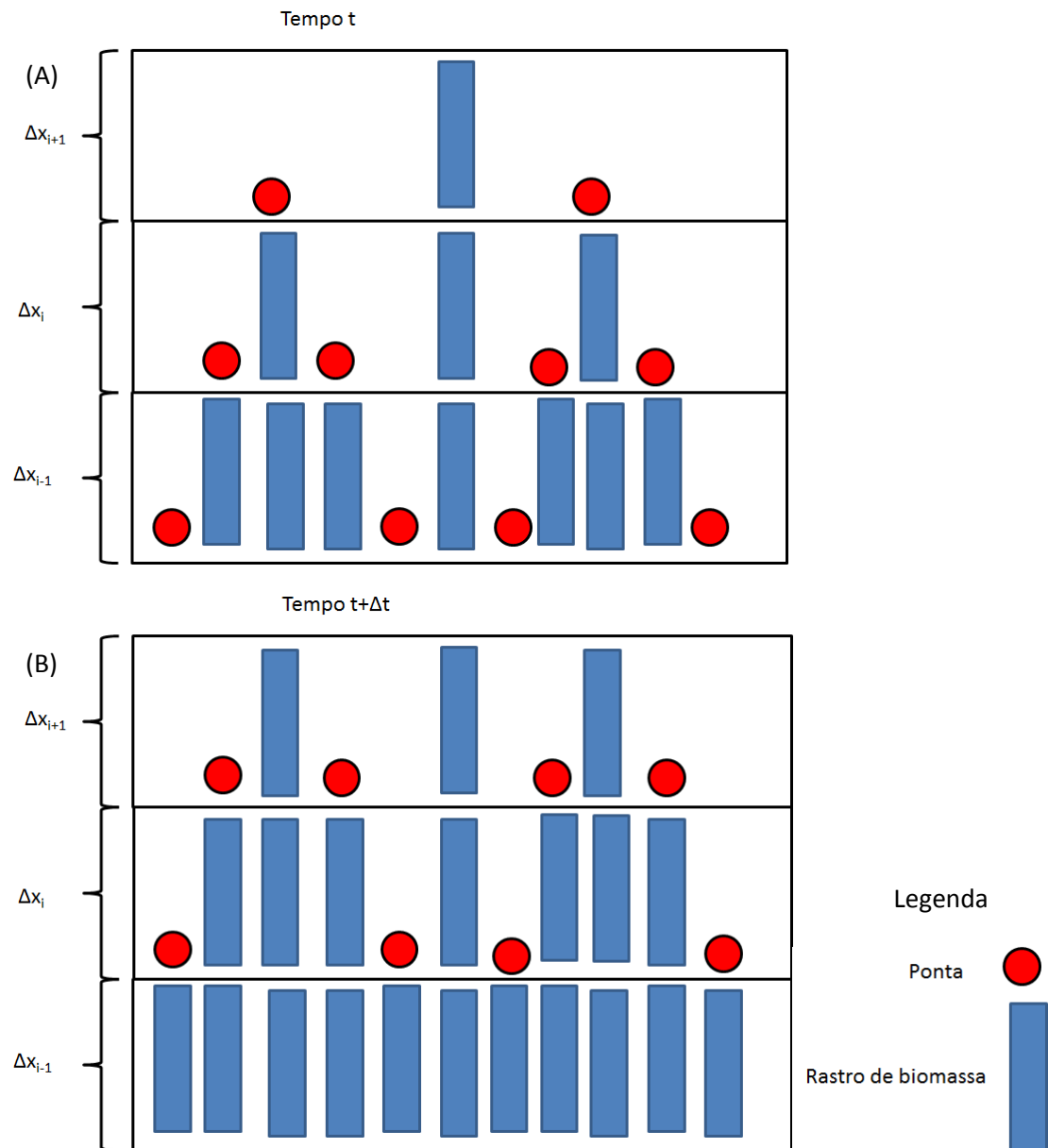


FIGURA 2.21. DIAGRAMA DO PROCESSO DE GERAÇÃO DE BIOMASSA ATRAVÉS DO DESLOCAMENTO DA PONTA EM 3 VOLUMES DE CONTROLE

(A) sistema no tempo t, (B) sistema no tempo t+Δt. O Diagrama é apenas ilustrativo, o modelo não é discreto.

FONTE: O autor

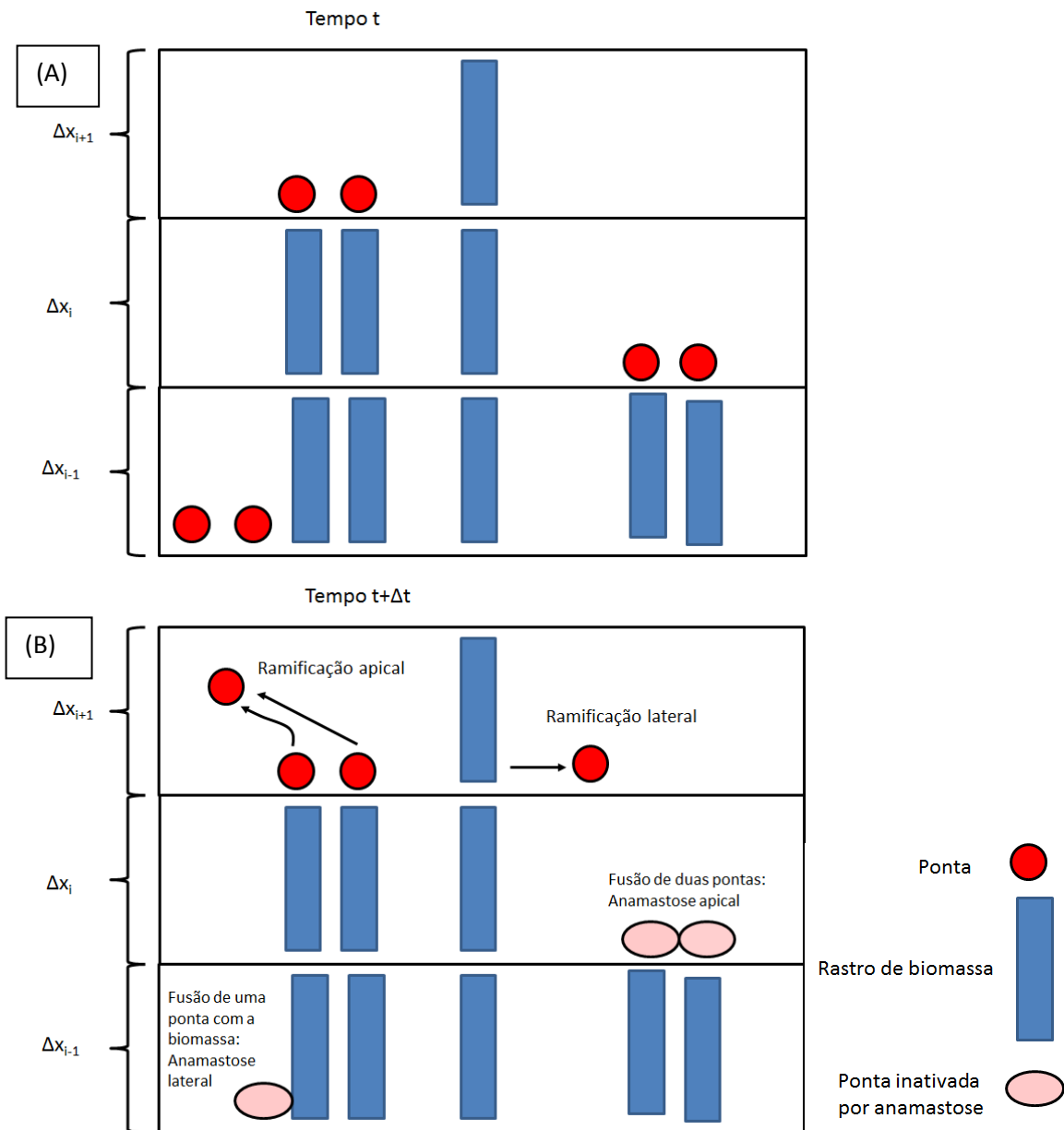


FIGURA 2.22. DIAGRAMA DO PROCESSO DE RAMIFICAÇÃO E ANAMASTOSE EM 3 VOLUMES DE CONTROLE

(A) sistema no tempo t, (B) sistema no tempo t+ δt . O Diagrama é apenas ilustrativo, o modelo não é discreto.

Fonte: O autor

Dessa forma, o sistema pode ser descrito através de duas variáveis: (a) a densidade de pontas e (b) a densidade de biomassa. Na figura 2.23, é mostrado um diagrama esquemático de como é feito o balanço de massa em uma superfície de controle do sistema.

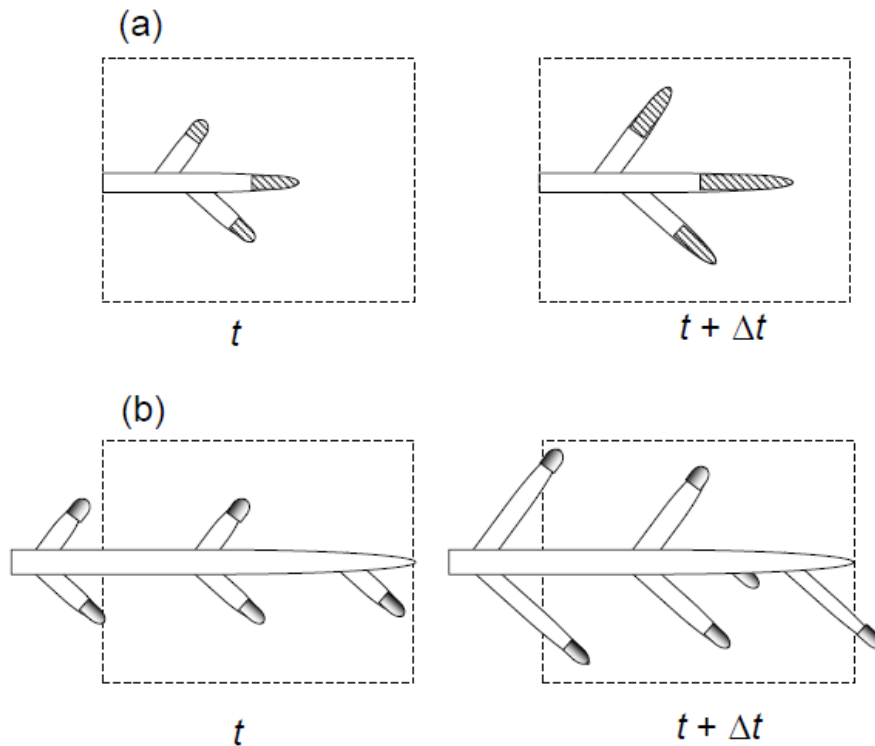


FIGURA 2.23. DIAGRAMA DO SISTEMA PROPOSTO POR EDELSTEIN (1982).

(a) Balanço de biomassa: como as hifas se estendem somente nas pontas, a velocidade de acumulação de novos filamentos de biomassa depende do número de pontas e da velocidade em que eles alongam. (b) Balanço de pontas: as pontas (no detalhe escuro), devido ao alongamento, são móveis. Então, no balanço, devem ser levadas em consideração as pontas que entram e saem da superfície de controle, bem como a criação de novas pontas, caso haja ramificação. Diagrama é apenas ilustrativo, o modelo não é discreto.

Fonte: EDELSTEIN (1982)

A partir desse balanço de massa, se obtém duas equações diferenciais parciais. A primeira equação descreve a variação temporal da densidade de biomassa (comprimento de hifa por área de colônia):

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = n \cdot v - \gamma_1 \cdot \rho \quad (2.8)$$

onde ρ é a densidade de biomassa, t é o tempo, n é o número de pontas, v é a velocidade de alongamento das pontas e γ_1 é uma constante relacionada à degradação da biomassa. Nesta equação, o termo na esquerda descreve o acúmulo de biomassa, o primeiro termo na direita descreve o processo de produção de biomassa através do alongamento das pontas (produção do rastro

de biomassa) e segundo termo na direita é relacionado à degradação da biomassa.

A segunda equação descreve a variação temporal do número de pontas:

$$\frac{\partial n}{\partial t} = -\frac{\partial n.v}{\partial x} + \sigma \quad (2.8)$$

onde x é a coordenada radial da colônia e σ é uma função que descreve o processo de ramificação, anastomose e desativação das pontas. Nesta equação, o termo da esquerda descreve o acúmulo das pontas, o segundo descreve o fluxo convectivo das pontas.

Como não foi incorporado o efeito do substrato sobre a velocidade de crescimento, esse modelo só pode ser aplicado para descrever sistemas onde não há limitação de substrato. Apesar de não descrever o efeito do substrato, este modelo foi o primeiro a descrever uma população de hifas através do uso de EDPs de reação-difusão. O conceito de que o sistema de crescimento de fungos pode ser tratado como sendo pseudo-homogêneo foi utilizado por vários autores posteriores (Nopharatana *et al.*, 1998; Boswell *et al.*, 2002; Davidson 2000). Porém, essa forma de tratar o sistema tem a limitação de não descrever a morfologia do micélio na escala de hifas individuais e, portanto, não pode descrever fenômenos importantes como o entrelaçamento de hifas.

No segundo modelo (Edelstein, 1983), foi incorporado o balanço de massa para o substrato. O substrato é considerado presente em dois compartimentos, externo e interno, tendo uma concentração externa (C_{ex}) no meio sólido e uma com concentração intracelular (C_{in}). O substrato externo é transportado para dentro das hifas, através de uma cinética de Michaelis-Menten:

$$A(c_{ex}) = \frac{K_{max} \cdot c_{ex}}{K_n + c_{ex}} \quad (2.9)$$

onde $A(c_{ex})$ é a velocidade de absorção de substrato por comprimento de biomassa, K_{max} é a velocidade máxima de absorção de substrato externo pela hifa e K_n é a constante de saturação.

Outro fenômeno que é incorporado no modelo foi a descrição do processo de difusão externa de substrato. Dessa forma, é possível obter o seguinte balanço de massa em relação ao substrato externo:

$$\frac{\partial C_{ex}}{\partial t} = D_c \frac{\partial^2 C_{ex}}{\partial x^2} - \frac{\rho}{L} \frac{K_{max} C_{ex}}{(K_n + C_{ex})} \quad (2.10)$$

onde D_c é o coeficiente de difusão, ρ é a densidade de biomassa e L é a espessura do meio. O termo da esquerda se refere à variação da concentração do substrato externo em relação ao tempo, o segundo termo é relativo à difusão do substrato externo e o terceiro termo é relativo ao transporte de substrato externo para dentro da hifa.

Com relação ao substrato interno, os autores tratam o sistema como se o substrato interno estivesse associado a biomassa. A figura 2.24 mostra que o substrato interno não pode ficar livre no meio, mas deve estar associado a quantidade de biomassa presente no local. Assume-se, como hipótese, que todas as hifas possuem o mesmo diâmetro, sendo possível calcular a concentração de substrato por área em uma superfície de controle:

$$C_{intotal} = \rho \cdot a_{in} \cdot C_{in} \cdot A \quad (2.11)$$

onde ρ é a densidade de biomassa (expresso como o comprimento de hifa por área total da superfície de controle), a_{in} é a área de secção de uma hifa, C_{in} é a concentração citoplasmática de substrato e A é a área total da superfície de controle.

○ Substrato interno

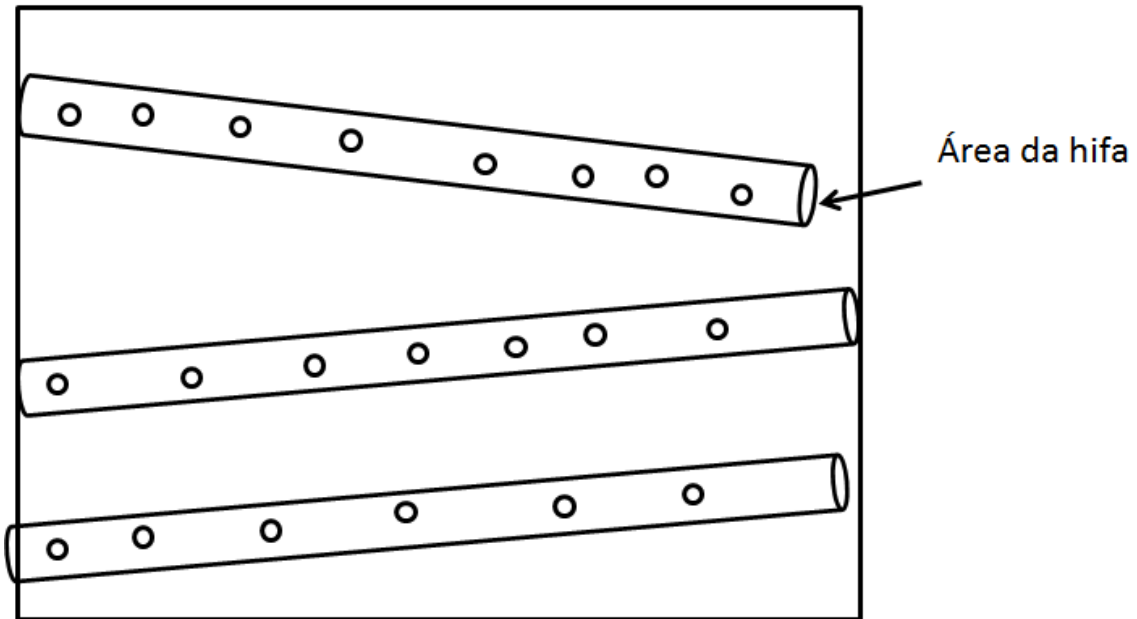


FIGURA 2.24. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO SUBSTRATO INTERNO DENTRO DA HIFA EM UMA SUPERFÍCIE DE CONTROLE COM ÁREA A.

FONTE: EDELSTEIN e SEGEL (1983)

A partir disso, é possível obter a equação de balanço para a concentração de substrato interno:

$$\frac{\partial C_{in} \rho a}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x} \left(-Da\rho \frac{\partial C_{in}}{\partial x} + a\rho C_{in} w \right) + \rho \frac{K_{max} C_{ex}}{(K_n + C_{ex})} - \rho a M - a n v Y \quad (2.12)$$

onde D é o coeficiente de difusão do substrato interno dentro da hifa, w é a velocidade de convecção do substrato dentro da hifa (no sentido da margem da colônia), M é o coeficiente de manutenção e Y é o coeficiente de rendimento de substrato consumido por pontas geradas. O primeiro termo da equação está relacionado ao acúmulo de substrato interno na superfície de controle, os dois termos em parênteses se referem à difusão e convecção, respectivamente, o terceiro termo descreve o transporte de substrato externo para dentro da hifa, o quinto termo descreve a manutenção e o último termo descreve o consumo de substrato para o alongamento da hifa. É importante observar que os termos de difusão, convecção, transporte de substrato externo para dentro da hifa e

manutenção são multiplicados pela concentração de biomassa, porque esses processos dependem da concentração de biomassa na superfície de controle.

Este modelo, embora seja o primeiro a incorporar a descrição do consumo de nutrientes internos em relação ao crescimento do micélio, possui uma grande limitação. O substrato não afeta a cinética de crescimento de maneira direta e contínua. O modelo assume que a hifa passa por “*shifts*” metabólicos discretos, como mostra a figura 2.25. Por exemplo, o parâmetro v é responsável pela velocidade de alongamento da hifa, seu valor é zero quando C_{in} é menor ou igual a C_1 , aumenta linearmente quando seu valor está entre C_1 e C_2 e depois fica constante em concentrações acima de C_2 . Outro parâmetro afetado pelo “*shift*” metabólico é o parâmetro S , que modula a frequência de ramificação. Porém, esse tipo de comportamento com salto discreto na forma de “*shift*” metabólico não é um fenômeno muito comum em sistemas biológicos e os autores não apresentam nenhuma justificativa experimental para adotar tal abordagem. Em fermentação líquida não há “*shift*” metabólico; o efeito do substrato sobre o alongamento da hifa segue uma cinética de Monod (Yang et al, 1992).

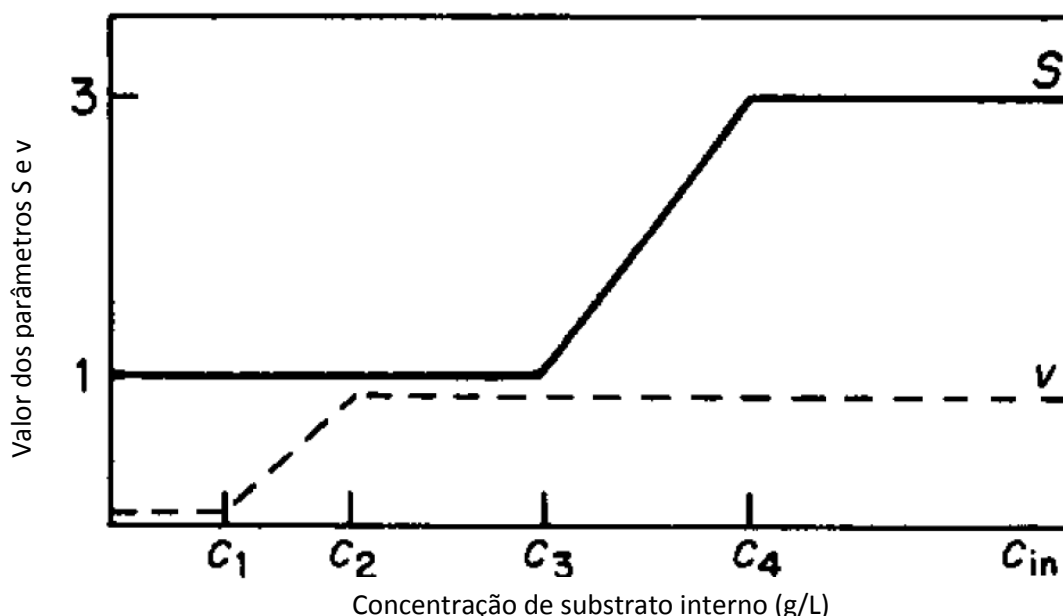


FIGURA 2.25. “SHIFT” METABOLICO PROPOSTO POR EDELSTEIN e SEGEL (1983) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO PARA A VELOCIDADE DE ALONGAMENTO DA HIFA E DO ESTADO METABÓLICO.

FONTE: EDELSTEIN e SEGEL (1983)

Esta sequência de artigos foi a primeira a descrever o crescimento do micélio em colônia. O modelo previu uma alta densidade de hifas e pontas no centro da colônia e, então, uma diminuição da densidade com a distância do centro da colônia (EDELSTEIN e SEGEL, 1983). Estas previsões concordaram qualitativamente com perfis experimentais de densidade de micélio de *Sclerotium rolfsii* em função do raio (EDELSTEIN et al., 1983).

2.2.2.2 Modelo de Davidson et al. (1996)

No modelo de Davidson et al (1996), os autores simplificaram bastante a descrição do sistema quando comparado com Edelstein (1983). Neste modelo, não há presença de pontas, mas apenas a presença de um componente auto-catalítico “a” que consome um substrato “s” para sua reprodução. O componente auto-catalítico também pode difundir livremente sobre o meio sólido, assim como o substrato “s” pode difundir no interior do meio sólido.

O modelo utiliza duas EDPs para descrever o crescimento do fungo:

$$a_t = D_a \cdot \Delta a + c_1 \cdot a^2 \cdot s - \mu \cdot a \quad (2.13)$$

$$s_t = D_s \cdot \Delta s + c_2 \cdot a^2 \cdot s + g \cdot (s_0 - s) \quad (2.14)$$

onde D_a e D_s são os coeficientes de difusão do componente auto-catalítico e do substrato, respectivamente, c_1 e c_2 são constantes do modelo para o consumo de substrato e geração do componente auto-catalítico, μ é a constante de degradação do componente auto-catalítico, S_0 é a concentração de substrato externo e g é a velocidade de transporte de substrato do meio de cultura para dentro do componente auto-catalítico. Na equação 2.13, o termo da esquerda descreve o acúmulo do componente auto-catalítico, o primeiro termo da direita descreve a difusão do componente auto-catalítico, o segundo termo da direita descreve a cinética de produção do componente auto-catalítico e o último termo da direita descreve a auto-degradação do componente auto-

catalítico. Na equação 2.14, o termo da esquerda descreve o acúmulo do substrato, o primeiro termo da direita da equação descreve a difusão do substrato, o segundo termo da direita descreve consumo de substrato para produção do componente auto-catalítico e o último termo da direita descreve o transporte de substrato entre a matriz sólida e o componente auto-catalítico.

Este modelo incorpora vários mecanismos que não refletem os mecanismos biológicos conhecidos. O primeiro mecanismo inconsistente é com relação à difusão do componente auto-catalítico “a”. Partindo do pressuposto que “a” é a biomassa do fungo, esta não deve possuir a capacidade de se mover. O que se move são as pontas e não a biomassa, que permanece sempre fixa. Por exemplo, em uma simulação do modelo toda a biomassa se concentrou na borda da colônia, algo que contradiz os dados experimentais, que mostram que biomassa tende a se concentrar no centro da colônia (TRINCI, 1971). O segundo mecanismo inconsistente é com relação à cinética de produção do componente auto-catalítico “a”. Os autores utilizam uma equação de 2° ordem com relação ao componente “a” e de 1° ordem com relação ao componente “s”. Esse tipo de cinética não ocorre em sistemas biológicos e os autores não buscaram justificar o porquê da escolha desse tipo de equação. A única contribuição do modelo é combinar a cinética de crescimento com o consumo de substrato diretamente (o modelo de Edelstein e Segel, 1983, fez isso indiretamente através do “*shift*” metabólico), embora isso tenha sido feito sem levar em conta fenômenos biológicos importantes.

2.2.2.3. Modelo de Davidson (1998)

O modelo de Davidson (1998) é um modelo de reação e difusão, e possui 3 componentes, substrato externo (S_e), substrato interno (S_i) e biomassa (m). Porém, ao contrário do modelo de Edelstein e Segel (1983), este não possui pontas ou ramificações, mas apenas biomassa. De certa forma, a única significativa diferença desse modelo quando comparado com o modelo de Edelstein e Segel (1983) é que o substrato influi diretamente e continuamente na cinética da produção de biomassa. No modelo de Edelstein e Segel (1983),

o substrato influenciava indiretamente a cinética de alongamento da hifa através dos “*shifts*” metabólicos.

A equação de balanço para a biomassa ficou na forma:

$$\frac{\partial m}{\partial t} = \nabla \cdot (D_m \cdot s_i \cdot \nabla m) + c_1 \cdot m^2 \cdot \left(\frac{s_i}{k_1 + s_i} - m \right) \quad (2.15)$$

onde D_m é o coeficiente de difusão da biomassa, c_1 é uma constante de ajuste do modelo e k_1 é a constante de saturação da produção da biomassa. O primeiro termo da direita da equação descreve a difusão da biomassa e o segundo termo da direita representa a cinética de crescimento do fungo.

O primeiro termo da direita de equação (2.15) apresenta duas limitações. A primeira limitação é com relação ao alongamento das hifas, descrito como sendo um processo de difusão. No sistema real a biomassa não difunde porque ela fica fixa no meio sólido. O único componente da biomassa que pode ser tratado como capaz de difundir são as pontas, porque estas são móveis no sistema.. A segunda limitação diz respeito à presença do substrato no primeiro termo da direita da equação, que, segundo o argumento do autor, visa simular a necessidade de energia para o processo de difusão da biomassa. Porém, a quantidade de energia armazenada numa célula não é diretamente proporcional à concentração de substrato interno e, além disso, o movimento da biomassa não está diretamente relacionado à quantidade de energia dentro da célula. Os mecanismos de produção de energia dentro da célula tendem a atingir uma velocidade máxima quando há uma concentração de substrato saturante. Além disso, a célula tende a controlar a quantidade de energia armazenada na forma de ATP para que não haja desperdícios metabólicos.

O segundo termo da direita de equação (2.15) é simplesmente empírico. Por exemplo, quando se retira o parêntese do termo tem-se:

$$c_1 \cdot m^2 \cdot \left(\frac{s_i}{k_1 + s_i} - m \right) = c_1 \cdot m^2 \cdot \frac{s_i}{k_1 + s_i} - c_1 \cdot m^3 \quad (2.16)$$

A intenção do autor (DAVIDSON, 1998) era simular uma limitação do crescimento devido à falta de área para biomassa ocupar. O termo parcial da equação “ $-c_1 m^3$ ” não possui base teórica para produção de biomassa. Além

disso, esse modelo cinético supõe que, mesmo com uma quantidade ilimitada de substrato, a concentração de biomassa nunca poderá ser maior do que uma unidade. Se isso acontecer, a biomassa passará a ser degradada, porque o termo “ $-c_1m^3$ ” ficará maior que o primeiro termo da direita da equação 2.16.

A equação de balanço para o substrato interno ficou na seguinte forma:

$$\frac{\partial s_i}{\partial t} = \nabla \cdot (D_{im} \nabla s_i) - c_2 m^2 \frac{s_i}{k_1 + s_i} + c_3 s_i \frac{s_e}{k_2 + s_e} - c_4 m (s_i - s_e) \quad (2.17)$$

onde D_{im} é o coeficiente de difusão do substrato interno e c_2 , c_3 e c_4 são constantes positivas do modelo. O primeiro termo da direita da equação descreve a difusão do substrato interno. O segundo termo da direita descreve o consumo de substrato para produção de biomassa. Já o terceiro termo da direita da equação descreve o transporte ativo de substrato externo para dentro da hifa. O quarto termo da direita descreve difusão do substrato externo para dentro da hifa (ou vice-versa).

O primeiro problema dessa equação está relacionado ao terceiro termo da direita. O transporte ativo é feito por carreadores na membrana da hifa, logo se a concentração de carreadores na membrana é constante quanto maior a concentração de biomassa, maior a concentração de carreadores. Dessa forma, esse termo teria que ter sido multiplicado pela concentração de biomassa. O segundo problema é que o autor assume a necessidade de energia para fazer esse transporte ativo e, para isso, multiplica a equação pela quantidade de substrato interno, que é usada para representar “o gasto de energia no transporte”. De qualquer maneira, não faz sentido assumir que a concentração interna de substrato auxilia no transporte do substrato externo, porque o transporte de substratos para dentro da célula mediado por carreadores é um processo reversível, cuja força motriz (diferença de concentração dentro e fora da célula) influencia na velocidade do processo. Logo, quanto maior a concentração de substrato interno menos substrato externo entra na célula.

O balanço de massa para substrato externo fica na forma de:

$$\frac{\partial s_e}{\partial t} = D_e \Delta s_e + c_5 \left(-c_6 m \frac{s_e}{k_2 + s_e} + c_4 m (s_i - s_e) \right) \quad (2.18)$$

onde D_e é o coeficiente de difusão do substrato externo no meio de cultura e c_5 é uma constante positiva. O segundo termo descreve a difusão do substrato externo no meio de cultura, o primeiro termo entre parênteses descreve o transporte de substrato ativo para dentro da hifa e o segundo termo entre parênteses descreve o transporte por difusão. A constante c_5 , que tem um valor menor que 1 e serve para ajustar, empiricamente, a proporção de volume entre a hifa e o volume do meio de cultura. O problema da equação 2.18 é que ela apresenta um balanço de massa inconsistente quando comparada com a equação 2.17. O autor multiplicou o termo de transporte ativo pelo valor da concentração de biomassa m na equação 2.18, porém na equação 2.17 esse termo está multiplicado pela concentração de substrato s_i . No modelo publicado posteriormente esse erro não aparece (Davidson e Olsson, 2000)

A grande vantagem do modelo de Davidson (1998) é que ele incorpora um balanço de massa mais completo sobre os fenômenos que ocorrem no crescimento do fungo.

2.2.2.3 Modelo de Davidson e Olsson (2000)

A única diferença do modelo de Davidson (1998) para o modelo de Davidson e Olsson (2000) é a incorporação da convecção dentro da hifa no sentido da margem da colônia. Assume-se que o substrato interno se desloca por difusão e convecção e que o processo de convecção é ativo e consome energia. Para descrever este processo ativo de convecção, os autores assumem que o fluxo convectivo J_{iac} é linearmente proporcional à concentração de substrato interno, como mostra a equação abaixo:

$$\mathbf{J}_{iac} = K m s_i v(s_i) \quad (2.19)$$

onde K é uma constante positiva e v é a velocidade de convecção. Esta velocidade de convecção $v(s_i)$ também é linearmente proporcional à concentração de substrato interno:

$$v(s_i) = v_1 s_i \quad (2.20)$$

onde v_1 é uma constante positiva.

A concentração de biomassa (m) entra na equação (2.19) porque o escoamento convectivo do substrato ocorre dentro da hifa, logo quanto maior a concentração de biomassa maior é o número de hifas, o que torna o fluxo convectivo maior.

A equação (2.19) é totalmente empírica. Os autores assumiram que a concentração de ATP (energia celular) é diretamente proporcional à concentração de substrato interno s_i . O problema com essa hipótese é o mesmo problema encontrado na equação de transporte do modelo anterior (DAVIDSON, 1998).

2.2.2.3 Modelo de Boswell et al. (2002)

O modelo de Boswell et al (2002) é uma continuação do modelo de Edelstein (1983). O modelo faz a conexão entre a velocidade de crescimento e substrato interno, como fez Davidson (1998) e Davidson e Olsson (2000), porém é incorporado o balanço de pontas no sistema. Dessa forma, o balanço de massa para biomassa fica na forma:

$$\frac{\partial m}{\partial t} = v s_i p - d m, \quad (2.21)$$

onde m é a concentração de biomassa, v é a velocidade de alongamento das pontas, cujo sentido do alongamento das pontas é na direção da margem da colônia, S_i é a concentração de substrato interno, p é a concentração de pontas e d é uma constante positiva relacionada à degradação de biomassa. O primeiro termo da esquerda descreve o acúmulo de biomassa no sistema, o primeiro termo da direita descreve a produção de biomassa pelo alongamento

da ponta e o segundo termo da direita descreve a degradação da biomassa, por uma cinética de primeira ordem. A produção de biomassa está relacionada ao movimento das pontas, que formam um “rastros” de biomassa durante o alongamento, semelhante ao mesmo pressuposto de Edelstein e Segel (1983). A única diferença entre esse modelo e Edelstein e Segel (1983) é que esse processo de alongamento depende da concentração de substrato interno.

O modelo também faz um balanço para biomassa inativada (biomassa sem atividade biológica) (m') como:

$$\frac{\partial m'}{\partial t} = dm - rm'$$

Eq. (2.22)

onde r é uma constante positiva para o desaparecimento da biomassa degradada (lise da biomassa inativada).

O balanço de massa para pontas fica na forma de:

$$\frac{\partial p}{\partial t} = - \frac{\partial}{\partial x} (vs_i p) + bs_i m - fmp,$$

Eq. (2.23)

onde b é uma constante para produção de pontas (ramificação intercalar), f é uma constante positiva para anastomose. O primeiro termo da esquerda descreve o acúmulo de pontas, o primeiro termo da direita descreve pela convecção de pontas, o segundo termo da direita descreve a produção de pontas por ramificação e o terceiro termo da direita descreve a anastomose. Essa equação é semelhante à equação proposta por Edelstein e Segel (1983), a única diferença é que os processos descritos dependem diretamente da concentração de substrato interno.

O balanço de massa para o substrato interno fica na forma de:

$$\frac{\partial s_i}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D_i m \frac{\partial s_i}{\partial x} - D_a m s_i \frac{\partial p}{\partial x} \right)$$

$$+ c_1 s_i m s_e - c_2 v s_i p - c_4 D_a m s_i \left| \frac{\partial p}{\partial x} \right|$$

(2.24)

onde D_i é a constante de difusão do substrato interno, D_a é a constante de convecção do substrato interno, S_e é a concentração de substrato externo e c_1 , c_2 e c_4 são constantes positivas. O primeiro termo da esquerda descreve o acúmulo de substrato interno, o primeiro termo da direita descreve a difusão do substrato interno, o segundo termo da direita descreve a convecção do substrato interno, o terceiro termo da direita descreve o transporte ativo de substrato externo para dentro da hifa, o quarto termo da direita descreve o consumo de substrato interno para produção de pontas e o quinto termo descreve o consumo de substrato para convecção do substrato interno.

O balanço de massa para o substrato externo (S_e) fica na forma de:

$$\frac{\partial s_e}{\partial t} = D_e \frac{\partial^2 s_e}{\partial x^2} - c_3 s_i m s_e \quad (2.24)$$

onde D_e é a constante de difusão do substrato externo no meio de cultura e c_3 é uma constante positiva. O primeiro termo descreve o acúmulo de substrato externo no sistema, o segundo termo descreve a difusão do substrato externo e o terceiro termo descreve o transporte ativo de substrato interno.

Este modelo foi a base de vários artigos publicados subsequentemente (BOSWELL 2003, BOSWELL 2012). Embora o modelo descreva muitos fenômenos como, por exemplo, a anastomose, ele possui falhas semelhantes ao modelo de Davidson e Olsson (2000). Por exemplo, a produção de pontas, o alongamento de pontas e o transporte de substrato do meio externo para dentro da hifa são modelados como sendo de 1° ordem em relação ao substrato interno:

$$f_p = b s_i m \quad \text{Produção de pontas} \quad (2.25)$$

$$f_i = c_1 s_i m s_e \quad \text{Transporte de substrato por carreadores} \quad (2.26)$$

$$J_p = v s_i p \quad \text{Alongamento da hifa} \quad (2.27)$$

Isso traz um problema semelhante ao modelo de Davidson e Olsson (2000), onde a velocidade de um processo passa a ser diretamente proporcional à concentração de substrato.

Outro aspecto problemático do modelo é a forma como os autores tratam a convecção:

$$J_i^{act} = D_a m s_i \frac{\partial p}{\partial x} \quad (2.28)$$

O termo da direita da equação afirma que a convecção de substrato (J_i^{act}) é diretamente proporcional ao gradiente de pontas no espaço. Mas, como notou Eldelstein e Segel (1983), essa hipótese não é plausível porque se nota experimentalmente que essencialmente não há um gradiente de pontas no micélio. Além disso, na margem da colônia, onde há poucas pontas, o fluxo convectivo ocorreria na direção inversa.

2.2.2.4 Modelo de Nopharatana et al (1998)

O modelo de Nopharatana et al (1998) é o primeiro modelo que descreve o comportamento das hifas aéreas: todos os modelos anteriores se limitaram a descrever o comportamento das hifas superficiais. Um desenho esquemático do sistema modelado pode ser visto na figura 2.26. O modelo utiliza EDPs de reação-difusão. Foi assumido que o sistema possui três variáveis: pontas, biomassa e glucose. As pontas possuem a capacidade de difundirem na região entre $x=0$ e $x=L$. A glucose difunde a partir de uma solução contida na base das hifas até as pontas, onde é produzida a biomassa.

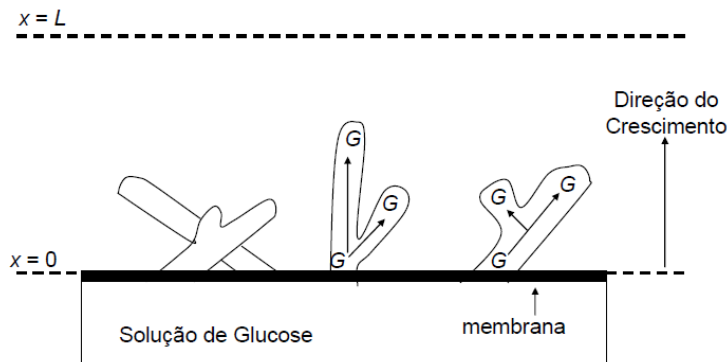


FIGURA 2.26 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO SISTEMA MODELADO POR NOPHARATANA, HOWES E MITCHELL (1998)

G é a glucose, x a direção de crescimento e L o espaço disponível acima da superfície para o crescimento.

FONTE: NOPHARATANA, HOWES e MITCHELL (1998)

As equações obtidas do balanço de massa são descritas a seguir. O balanço de massa para glucose fica:

$$\frac{\partial G}{\partial t} = D_{hyp} \frac{\partial}{\partial x} \left(B \frac{\partial (G/B)}{\partial x} \right) - \frac{1}{Y_{X/G}} n v_{max} \left(1 - \frac{B}{B_m} \right) \left(\frac{G|_{x-\delta}}{k_t + G|_{x-\delta}} \right) a \rho - mB \quad (2.29)$$

onde t é o tempo, x é a altura acima da superfície, n é a concentração de pontas, B é a concentração de biomassa seca e G é a concentração de glucose. O parâmetro D_{hyp} é a difusividade de glucose na hifa, $Y_{X/G}$ é o coeficiente de rendimento de biomassa a partir da glucose, v_{max} é a velocidade máxima de extensão das pontas, B_m é a concentração máxima de biomassa, k_t é a constante de saturação de glucose, “ a ” é a área transversal da hifa, ρ é a densidade da hifa, m é o coeficiente de manutenção e δ é o comprimento da zona de extensão. O primeiro termo do lado direito da equação 2.29 diz respeito à difusão da glucose no interior da hifa, segundo a segunda Lei de Fick; o segundo termo descreve o consumo de glucose para a produção de biomassa e o terceiro termo descreve o consumo de glucose para a manutenção celular.

Foi assumido que a produção de biomassa depende da velocidade de extensão da ponta. O balanço de massa para biomassa fica:

$$\left. \frac{\partial B}{\partial t} \right|_x = n v_{\max} \left(1 - \frac{B}{B_m} \right) \left(\frac{G|_{x-\delta}}{k_t + G|_{x-\delta}} \right) a \rho \quad (2.30)$$

onde v_{\max} é a velocidade máxima de extensão da ponta, a é a área transversal de uma única ponta, ρ é a densidade da hifa, B_m é a quantidade máxima de substrato e k_t é uma constante de saturação. O primeiro termo entre parênteses refere-se a inibição do crescimento devido a densidade de biomassa e o segundo refere-se à cinética de Monod para a concentração de glucose.

A última equação do modelo é o balanço para as pontas. Estas podem se movimentar por difusão e são produzidas a partir de outras pontas. A equação fica na forma de:

$$\left. \frac{\partial n}{\partial t} \right|_x = \alpha_t n \left(1 - \frac{B}{B_m} \right) \left(\frac{G|_{x-\delta}}{k_t + G|_{x-\delta}} \right) + \frac{\partial}{\partial x} \left(D_b \left(1 - \frac{B}{B_m} \right) \left(\frac{G|_{x-\delta}}{k_t + G|_{x-\delta}} \right) \frac{\partial n}{\partial x} \right) \quad (2.31)$$

onde α_t é a velocidade específica de geração de novas pontas e D_b é o coeficiente de difusão das pontas no ar. Na equação 2.31, o primeiro termo da direita refere-se à produção de pontas como função da biomassa e da concentração de glucose e o segundo está relacionado à difusão destas pontas no espaço.

As simulações do modelo puderam então ser comparadas com resultados experimentais, como mostra a figura 2.25. Como pode ser observado na simulação com 60 horas ocorre a formação de um patamar de biomassa não compatível com os dados experimentais, logo o modelo não conseguiu simular corretamente o comportamento do sistema com tempos de simulação acima de 30 horas.

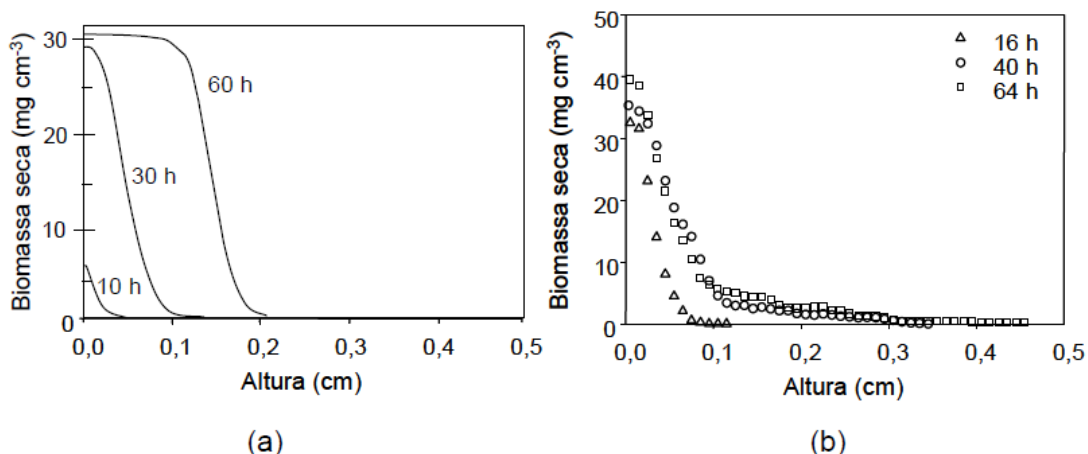


FIGURA 2.27 – PERFIS SIMULADOS E EXPERIMENTAIS DO CRESCIMENTO DE HIFAS AÉREAS

(a) Perfis simulados para as hifas aéreas por Nopharatana, Howes e Mitchell (1998) (b) Perfis experimentais do crescimento de hifas aéreas de *Rhizopus oligosporus* crescendo sobre o meio de cultivo *Potato Dextrose Agar* obtido por Nopharatana (1999).

FONTE: NOPHARATANA, HOWES e MITCHELL (1998)

Além disso, o modelo apresenta outro problema no que se refere à forma como é produzida a biomassa. Os autores assumem que a biomassa é produzida através da extensão das pontas com uma velocidade que depende da concentração de pontas, substrato e biomassa. Porém, a movimentação das pontas no sistema se dá através da difusão das pontas e não através de uma velocidade de extensão. Logo, a difusão das pontas deveria ser o mecanismo de produção de biomassa. Quando a ponta da hifa se move no espaço implicitamente ela deixa um rastro de biomassa para trás. Logo as pontas não podem se mover sem produzir biomassa como fez o modelo de Nopharatana et al (1998). Por exemplo, se houver uma região onde não há variação na concentração de pontas, não haverá movimento das pontas porque estas dependem de uma variação de concentração de pontas para se moverem, mas haverá produção de biomassa, porque esta só depende da concentração das pontas.

A grande contribuição deste modelo é que ele o primeiro a descrever as hifas aéreas. Além disso as expressões matemáticas utilizadas para descrever a produção de biomassa e de pontas são, do ponto de vista teórico,

mais embasadas, quando comparadas com os modelos de Boswell et al. (2002) e Davidson (1998).

2.2.3 Resumo dos modelos

Como pode ser observado na figura 2.28, os dois percursores dos modelos microscópicos para fungos em substrato sólido são os modelos de Prosser e Trinci (1979) e Edelstein (1982). O modelo de Prosser e Trinci (1979) trouxe, como grande inovação, a divisão do sistema em compartimentos fixos e a inclusão do papel das vesículas no alongamento das hifa. Além disso, o modelo fez previsões sobre a localização das hifas e ramificações geradas pela simulação.

O modelo de Edelstein (1982) teve como grande inovação a forma de tratar o sistema como sendo pseudo-homogêneo e contínuo. Isto facilita muito a modelagem matemática de populações de hifa, porém inviabiliza a geração de uma imagem do micélio com a localização dos pontos de ramificação e das hifas. Os modelos posteriores pseudo-homogêneos são extensões do modelo de Edelstein e Segel (1983), onde os autores apenas fizeram a conexão entre a velocidade de crescimento e a concentração de substrato interno, algo que Edelstein e Segel (1983) não haviam feito de maneira explícita.

Dentro da classe dos modelos pseudo-homogêneos, o único que apresentou inovações foi o modelo de Nopharatana et al (1998). A grande inovação do modelo foi descrever o comportamento das hifas aéreas, algo que não tinha sido tentado antes. Além disso, as equações utilizadas para descrever a produção de biomassa e pontas foram mais criteriosas e compatíveis com sistemas biológicos.

Já com relação aos modelos discretos, há uma maior diferenciação entre os modelos propostos. O modelo de López-Isunza et al. (1997) é bastante diferente do modelo de Prosser e Trinci (1979) e possui a inovação de fundir, num mesmo modelo, o efeito do substrato sobre a produção de vesículas e o efeito das vesículas sobre o alongamento da hifa. Porém, esse modelo tem a limitação de ter utilizado EDPs, o que torna difícil a descrição de

processos de ramificação. O motivo para isto é que a inclusão de ramificações em sistemas com EDPs acarreta muitas condições de contorno (YANG et al., 1992). Isso torna difícil a resolução das equações do modelo. O modelo de Boswell et al. (2007) é o primeiro a propor um modelo híbrido, que consiste num modelo discreto, mas que possui elementos oriundos de modelos pseudo-homogêneos, como as equações de balanço de massa e os fenômenos de transporte que ocorrem dentro da hifa. Neste modelo, é possível construir uma imagem realista do micélio, com a posição dos pontos de ramificação e dos segmentos de hifa e é possível também visualizar a distribuição do substrato dentro do micélio. O modelo de Coradin (2010) traz como inovação a abordagem de tratar a hifa como sendo composta de tanques agitados em série, o que facilita o balanço de massa e a incorporação de ramificações. Por último, o modelo de Coradin et al. (2011) teve como grande inovação a descrição de duas sub-populações de hifa, algo que não tinha sido tentado antes e, além disso, este é um dos poucos modelos que tenta descrever resultados experimentais com precisão.

Porém, nenhum desses modelos se propõe a descrever o crescimento do micélio como um todo, desde esporulação até a formação dos esporos. Dessa forma, ainda é possível melhorar e avançar na modelagem do sistema de crescimento microscópico de fungos. Uma das formas de fazer isso é descrevendo melhor o alongamento da hifa como resultado do transporte de substrato e produção de vesículas. Além disso, os modelos propostos poderiam ser estendidos para descrever outros tipos de hifa como as hifas aéreas, penetrantes e reprodutivas.

Outro aspecto que poderia ser melhorado é o conceito de modelo híbrido, um modelo capaz de descrever dois processos simultaneamente: os mecanismos de alongamento da hifa e a morfologia microscópica do micélio. A maioria dos modelos propostos na literatura não descreve esses dois processos simultaneamente.

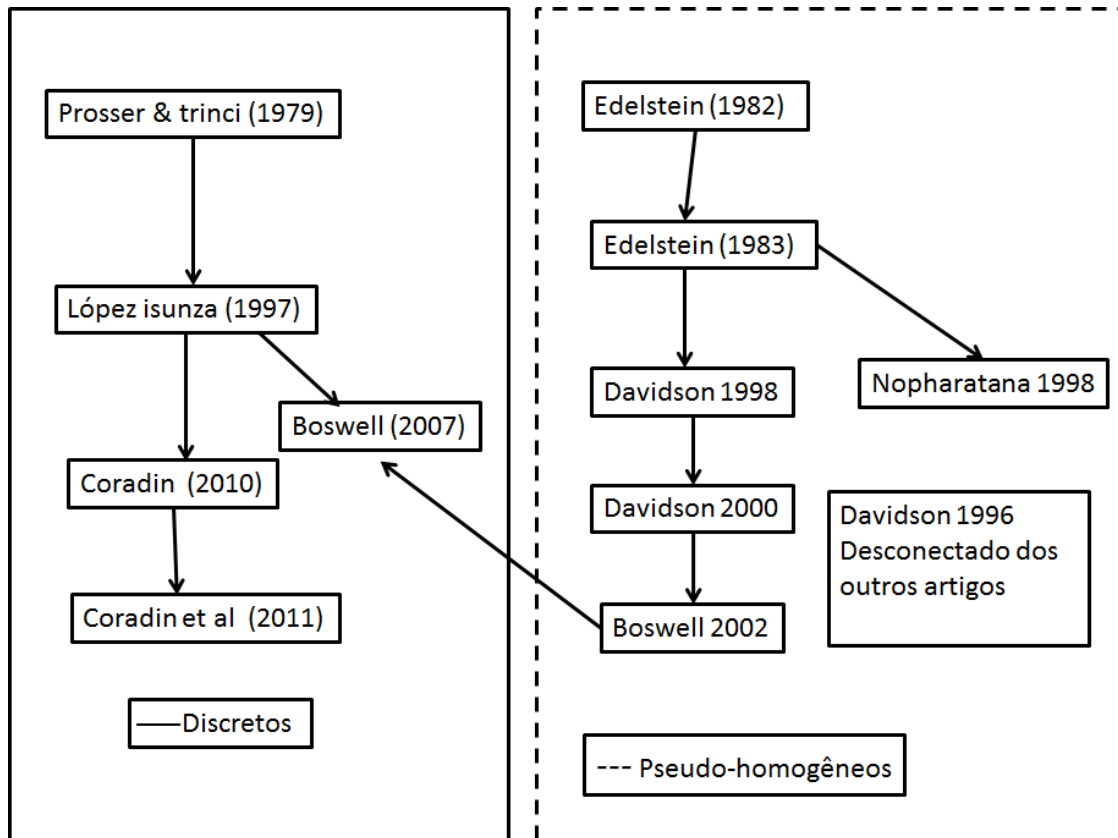


FIGURA 2.28 ORIGEM DOS MODELOS MATEMÁTICOS MICROSCÓPICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS CRESCENDO EM SUBSTRATO SÓLIDOS.

O modelo de Prosser e Trinci (1979) deu origem aos modelos de López-Isunza et al. (1997), Coradin (2010) e Coradin et al. (2011). O modelo de Edelstein e Segel (1983) deu origem aos modelos de Davidson (1998, 2000), Boswell et al. 2002 e Nopharatana et al. (1998). O modelo de Boswell et al. (2007) é a tentativa de fusão de ambas as abordagens.

FONTE: O autor

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O objetivo a longo prazo desta linha de pesquisa é a obtenção de um modelo completo para descrição do crescimento microscópico de fungos filamentosos em substratos sólidos com extensão e ramificação das hifas e formação da rede tridimensional do micélio. Para ser capaz de simular o desenvolvimento do micélio ao nível microscópico, o modelo teria que ter a base de um modelo discreto e descrever a absorção e transporte dos nutrientes, a produção e transporte de vesículas e a fusão destas vesículas nas pontas, as regras de ramificação e os fenômenos de diferenciação celular.

Como foi mostrado na revisão, nenhum dos modelos discretos atuais incorpora todos estes processos. Além disto, a maioria dos modelos tem limitações em suas formulações, que faz com que eles não possam servir como uma base para o desenvolvimento do modelo completo. Desta maneira, é necessário desenvolver uma nova estratégia para representar o sistema.

O modelo discreto mais avançado atualmente é o de López-Isunza et al. (1997). Entretanto, este modelo foi proposto para uma única hifa e não fornece uma base para o desenvolvimento de um modelo de um micélio completo. Desta maneira, o objetivo do presente trabalho é o de desenvolver uma estratégia de modelagem que possa servir como uma base para um futuro modelo matemático completo.

O trabalho foi dividido em duas partes, cada um com seu objetivo específico:

- (1) Desenvolver uma nova representação do micélio pela extensão da estratégia de n-tanques-em-série usada no modelo de Coradin (2010);
- (2) Desenvolver regras mais simples para o movimento das pontas em relação ao modelo de Coradin et al. (2011).

A primeira etapa que deve ser cumprida para obter um modelo completo é descrever matematicamente quais são os mecanismos básicos de alongamento de uma hifa. Estes mecanismos básicos englobam a translocação de substratos para produção de vesículas, transporte de vesículas para a ponta e fusão das vesículas na ponta. Nenhum modelo na literatura possui uma descrição completa e satisfatória desses mecanismos básicos. O único modelo

que tenta descrever todos os mecanismos básicos é o de López-Isunza et al. (1997) que, como ficou demonstrado na revisão (seção 2.2.1.2), possui muitas limitações.

A segunda etapa necessária para obtenção de um modelo completo é encontrar os mecanismos e as regras básicas da ramificação em fungos. A maioria dos modelos propostos não possui regras para ramificação. Os modelos discretos que possuem regras de ramificação, as descrevem de uma maneira muito simples e apenas para hifas superficiais. O único modelo que descreve outros tipos de hifa é o modelo de Coradin et al. (2011), que descreve as regras de ramificação para hifas aéreas. Porém, esse modelo utiliza regras muito arbitrárias e um número muito grande de parâmetros. Sendo assim, o segundo objetivo dessa tese é encontrar regras de ramificação para hifas aéreas e penetrantes mais simples e com um número menor de parâmetros em relação ao modelo de Coradin et al. (2011).

As duas partes são apresentadas em dois capítulos diferentes.

4 MODELO MATEMÁTICO FENOMENOLÓGICO

Nesta etapa do trabalho, foi desenvolvido um modelo matemático fenomenológico que descreve os mecanismos de alongamento da hifa. O modelo foi desenvolvido para simular o alongamento de uma hifa reprodutiva. Esse tipo de hifa foi escolhido por não possuir ramificações, o que torna sua descrição mais simples. O modelo foi calibrado com resultados experimentais para o desenvolvimento deste tipo de hifa em *Rhizopus oligosporus* (NOPHARATANA et al., 2003). Este fungo é asseptado e apresenta três tipos de hifas em seu desenvolvimento: hifa vegetativa penetrante, hifa vegetativa e hifa reprodutiva (Figura 4.1).

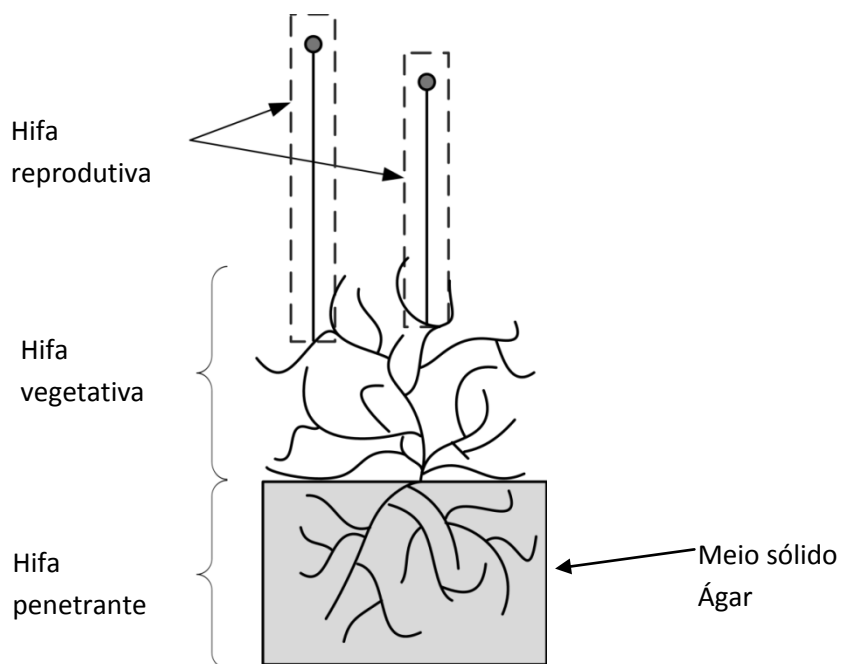


FIGURA 4.1. SISTEMA MICROSCÓPICO DE CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS, INDICANDO OS TRÊS TIPOS DE HIFAS PRESENTES.

FONTE: O autor

4.1 DESCRIÇÃO DOS FENÔMENOS PRESENTES NA HIFA REPRODUTIVA EM COMPARAÇÃO COM A HIFA VEGETATIVA

Baseado nas micrografias obtidas com *Aspergillus nidulans* por Mims et al. (1988), que mostram o acúmulo de vesículas na ponta da hifa reprodutiva, foi pressuposto que os mecanismos envolvidos no alongamento das hifas reprodutivas são semelhantes àqueles de hifas vegetativas.

Apesar da semelhança com relação ao local onde se encontram as vesículas, sob outros aspectos as hifas reprodutivas e vegetativas são bem diferentes. Entre essas diferenças podem ser ressaltadas três: a fase de crescimento durante a qual as hifas se desenvolvem, os perfis de ramificação e a fonte de nutrientes para o alongamento. Com relação à fase de desenvolvimento, o aparecimento da hifa reprodutiva tende a ser tardio, quando está se esgotando a fonte de nutrientes. Com relação aos perfis de ramificação, as hifas vegetativas aéreas tendem a ramificar com bastante frequência e em quase todas as direções, ao passo que as hifas reprodutivas tendem a ser pouco ramificadas e com uma tendência de crescer perpendicularmente à superfície onde são cultivadas (Trinci, 1974; Nopharatana et al, 2003). Com relação à fonte de nutrientes, geralmente hifas vegetativas utilizam carboidratos absorvidos do meio de cultura, enquanto as hifas reprodutivas utilizam maltose derivada da quebra do carboidrato de reserva celular, o glicogênio (Prosser e Tough, 1991).

4.2 SIMPLIFICAÇÕES DO MODELO

Os fenômenos que ocorrem na hifa reprodutiva são simplificados para o desenvolvimento do modelo, de modo que os únicos componentes considerados são vesículas e maltose. A maltose é considerada o substrato limitante para a produção de vesículas, assume-se que os demais nutrientes estão em excesso. A maltose é obtida através da hidrólise de glicogênio no “*foot-cell*” e transportada para a hifa reprodutiva por convecção e difusão. O “*foot-cell*” não fornece e não produz vesículas. A concentração de maltose na

hifa vegetativa é considerada constante, assumindo que nesta hifa a quebra do glicogênio é controlada, como ocorre em *Streptomyces* (DYSON, 2011).

4.3 MODELAGEM MATEMÁTICA DO SISTEMA

No modelo, a hifa é representada como por uma série de tanques bem misturados (figura. 4.3.). As divisões não representam septos e servem apenas para delimitar os tanques. Essa forma de representar o sistema facilitará a fusão, no futuro, deste modelo com o de Coradin et al. (2011).

A hifa contém quatro tipos de tanque (Figura 4.3): o tanque de reserva de maltose, tanques intermediários sem produção de vesículas, tanques intermediários com produção de vesículas e o tanque da ponta. Os tanques com produção de vesículas correspondem aos últimos 30 tanques intermediários antes da ponta, de modo que, se o comprimento da hifa for igual ou menor que 31 tanques, todos os tanques intermediários são capazes de produzir vesículas. Este valor está dentro da faixa encontrada por Trinci (1971) para a zona periférica de crescimento. Considerando um tanque genérico qualquer i , foi feito o balanço de massa para cada espécie, um para maltose (G_i) e um para vesículas (V_{e_i}).

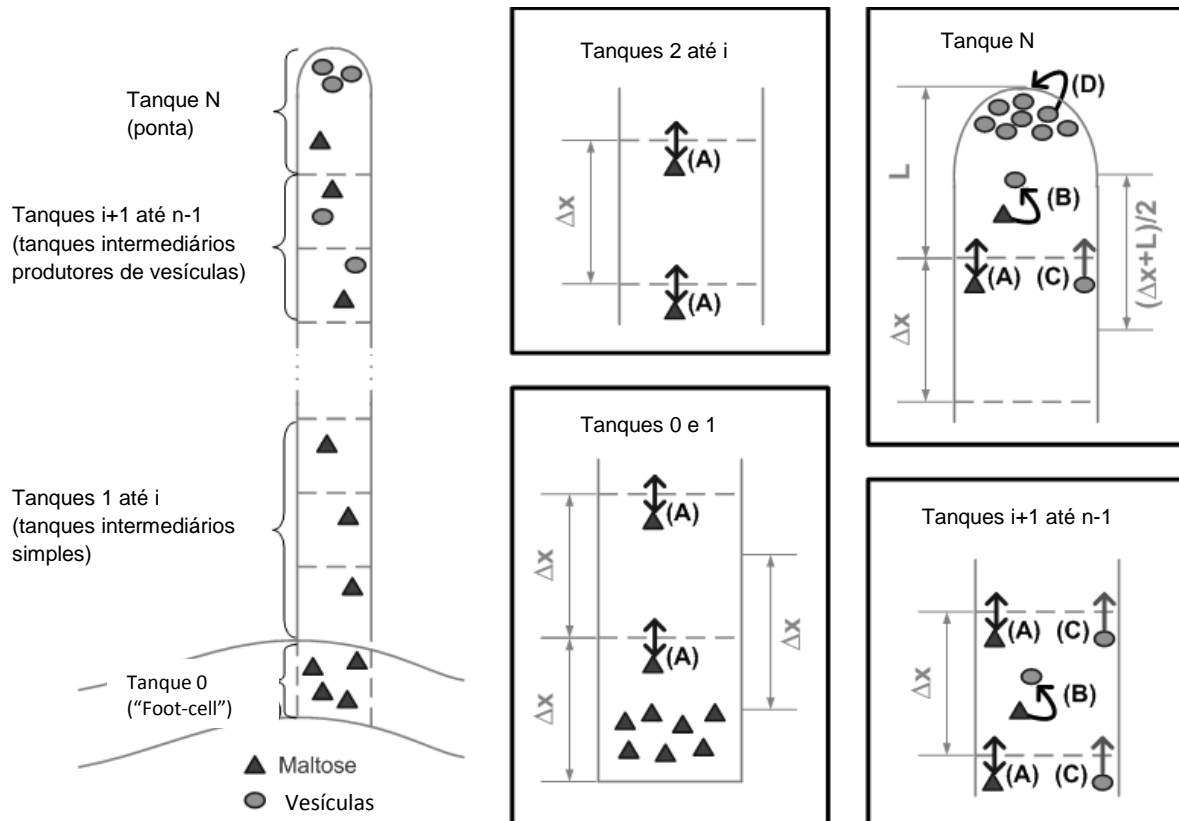


FIGURA 4.3. DIAGRAMA DO SISTEMA.

No tanque 0 se encontra o "foot-cell" que fornece maltose para o sistema, o tanque 1 recebe maltose do tanque 0. Os tanques 1 até i são tanques intermediários onde não há produção de maltose. Os tanques $i+1$ até $N-1$ são produtores de vesículas. O tanque N é onde as vesículas são consumidas para o alongamento, é o único tanque com comprimento variável. É importante notar que no início da simulação os tanques 1 até $i+1$ são produtores de vesículas. Somente quando se atinge um mínimo de 31 tanques no sistema é que surgem tanques intermediários simples

FONTE: O autor

O tanque de reserva de maltose corresponde à hifa vegetativa a qual a base da hifa reprodutiva é ligada. Neste tanque, não há vesículas e a concentração de maltose é constante, assim, o balanço de massa para maltose no tanque é dado como:

$$\frac{dG_{res}}{dt} = 0 \quad (4.1)$$

onde G_{res} é a concentração de maltose no tanque reserva (g-maltose L^{-1}) e t é o tempo de cultivo a partir do início do alongamento da hifa reprodutiva (h).

O primeiro tanque da hifa reprodutiva está em contato com o tanque de reserva. Nesse tanque, a maltose é transportada por convecção e difusão, e é

consumida para formar vesículas (até o sistema completar 31 tanques) e para a manutenção da atividade metabólica da hifa. Assim, obtém-se a Eq. (2):

$$\begin{aligned} \frac{dG_1}{dt} = & \frac{v}{\Delta x} \cdot (G_{res} - G_1) + \frac{D}{\Delta x \cdot \left(\frac{\Delta x_{res} + \Delta x}{2} \right)} \cdot (G_{res} - G_1) - \frac{D}{\Delta x^2} \cdot (G_{res} - G_1) \\ & - Y_{G/V} \cdot \frac{k_{pves} \cdot G_1}{K_g + G_1} - m \cdot \rho_{hypha} \end{aligned} \quad (4.2)$$

onde G_1 é a concentração de maltose no primeiro tanque (g-maltose L^{-1}), v é a velocidade superficial do fluxo citoplasmático no interior da hifa ($dm\ h^{-1}$), Δx é o comprimento do tanque (dm), D é a difusividade da maltose no interior da hifa ($dm^2\ h^{-1}$), Δx_{res} é o comprimento do tanque de reserva de maltose (dm), G_2 é a concentração de maltose no segundo tanque (g-maltose L^{-1}), $Y_{G/V}$ é o coeficiente estequiométrico que relaciona o consumo de maltose à produção de vesículas (g-maltose g-vesículas $^{-1}$), k_{pves} é a velocidade máxima da produção de vesículas (g-vesículas $dm^{-3}h^{-1}$), K_g é a constante de saturação em função da maltose para produção de vesículas (g-maltose dm^{-3}), m é o coeficiente de manutenção da hifa em função da maltose (g-maltose g-biomassa $^{-1}\ h^{-1}$) e ρ_{hypha} é a densidade de biomassa seca da hifa (g-biomassa. L^{-1}).

No caso das vesículas, o transporte é exclusivamente ativo e unidirecional, logo, a única troca de vesículas que ocorre no primeiro tanque é a saída para o tanque posterior. Outro fenômeno que afeta o balanço de vesículas é sua produção a partir de maltose. Desta maneira, o balanço de massa fica:

$$\frac{dVe_1}{dt} = \frac{v_{ves}}{\Delta x} \cdot (Ve_1) + \frac{k_{pves} \cdot G_1}{K_g + G_1} \quad (4.3)$$

onde Ve_1 é a concentração de vesículas no primeiro tanque (g-vesículas L^{-1}) e v_{ves} é a velocidade superficial da vesícula no interior da hifa ($dm\ h^{-1}$).

As equações (4.2) e (4.3) são aplicadas até a hifa atingir 31 tanques; com o surgimento do 32º tanque, não ocorre mais formação de vesículas no primeiro tanque, logo, o termo correspondente à produção de vesículas é eliminado da equação (4.2) e na equação (4.3).

As equações que descrevem o comportamento dos tanques intermediários (entre o primeiro tanque e o tanque da ponta da hifa) são semelhantes às equações do primeiro tanque, pois os mesmos fenômenos estão presentes. A diferença é que nos tanques intermediários há entrada de vesículas. Assim, os balanços para maltose e vesículas para o tanque i são dados pelas equações (4.4) e (4.5), respectivamente:

$$\frac{dG_i}{dt} = \frac{v}{\Delta x} \cdot (G_{i-1} - G_i) + \frac{D}{\Delta x^2} \cdot (G_{i-1} - G_i) - \frac{D}{\Delta x^2} \cdot (G_i - G_{i+1})$$

$$-Y_{G/V} \cdot \frac{k_{pves} \cdot G_i}{K_g + G_i} - m \cdot \rho_{hypha}$$

← Termos removidos nos tanques intermediários

$$\frac{dVe_i}{dt} = \frac{vves}{\Delta x} \cdot (Ve_{i-1} - Ve_i) + \frac{k_{pves} \cdot G_i}{K_g + G_i}$$

onde G_i é a concentração de maltose no i -ésimo tanque (g-maltose L^{-1}) e Ve_i é a concentração de vesículas no i -ésimo tanque (g-vesículas L^{-1}). Novamente, estas equações são válidas para os últimos 30 tanques antes da ponta, onde há formação de vesículas. Para os tanques intermediários não produtores de vesículas (N-31), o termo de produção de vesículas deve ser removido das equações (4.4) e (4.5).

No tanque da ponta (n), as vesículas são consumidas para o alongamento da hifa, fazendo com que o último tanque possua comprimento e volume variáveis. Para a velocidade de alongamento do tanque da ponta, ou seja, a velocidade de aumento do seu comprimento (L), é proposta uma equação análoga a de Michaelis-Menten, com base no consumo de vesículas, segundo a Equação (4.6):

$$\frac{dL}{dt} = \frac{k_{cves} \cdot Ve_n}{K_V + Ve_n} \quad (4.6)$$

onde L é o comprimento do último tanque (dm), k_{cves} é a velocidade máxima de alongamento da hifa a partir de vesículas (dm h^{-1}) e K_V é o constante de saturação em função das vesículas para o alongamento da hifa (g-vesículas dm^{-3}).

Por causa do aumento do volume do último tanque, para o balanço de massa, leva-se em conta a variação do comprimento em função do tempo que são o primeiro termo do lado direito da equação 4.7 e 4.8. Este tanque também

se diferencia dos tanques anteriores por não haver formação de vesículas, apenas o consumo, logo, o consumo de maltose ocorre somente para a manutenção celular. Assim, obtêm-se as equações (4.7) e (4.8) para os balanços de massa de maltose e vesículas, respectivamente:

$$\frac{dG_n}{dt} = -\frac{G_n}{L} \cdot \frac{dL}{dt} + \frac{v}{L} \cdot G_{n-1} + \frac{D}{L \cdot \left(\frac{L + \Delta x}{2} \right)} \cdot (G_{n-1} - G_n) - m \cdot \rho_{hypha} \quad (4.7)$$

$$\frac{dVe_n}{dt} = -\frac{Ve_n}{L} \cdot \frac{dL}{dt} + \frac{v_{ves}}{L} \cdot (Ve_{n-1}) - \frac{Y_{ve/L}}{L \cdot A} \cdot \frac{k_{cves} \cdot Ve_n}{K_V + Ve_n} \quad (4.8)$$

onde $Y_{ve/L}$ é o coeficiente estequiométrico que relaciona o consumo de vesículas com o aumento do comprimento do tanque da ponta (g-vesículas.dm⁻³).

O comprimento do último tanque aumenta até atingir o dobro do comprimento de um tanque normal. Quando isso ocorre, o último tanque é dividido em dois tanques iguais, com as mesmas concentrações de maltose e vesículas.

O modelo matemático foi implementado em linguagem FORTRAN e resolvido utilizando a sub-rotina DASSL (PETZOLD, 1989). Optou-se pelo por esta sub-rotina por se tratar de um método de integração implícito que traz mais estabilidade quando comparado a métodos explícitos na hora de fazer a integração numérica das equações do modelo.

4.4 ESTIMAÇÃO DOS VALORES DOS PARÂMETROS DO MODELO

Os parâmetros do modelo matemático foram obtidos da literatura, quando possível, como mostra a tabela 4.1. Os parâmetros $Y_{G/V}$ e $Y_{ve/L}$ foram obtidos supondo que toda a vesícula produzida se converte em biomassa e que a produção de vesículas é a única fonte de aumento de biomassa. Logo, o valor de $Y_{G/V}$ é igual ao rendimento de biomassa por grama de açúcar determinado por Nopharatana et al (1998).

Os parâmetros K_g , K_v e k_{pves} tiveram que ser utilizados como parâmetros de ajuste porque não foram encontrados valores para esses parâmetros na literatura.

Foi considerado como condições iniciais para simulação do modelo que existiam 3 tanques com zero de concentração de maltose e vesículas.

Tabela 4.1. Valores dos parâmetros

Parâmetro	Valor	Fonte	Descrição
A	1×10^{-8}	Prosser e Tough (1991)	Área da secção da hifa (dm^2)
D	$2,48 \times 10^{-4}$	Hayduk e Laudie (1974)	Difusão de maltose ($\text{dm}^2 \text{h}^{-1}$)
G_{res}	5	Dyson (2011)	Concentração de maltose no tanque fonte (g-maltose L^{-1})
k_{cves}	0,02	Trinci (1971)	Velocidade máxima de consumo de vesículas (dm h^{-1})
K_G	10	Calibrado	Constante de saturação para produção de vesículas (g-maltose dm^{-3})
k_{pves}	1000	Calibrado	Velocidade máxima de produção de vesículas ($\text{g-vesículas dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$)
K_v	1000	Calibrado	Constante de saturação para consumo de vesículas ($\text{g-vesículas dm}^{-3}$)
m	18×10^{-3}	Bull e Trinci (1977)	Coefficiente de manutenção para maltose ($\text{g-maltose g-biomassa}^{-1} \text{h}^{-1}$)
v	0,0225	Cairney (2005)	Velocidade de convecção para maltose (dm h^{-1})
v_{ves}	0,036	Regalado et al (1997)	Velocidade de convecção para vesículas (dm h^{-1})
$Y_{G/V}$	2	Nopharatana et al (1998)	Rendimento de maltose por vesículas produzidas ($\text{g-maltose g-vesículas}^{-1}$)
$Y_{Ve/L}$	1×10^{-6}	Nopharatana et al.(1998)	Rendimento de vesículas consumidas por comprimento ($\text{g-vesículas dm}^{-1}$)
Δx	0,0001	Coradin et al (2011)	Comprimento do tanque (dm)
Δx_{res}	0,0001	Coradin et al (2011)	Comprimento do tanque de reserva (dm)
ρ_{hypha}	100	Nopharatana et al (2003)	Densidade da biomassa (g-biomassa L^{-1})

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Calibração do modelo

A partir da análise das micrografias do fungo *Rhizopus oligosporus* obtidas por Nopharatana et al. (2003) após 16 h e 40 h de cultivo, foi observado que as hifas reprodutivas estavam presentes apenas na micrografia referente a 40 h (seção 2.2.1.4). A partir desta constatação, o modelo foi calibrado através de ajustes nos valores dos parâmetros K_g , K_v e k_{pves} , para que a hifa alongasse 2,3 mm em 24 h (figura 4.4). Isto corresponde à distância entre o ponto mais alto das hifas vegetativas na micrografia da 16^a hora e o ponto mais alto das hifas reprodutivas na micrografia da 40^a hora. Uma vez que Nopharatana et al (2003) obtiveram apenas estes dois pontos experimentais, não existem dados intermediários com os quais as previsões do modelo possam ser comparadas. No entanto, o perfil sigmoide (Figura 4.4) obtido na simulação é semelhante ao perfil sigmoide obtido para o tubo de germinação cultivado em ágar com glucose como fonte de carbono (Larralde-Corona, 1996) (figura 2.11, seção 2.2.1.2).

O resultado da simulação corresponde a uma velocidade média de expansão da hifa reprodutiva de $94 \mu\text{m h}^{-1}$. Este valor está dentro da faixa medida para hifas vegetativas de vários fungos, de 49 a $970 \mu\text{m h}^{-1}$, mas é inferior ao valor obtido para um fungo do mesmo gênero, *Rhizopus solonifer*, que foi aproximadamente $970 \mu\text{m h}^{-1}$, porém nesse caso o valor é para hifa vegetativa (TRINCI, 1971; TRINCI 1974).

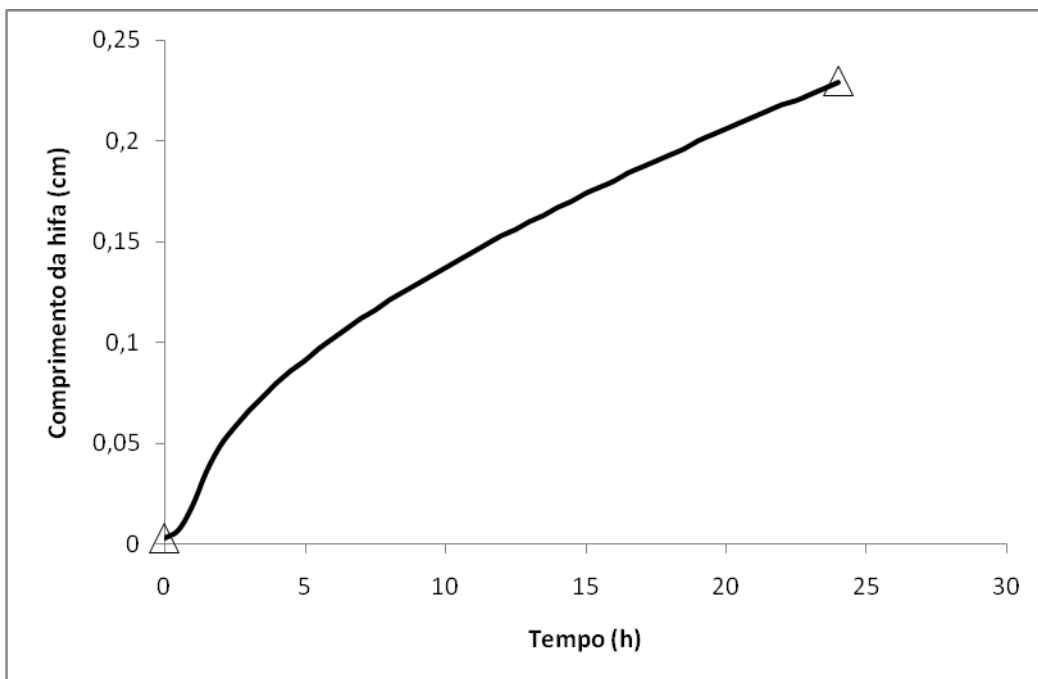


FIGURA 4.4. PERFIL DE ALONGAMENTO DA HIFA EM FUNÇÃO DO TEMPO
Obtido pelo modelo (-) e o resultado experimental obtido por Nopharatana et al (2003) (Δ).

FONTE: O autor

O perfil previsto de concentração de maltose em função do comprimento da hifa para diferentes tempos de simulação é apresentado na Figura 4.5. Conforme o tempo avança, o comprimento da curva aumenta, devido à adição de novos tanques. A concentração de maltose diminui ao longo da hifa, da base até a ponta, devido ao consumo para manutenção celular, à transferência por convecção e difusão e, nos 30 tanques mais próximos à ponta, ao consumo para a produção de vesículas. A concentração de maltose dentro da hifa nunca é nula, ou seja, sempre existe maltose para a manutenção celular. Contudo, essa concentração diminui rapidamente nos 30 tanques atrás da ponta, devido à elevada velocidade de consumo de maltose para a formação de vesículas nestes tanques.

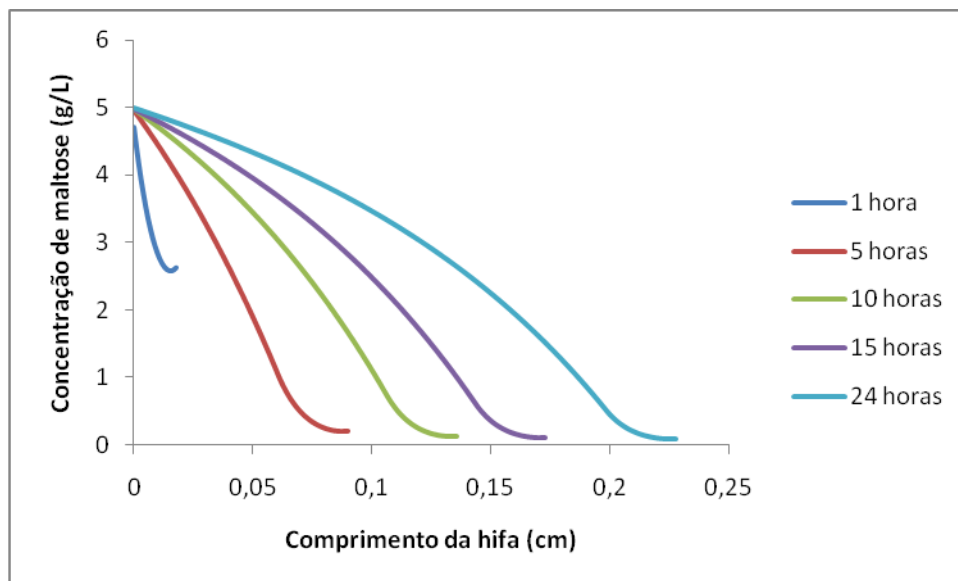


FIGURA 4.5 CONCENTRAÇÃO DE MALTOSE EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DA HIFA EM DIFERENTES TEMPOS SEGUNDO O MODELO MATEMÁTICO.

FONTE: O autor

Os primeiros tanques (1^a a 3^a) próximos da base da hifa reprodutiva apresentam comportamento diferente dos demais. Quando os primeiros tanques são formados, a concentração de maltose é inicialmente nula (condições iniciais impostas no modelo), mas aumenta rapidamente nos primeiros minutos, devido ao fornecimento pelo tanque de reserva. Nos demais tanques, logo após que eles são formados e deixam de ser tanques da ponta, há produção de vesículas, de modo que a concentração de maltose é baixa após a sua formação. Depois que a produção de vesículas nestes tanques é encerrada (setas pretas figura 4.6), inicia-se um acúmulo mais intenso de maltose. Este acúmulo continua e tende a uma assíntota da concentração do açúcar nos tanques 1^a e 50^a (4,9 g/L e 4 g/L respectivamente)(Figura 4.6).

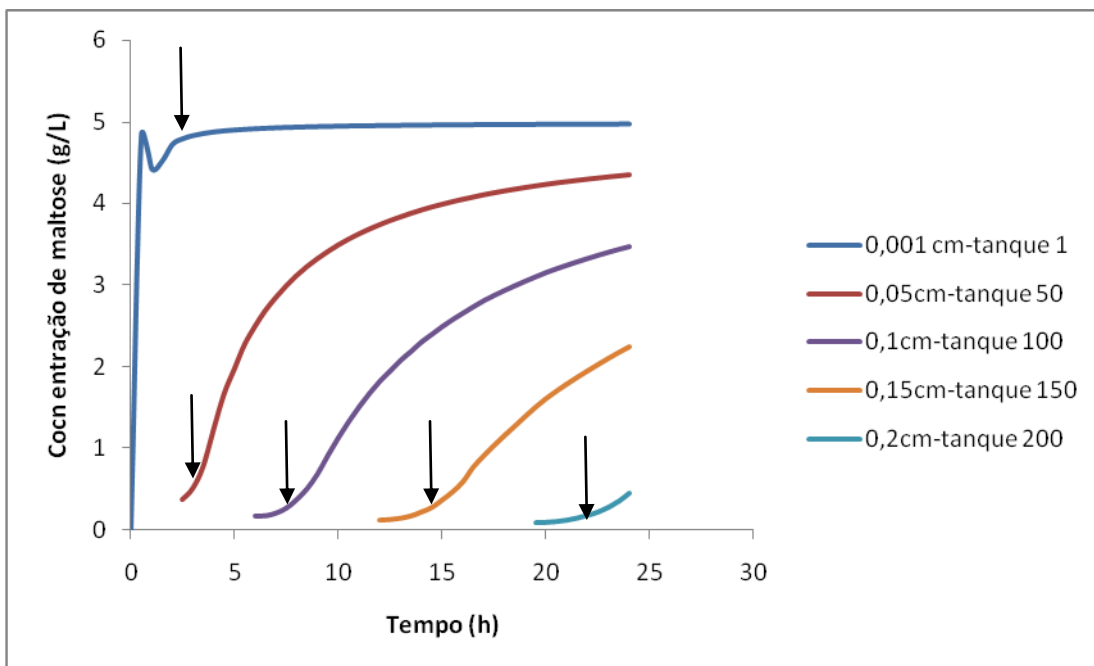


FIGURA 4.6.- CONCENTRAÇÃO DE MALTOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO EM DIFERENTES TANQUES DE HIFA SEGUNDO O MODELO MATEMÁTICO.

As setas indicam o momento em o tanque deixou de ser produtor de vesículas.

FONTE: O autor

O perfil da concentração de vesículas em função do comprimento para diferentes tempos é mostrado na Figura 4.7. Uma vez que a produção de vesículas ocorre apenas nos 30 tanques mais próximos da ponta, nos tanques mais próximos à base da hifa, a concentração de vesículas é nula após 2 h de crescimento da hifa, porque esses tanques deixam de ser produtores de vesículas na primeira hora de simulação. A concentração de vesículas na ponta é alta (85 g/L até 20 g/L), o que é qualitativamente condizente com a concentração de vesículas obtida por Prosser e Tough (1991) em hifas vegetativas e com a microscopia apresentada por Mims et al. (1988) em hifas reprodutivas. O formato da curva simulado também é qualitativamente semelhante ao obtido por Prosser e Tough (1991).'

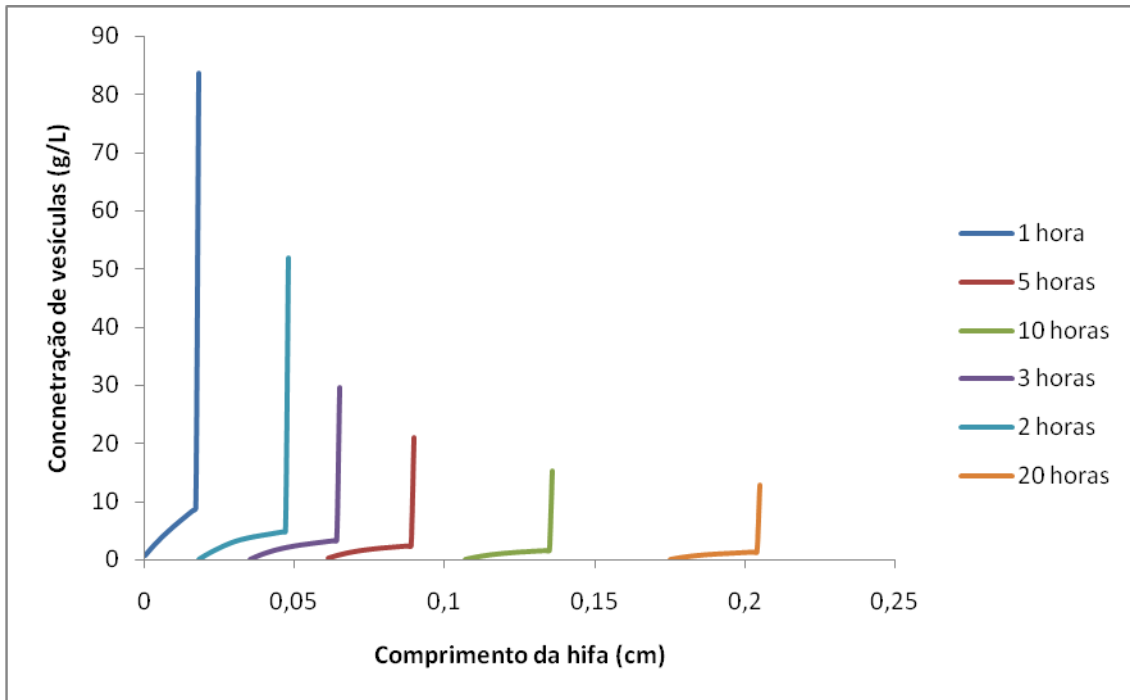


FIGURA 4.7. CONCENTRAÇÃO DE VESÍCULAS EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DA HIFA EM DIFERENTES TEMPOS SEGUNDO AS PREVISÕES DO MODELO.

FONTE: O autor

4.5.2 Análise paramétrica

A fim de determinar quais parâmetros do modelo apresentam maior influência sobre o alongamento da hifa reprodutiva, foram analisados os efeitos de sete parâmetros, individualmente, sobre o comprimento da hifa alcançado em 24 h de simulação (denominada “ L_{24} ”): a constante de saturação para produção de vesículas (K_g), a velocidade máxima de produção de vesículas (k_{pves}), a velocidade de transporte de vesículas (v_{ves}), a constante de saturação para o consumo de vesículas (K_v), a velocidade máxima de alongamento da hifa (k_{cves}), a velocidade de transporte de maltose (v), a concentração de maltose na fonte (G_{res}) e o tamanho da zona de produção de vesículas (λ). Os parâmetros K_g , K_v e k_{pves} foram testados porque não foram encontrados valores para esses parâmetros na literatura. Os outros parâmetros foram testados porque, embora houvesse dados na literatura para esses parâmetros, a faixa

de variação desses valores era muito grande, por exemplo, a velocidade de transporte de maltose pode variar de $5 \times 10^{-2} \mu\text{m s}^{-1}$ a $1 \times 10^3 \mu\text{m s}^{-1}$.

A porcentagem (P) foi usada para avaliar o efeito da variação dos parâmetros sobre L_{24} e foi calculada como sendo:

$$P = \frac{(L_{24\text{maior}} - L_{24\text{menor}})}{L_{24\text{maior}}} \cdot 100 \quad (4.9)$$

A influência dos parâmetros K_g , k_{pves} , λ , v_{ves} , K_v e k_{cves} , quando variados individualmente, teve pouco efeito sobre L_{24} (Tabela 4.2). O aumento de K_g ou diminuição de k_{pves} implica na diminuição da velocidade de produção de vesículas para uma concentração igual de maltose, no entanto, o efeito sobre L_{24} é pouco significativo. Uma explicação para isso é que, como existem muitos tanques produtores de vesículas, a diminuição da velocidade de produção de vesículas tem pouco efeito sobre o sistema como um todo. Outra explicação é que o que está limitando o crescimento é o fornecimento de nutrientes e não a produção de vesículas.

Tabela 4.2. Efeito da variação de K_g , k_{pves} , v_{ves} , K_v e k_{cves} sobre a variação da porcentagem de L_{24}

	Valor mínimo	Valor máximo	P
K_g	0,1	50	-15,3%
k_{pves}	500	2000	5,5%
v_{ves}	0,001	0,1	7,0%
K_v	1	10000	-3,0%
k_{cves}	0,001	0,1	11,0%
λ	10	60	14,8

Os parâmetros que têm maior influência sobre L_{24} são os que influenciam diretamente o fornecimento de maltose do tanque reserva para a hifa reprodutiva: G_{res} e v (figuras 4.8 e 4.9). Isso mostra que os parâmetros que mais influenciam o crescimento são aqueles responsáveis pelo fornecimento de maltose no sistema.

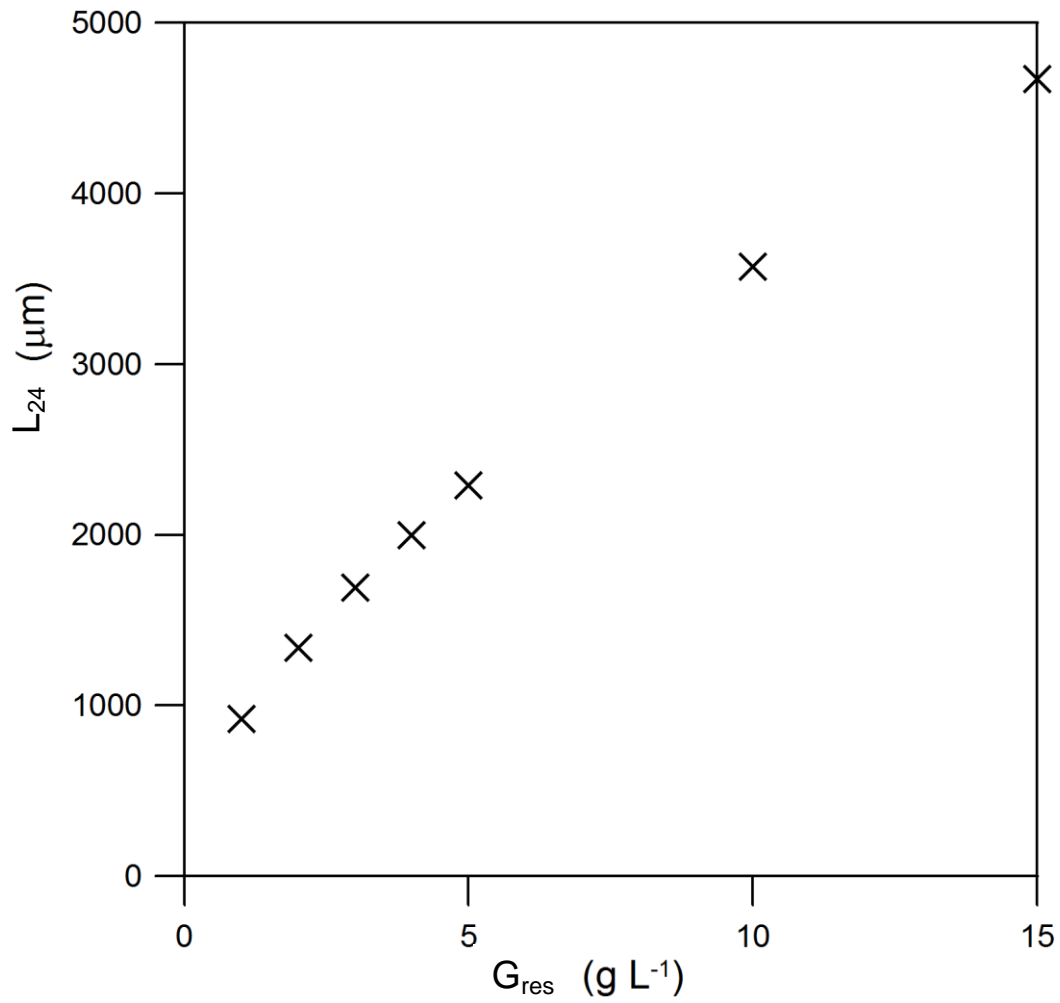


FIGURA 4.8. INFLUENCIA DE G_{RES} SOBRE O COMPRIMENTO DA HIFA ALCANÇADO EM 24 H DE SIMULAÇÃO (L_{24}).

FONTE: O autor

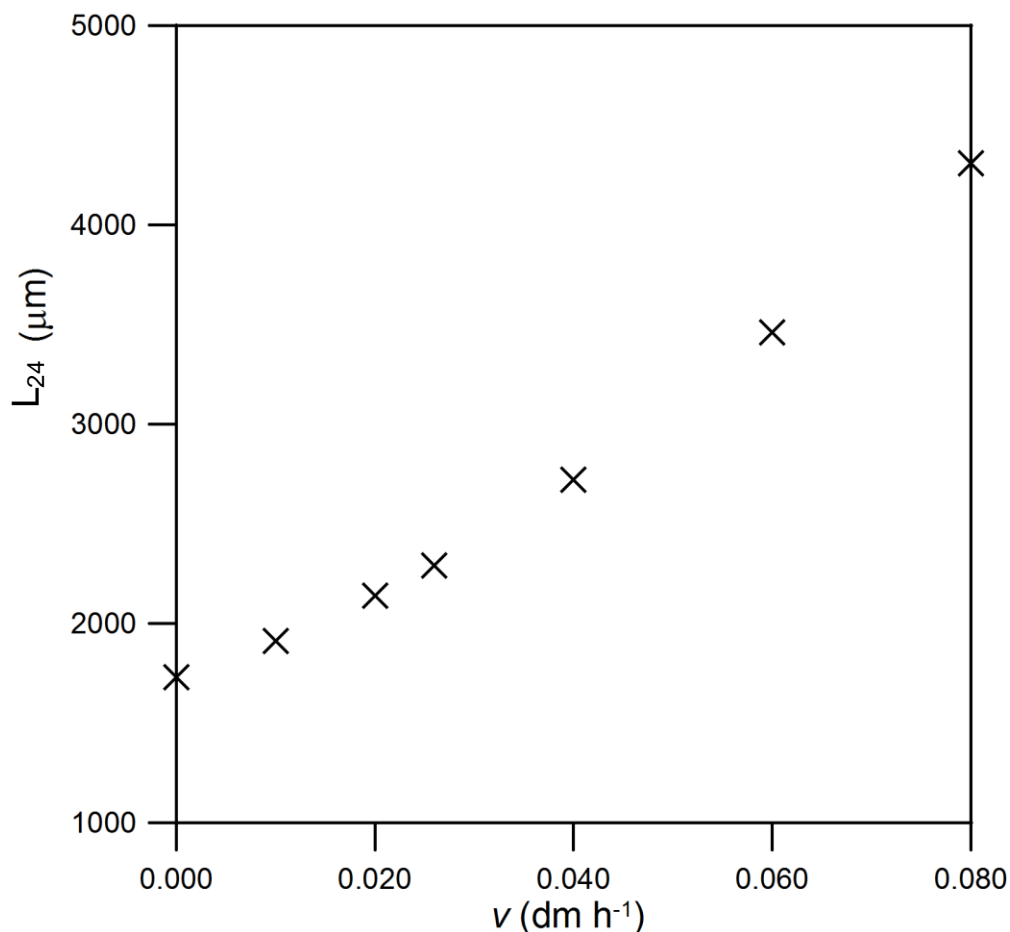


FIGURA 4.9. INFLUENCIA DE v SOBRE O COMPRIMENTO DA HIFA ALCANÇADO EM 24 H DE SIMULAÇÃO (L_{24}).

FONTE: O autor

4.6 DISCUSSÃO

O modelo apresentado é o primeiro modelo desenvolvido para hifas reprodutivas que incorpora a descrição do processo de produção e consumo de vesículas e o primeiro a reconhecer uma zona definida de produção de vesículas. Além disso, o modelo pode ser adaptado para descrever o crescimento de outros tipos de hifas e implementado a outros modelos a fim de obter um modelo completo para o crescimento do micélio. A análise paramétrica do modelo mostrou quais são os parâmetros mais importantes para uma futura determinação experimental, no caos a velocidade de convecção e a quantidade de maltose no “*foot-cell*”.

Essa discussão será dividida em cinco subseções: modelo híbrido completo, as inovações do modelo, possíveis extensões do modelo para descrição de outros tipos de hifas, limitações e possíveis melhoramentos do modelo para hifas reprodutivas e delineamento experimental para uma melhor validação do modelo.

4.6.1 Modelo híbrido completo

O modelo proposto nessa tese possui duas vantagens com relação ao modelo híbrido de Boswell et al. (2007), que é o melhor modelo híbrido já proposto na literatura. Primeiro, o modelo proposto é mais completo na descrição dos mecanismos de alongamento da hifa, descrevendo o transporte de substrato, a produção de vesículas e o consumo das vesículas na ponta, enquanto o modelo de Boswell et al. (2007) trata somente de um substrato genérico, sem descrever a produção, transporte e consumo de vesículas. Segundo, o modelo proposto por Boswell et al. (2007) descreve o alongamento da hifa através de equações de probabilidade que são funções da concentração do substrato interno. Porém o processo de alongamento não é estocástico, mas é determinístico e, logo, não é muito preciso descrever esse processo através de equações de probabilidade. No modelo proposto nesse trabalho o alongamento não é descrito com equações de probabilidade, mas com equações determinísticas que são mais coerentes do ponto de vista biológico. A grande limitação de um modelo estocástico é que processos que ocorrem em tempo relativamente pequeno (como a difusão e transporte de nutrientes) não podem ser descritos com precisão, porque nesse tipo de modelo a integração das equações ocorre em intervalo de tempo grande (escala de minutos) ao passo que muitos processos dentro da hifa ocorrem na escala de segundos.

4.6.2 Inovações do modelo

O modelo proposto nesse trabalho é o primeiro a descrever o comportamento e os mecanismos de crescimento de hifas reprodutivas. Apesar da importância deste tipo de hifa (responsável pela produção de esporos), a maioria dos modelos trata apenas das hifas vegetativas superficiais (TRINCI e PROSSER, 1979, BOSWELL et al. 2002, DAVIDSON, 1998, LÓPEZ-ISUNZA et al. 1997). O modelo de Coradin et al (2011) é o único que reconhece a presença da hifa reprodutiva, todavia, não considera os mecanismos internos de alongamento da hifa envolvidos no crescimento desse tipo de hifa.

O modelo desenvolvido neste trabalho inclui expressões para descrever os mecanismos de produção, transporte e consumo de vesículas, enquanto estes mecanismos são apenas parcialmente descritos na maioria dos modelos para hifas. Por exemplo, o modelo de Trinci e Prosser (1979) descreve o consumo e transporte de vesículas, mas não descreve a cinética de sua produção, partindo da suposição de que a produção de vesículas é constante em todo comprimento da hifa. Outros modelos se limitam a supor que o crescimento da hifa depende apenas da concentração da fonte de carbono na ponta da hifa (BOSWELL 2012, DAVIDSON, 1998, NOPHARATANA et al, 1998). Porém, o papel das vesículas é determinante no mecanismo de alongamento da hifa e nos processos de ramificação (PROSSER E TOUGH, 1991). A cinética de produção e consumo de vesículas foi incorporada no modelo de López-Izunza (1997), porém, as simulações do modelo não são condizentes com os resultados obtidos por Larralde-Corona (1996) para o crescimento do tubo germinativo. Esses resultados mostram um perfil sigmoide, como o que foi obtido pelo modelo deste trabalho.

Outro diferencial do presente modelo é a discretização do sistema na forma de tanques em série, enquanto a maioria dos modelos que descrevem os mecanismos internos de alongamento da hifa utiliza equações diferenciais parciais (EDPs) contínuas ao longo da hifa inteira (LÓPEZ-IZUNZA et al., 1997; DAVIDSON; 1998, BOSWELL et al., 2002). Ao utilizar a discretização em tanques, é possível atribuir mecanismos diferentes a grupos de tanques, como foi feito no presente trabalho, para descrever a ponta, a zona produtora e a

zona não produtora de vesículas. Também foi simples incorporar a mudança na fisiologia da hifa, por exemplo, a transformação de um tanque de um estado de “produtor de vesículas” para um estado de “não produtor de vesículas”. Seria muito mais complexo descrever estas variações temporais e espaciais em um modelo baseado em EDPs contínuas.

4.6.3 Extensão do modelo para descrever outros tipos de hifas

O modelo proposto pode servir de base para descrever outros tipos de hifa, como a hifa vegetativa superficial, a hifa vegetativa aérea e a hifa penetrante. Para fazer isto, as seguintes modificações seriam necessárias: (i) incorporação de regras para ramificação das hifas vegetativas e penetrantes; (ii) incorporar um balanço de massa para o substrato presente no meio sólido; (iii) alteração dos parâmetros do modelo para se ajustar à fisiologia destas hifas; (iv) incorporação de um balanço de massa para o O_2 no meio sólido, (v) incorporar o transporte de água para dentro das hifas penetrantes e superficiais.

Pode ser necessário modificar os balanços já desenvolvidos no presente trabalho ou até aumentar o número de balanços para determinados tanques. Por exemplo, seria necessário incluir, um balanço de O_2 para as hifas penetrantes, incluindo seu transporte e consumo intracelular e um termo no balanço de vesículas em hifas penetrantes que descreve o efeito de O_2 sobre a produção de vesículas.

Na extensão do modelo para descrever uma rede de hifas, será necessário descrever a hidrodinâmica do sistema, ou seja, o fluxo citoplasmático dentro da rede. Em um micélio completo, esse fluxo se distribui dentro da hifa como um sistema vascular aberto. O surgimento das ramificações faz com que esse fluxo citoplasmático se divida nos pontos de ramificação dentro da hifa, sendo necessário que o modelo tenha um balanço para o fluxo citoplasmático e uma forma de calcular como o fluxo se distribui nas ramificações e o efeito do surgimento de novas pontas no sistema. Um exemplo de uma abordagem não apropriada para descrever esse fenômeno é

o modelo proposto por Boswell et al. (2007) onde esse fluxo foi assumido como sendo constante, independente do número de ramificações que ocorrem no sistema e sem levar conta fenômenos de perda de carga.

4.6.4 Limitações e possíveis melhoramentos do modelo para hifas reprodutivas

O modelo desenvolvido no presente trabalho para descrever o alongamento de hifas reprodutivas tem três limitações relacionadas às simplificações feitas no seu desenvolvimento, como discutido abaixo.

Primeiro, a cinética de hidrólise de glicogênio não é descrita, assumindo-se que a concentração de maltose no tanque reserva é constante. Uma vez que a concentração de maltose neste tanque tem uma grande influência sobre a velocidade de alongamento da hifa, a descrição da cinética de quebra do glicogênio é fundamental para melhorar a flexibilidade do modelo para descrever outras situações experimentais, como a diferenciação celular. Isso envolveria a obtenção de dados experimentais que não estão disponíveis na literatura, como será discutido em seção 4.6.5.

Segundo, foi pressuposto que as vesículas que suportam o alongamento das hifas reprodutivas são produzidas somente na hifa reprodutiva. Na micrografia de Mims et al (1989), não existem vesículas na hifa vegetativa para o fungo *Aspergillus nidulans*, porém, existe a possibilidade de um comportamento diferente para outros fungos, visto que a hifa reprodutiva dessa espécie possui um comprimento menor do que a de outras espécies, cerca de 100 μm .

Terceiro, foi pressuposto que a produção de vesículas ocorre apenas nos 0,3 mm próximo à ponta da hifa. Em hifas vegetativas superficiais, é comum que a zona periférica de crescimento possua de 0,1 a 1 mm de comprimento (Trinci, 1971). Contudo, não existe um estudo detalhando em qual região se concentra a produção de vesículas em hifas reprodutivas. A micrografia de Mims et al. (1989) não auxilia neste caso, devido ao curto comprimento da hifa reprodutiva de *Aspergillus nidulans* (100 μm).

4.6.5 Delineamento dos experimentos necessários para a validação do modelo

As simulações feitas com o modelo proposto neste trabalho indicam a necessidade da obtenção de vários dados experimentais que não são disponíveis na literatura. Dessa para que se valide as hipóteses do modelo é necessário determinar experimentalmente:

1. A região produtora de vesículas.
2. Os parâmetros mais importantes para a validação do modelo são G_{res} e v . portanto, é necessário obter valores experimentais confiáveis para esses parâmetros. Um experimento importante que poderia ser conduzido seria a determinação da cinética de degradação do glicogênio. Uma forma de fazer isso seria de analisar a área ocupada pelos grânulos de glicogênio ao longo do tempo de cultivo do fungo.
3. Verificar se existe transporte de vesículas da hifa vegetativa para a reprodutiva e qual é o perfil de alongamento para hifas reprodutivas.
4. As cinéticas de formação e de consumo de vesículas também devem ser investigadas, a fim de confirmar se seguem a cinética de Michaelis-Menten.

Outro experimento importante mais complexo que poderia ser feito é determinar a velocidade do fluxo citoplasmático e distribuição de nutrientes dentro da hifa. Esta velocidade poderia ser medida utilizando um composto inerte e radioativo ou fluorescente no meio de cultura assimilado pelo fungo. Através de um aparelho de microscopia por ressonância magnética, poderia se determinar a concentração do composto (KÖCKENBERGER et al., 2004) ao longo do micélio caso o composto possua um núcleo detectável por RMN. No caso de uma sonda fluorescente, microscopia confocal poderia ser usada para determinar a concentração da sonda ao longo do micélio.

Embora a análise paramétrica tenha mostrado que os processos relacionados às vesículas tenham pouco efeito direto sobre o valor de L_{24} , a descrição dos fenômenos relacionados às vesículas é importante por duas

razões. Primeiro, as vesículas possuem um papel chave na determinação dos locais de ramificação do fungo (PROSSER E TRINCI, 1979). Segundo, o modelo proposto nesse trabalho descreve apenas uma hifa sem ramificação, o efeito das vesículas em um micélio ramificado e completo pode ser bem diferente do encontrado nas simulações deste sistema. Devido a presença de ramificações, a distribuição de vesículas dentro das hifas pode afetar a velocidade de alongamento, onde regiões com maior produção de vesículas alongariam com maior velocidade.

4.7 CONCLUSÃO

O modelo matemático proposto inclui a produção de vesículas a partir de maltose, o consumo de vesículas para o alongamento da hifa e o transporte de vesículas e maltose ao longo da hifa, de modo que este é o modelo mais completo para a descrição do alongamento de hifas reprodutivas. O modelo pode ser estendido para descrever outros tipos de hifa.

5 MODELO DE DISTRIBUIÇÕES DE PROBABILIDADES

O modelo matemático de tanques em série apresentado no capítulo anterior pode ser estendido para descrever hifas vegetativas superficiais, aéreas e penetrantes. Isto seria feito pela incorporação das equações deste modelo em um modelo tridimensional como o modelo de Coradin et al. (2011). O resultado seria um modelo híbrido capaz de descrever um micélio tridimensional, onde a velocidade de alongamento das hifas fosse função do fornecimento de vesículas às suas pontas. Porém, antes disto, é necessário desenvolver um sistema de regras sobre a ramificação e de escolha de direção de extensão que seja mais simples do que o sistema usado por Coradin et al. (2011), mas ainda capaz de prever o perfil de distribuição da biomassa obtida por Nopharatana et al. (2003).

O modelo com novas regras foi desenvolvido em duas etapas.

- (1) A equação da distribuição normal foi ajustada, por regressão não linear, aos dados de densidade como função da distância da superfície, tanto para hifas aéreas, quanto para hifas penetrantes. Conforme apropriado, foi pressuposto a presença de uma ou duas populações de hifas, cada população com uma distribuição normal. Esta análise é apresentada no capítulo 5.1.
- (2) Com base na ajuste das distribuições normais, foram desenvolvidos modelos, baseado numa analogia ao processo de difusão, para o movimento das hifas em relação à coordenada vertical. Foram desenvolvidos modelos com regras diferentes para as hifas aéreas (Capítulo 5.2) e para as hifas penetrantes (Capítulo 5.3).

5.1 AJUSTES DAS DISTRIBUIÇÕES ESTATÍSTICAS

O perfil de densidade de biomassa aérea como função de altura que foi obtido por Nopharatana et al (2003) para o crescimento de *Rhizopus oligosporus* em PDA tem um formato parecido com metade de uma distribuição

normal (veja Figura 2.18). Esta distribuição, quando aplicada a estes dados, é descrita pela equação:

$$\rho_x = \frac{k_n}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(h-\mu)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (5.1)$$

onde ρ_x é a densidade de biomassa, h é altura que a biomassa esta da superfície do sólido, μ é a média da densidade de biomassa (que também corresponde à altura que dá o pico da distribuição), K_n é o fator de escala e σ é o desvio padrão da densidade de biomassa em função da altura. Sendo que, nesse caso, essa equação vale apenas para h maior que zero.

A equação (5.1) se ajustou bem aos dados de Nopharatana et al. (2003) para 16 h (figura 5.1). Por outro lado, não ajustou bem aos dados de 40 h, principalmente no que diz respeito ao formato da curva na altura acima de 0,15 cm (figura 5.2). Os parâmetros de ajuste estão na tabela 5.1.

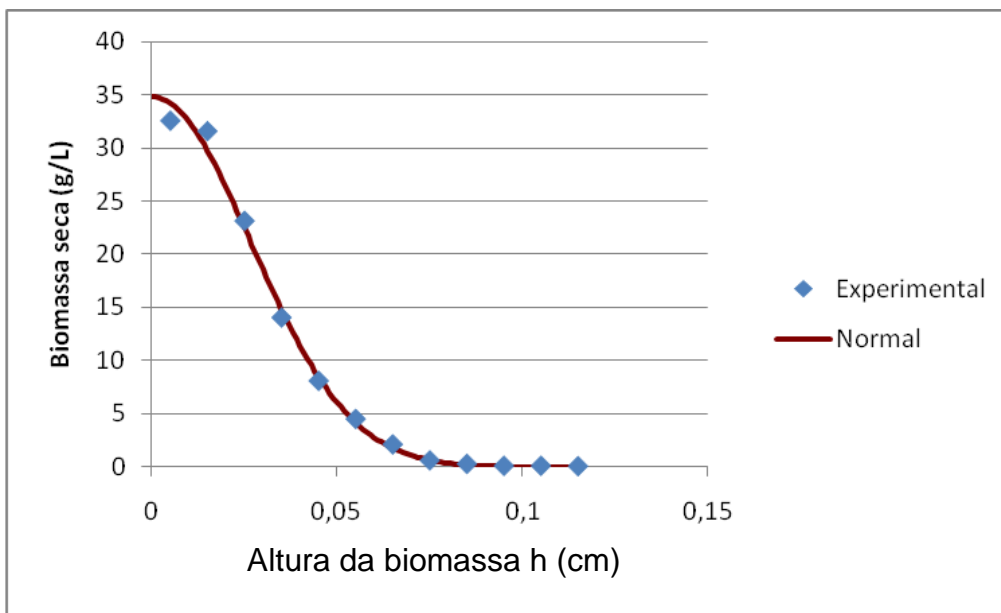


FIGURA 5.1. AJUSTE DA DISTRIBUIÇÃO NORMAL DA BIOMASSA AÉREA COM 16 HORAS AOS RESULTADOS DE NOPHARATANA ET AL (2003).

Pontos resultados experimentais e a linha o ajuste normal

FONTE: O autor

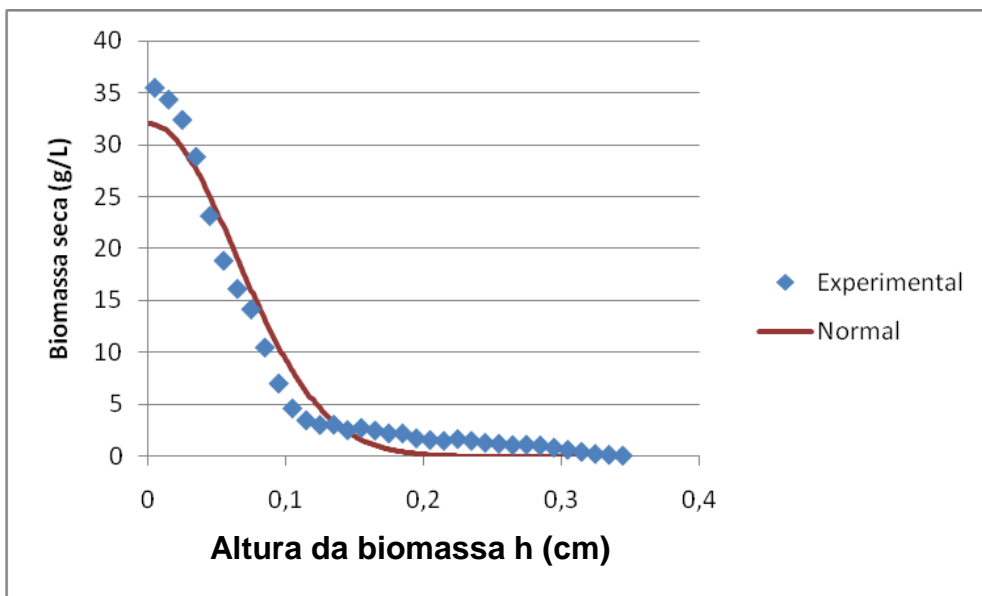


FIGURA 5.2. AJUSTE DA DISTRIBUIÇÃO NORMAL DA BIOMASSA AÉREA COM 40 HORAS AOS RESULTADOS DE NOPHARATANA ET AL (2003).

Pontos resultados experimentais e a linha o ajuste normal

FONTE: O autor

Tabela 5.1 Parametros do ajuste de distribuições

16 horas hifas aéreas	Parâmetros μ σ k	Dist. normal 0 0,026758286 14,25473936	
40 horas hifas aéreas	Parâmetros μ σ k	Dist. normal 0 0,063540239 20,27139828	
40 horas hifas aéreas duas populações	Parâmetros μ σ k	Dist. Normal veg. 0 0,049820682 19,8679336	Dist. Normal rep. 0,168295435 0,08299465 1,444305837
16 horas hifas penetrativas duas populações	Parâmetros μ σ k	Dist. Normal veg. 0,035 0,037414475 0,560590755	Dist. Normal desb. 0,144570313 0,097342066 0,25252865
40 horas hifas penetrativas duas populações	Parâmetros μ σ k	Dist. Normal veg. 0,045 0,04369658 1,199698563	Dist. Normal desb. 0,179892262 0,111768785 0,359162607

Como a distribuição normal não descreveu bem os resultados experimentais das hifas aéreas com 40 horas de cultivo, foi testada a hipótese levantada por Coradin et al (2011) de que existem duas populações de hifa (vegetativa e reprodutiva) na micrografia feita com 40 horas de cultivo. Neste caso, cada população teria sua própria distribuição da biomassa. Essa hipótese também foi testada para o caso das hifas penetrantes.

Como é mostrada nas figuras 5.3, 5.4 e 5.5, o ajuste de duas distribuições normais (duas distribuições normais na mesma equação, mas com picos diferentes) descreveu muito bem os resultados experimentais, tanto para hifas aéreas como penetrantes. As hifas aéreas foram divididas em duas populações, um de hifas vegetativas e um de hifas reprodutivas, sendo que as hifas reprodutivas surgem depois de 16 horas de cultivo. Com relação às hifas penetrantes, estas foram divididas em hifas vegetativas e hifas desbravadoras, sendo que nas hifas penetrantes é possível observar que essas duas populações surgem desde início do cultivo. O termo desbravadora foi adotado porque esse tipo de hifa parece alongar para dentro do sólido, como se fosse desbravando novas regiões. Essa divisão das hifas penetrantes foi feita com base nas micrografias de Nopharatana et al (2003). As hifas que se concentram mais próximas da superfície entre 0 e 0,15 cm de profundidade foram tratados como hifas penetrantes vegetativas. As hifas pouco ramificadas observadas em profundidades maiores que 0,15 cm foram tratados como hifas desbravadoras. Os parâmetros do ajuste estão na tabela 5.1.

A partir desses resultados, pode-se concluir que, para descrever a distribuição da biomassa no espaço (sobre a superfície do sólido ou dentro do sólido), é necessário reconhecer duas populações. Essa análise suporta a hipótese de que as hifas reprodutivas e desbravadoras possui um padrão de ramificação diferente das hifas vegetativas das micrografias de Nopharatana et al (2003). A partir destas informações, pode-se então propor modelos estocásticos para tentar descrever o comportamento das hifas aéreas e das hifas penetrantes.

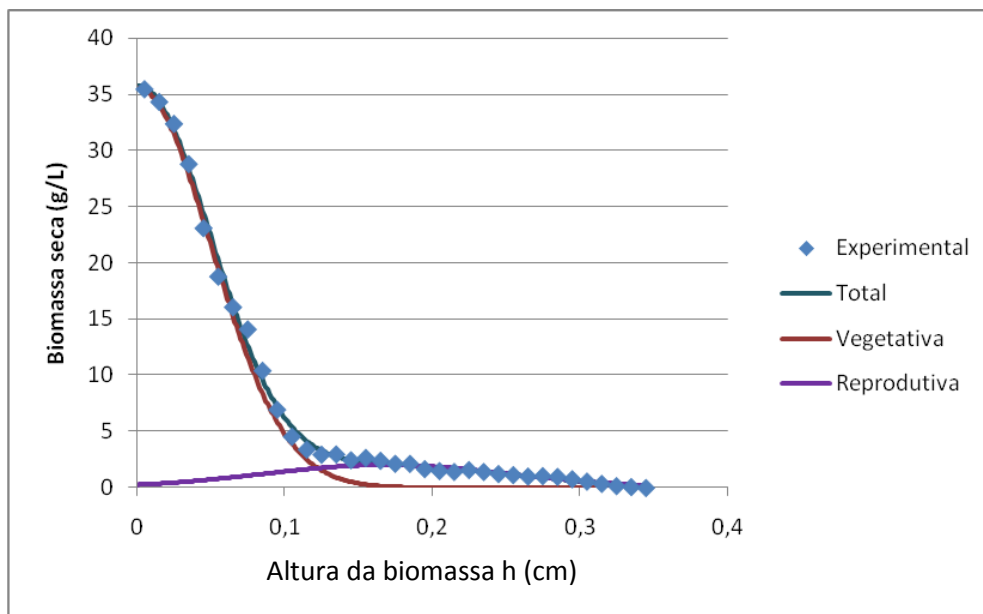


FIGURA 5.3. GRÁFICO DE AJUSTE DA DISTRIBUIÇÃO NORMAL COM DUAS POPULAÇÕES DA HIFA AÉREA 40 HORAS DE CULTIVO.

Pontos dados experimentais e as linhas são os ajustes das distribuições normais

FONTE: O autor

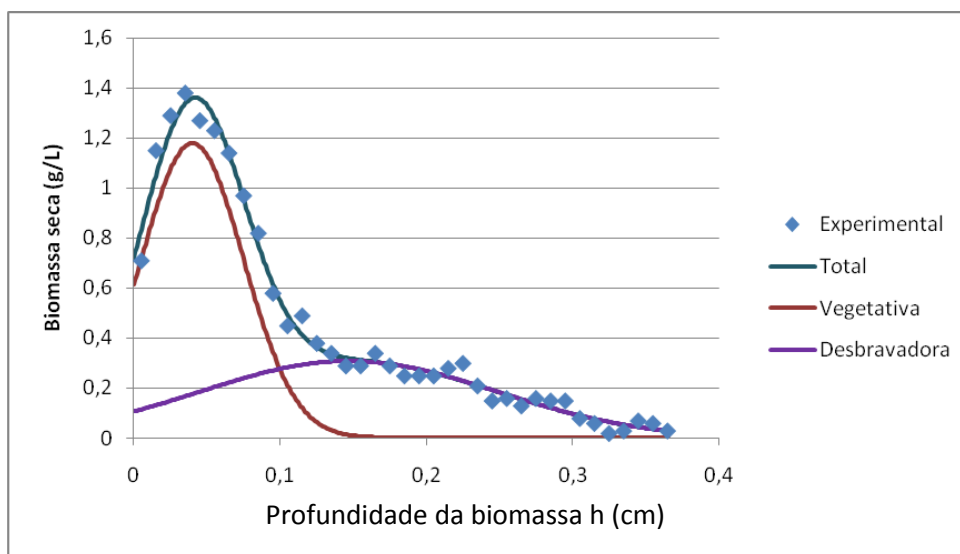


FIGURA 5.4. GRÁFICO DE AJUSTE DA DISTRIBUIÇÃO NORMAL COM DUAS POPULAÇÕES DA HIFA PENETRANTES 16 HORAS DE CULTIVO.

Pontos dados experimentais e as linhas são os ajustes das distribuições normais

FONTE: O autor

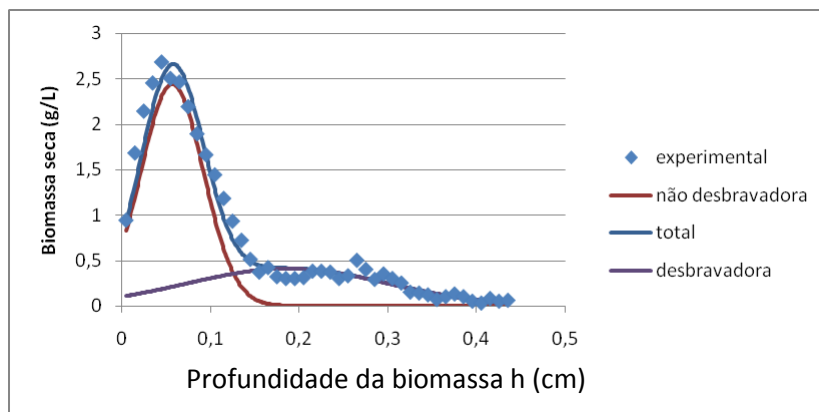


FIGURA 5.5 GRÁFICO DE AJUSTE DA DISTRIBUIÇÃO NORMAL COM DUAS POPULAÇÕES DA HIFA PENETRANTES 40 HORAS DE CULTIVO.

Pontos dados experimentais e as linhas são os ajustes das distribuições normais
 FONTE: O autor

5.2 MODELO MATEMÁTICO PARA DESCRIÇÃO DO ALONGAMENTO E RAMIFICAÇÃO DA HIFA AÉREA

Com as informações obtidas dos ajustes das distribuições, é possível construir um modelo matemático semelhante ao de Coradin et al. (2011), mas com regras mais simples. Para simplificar a modelagem, optou-se por não descrever o sistema como foi feito por Coradin et al. (2011), que utilizou uma malha tridimensional com quadrados de 10 μm de aresta. Ao invés disso, foi usado um sistema unidimensional, em que o espaço foi dividido em camadas de 140 μm de altura, de forma que os segmentos de hifas pudessem se alongar em retângulos de 140 μm de comprimento por 10 μm de largura através dessas camadas. Como mostra a figura 5.6, um segmento de hifa pode alongar dentro de uma camada, atravessar camadas e aumentar o número de hifas devido a ramificação. A densidade biomassa em função da altura é calculada com base nos segmentos que pertencem a cada camada.

No alongamento de hifas, a camada na qual será adicionado o novo segmento depende da posição do segmento de hifa ativa no início da iteração e da direção do crescimento. Se o segmento está na base de camada i (i.e. imediatamente acima da divisão com a camada inferior) no início da iteração e

o alongamento é para cima (Figura 5.6-A) ou para o lado (Figura 5.6-B), o novo segmento é atribuído à camada i . Se o segmento ponta está na base da camada i , mas o alongamento ocorre para baixo (Figura 5.6-C), então, o segmento é atribuído à camada $i-1$. Se a ponta está na camada i na posição vertical e com o sentido para cima (i.e. imediatamente abaixo da divisão com a camada superior) e o alongamento ocorre na vertical com o sentido para cima (Figura 5.6-D) ou para o lado (Figura 5.6-E), o segmento é atribuído à camada $i+1$. Se a ponta está na camada i na posição vertical e com o sentido para cima, mas o crescimento ocorre na vertical com o sentido para baixo, o segmento é atribuído a camada i (Figura 5.6-F).

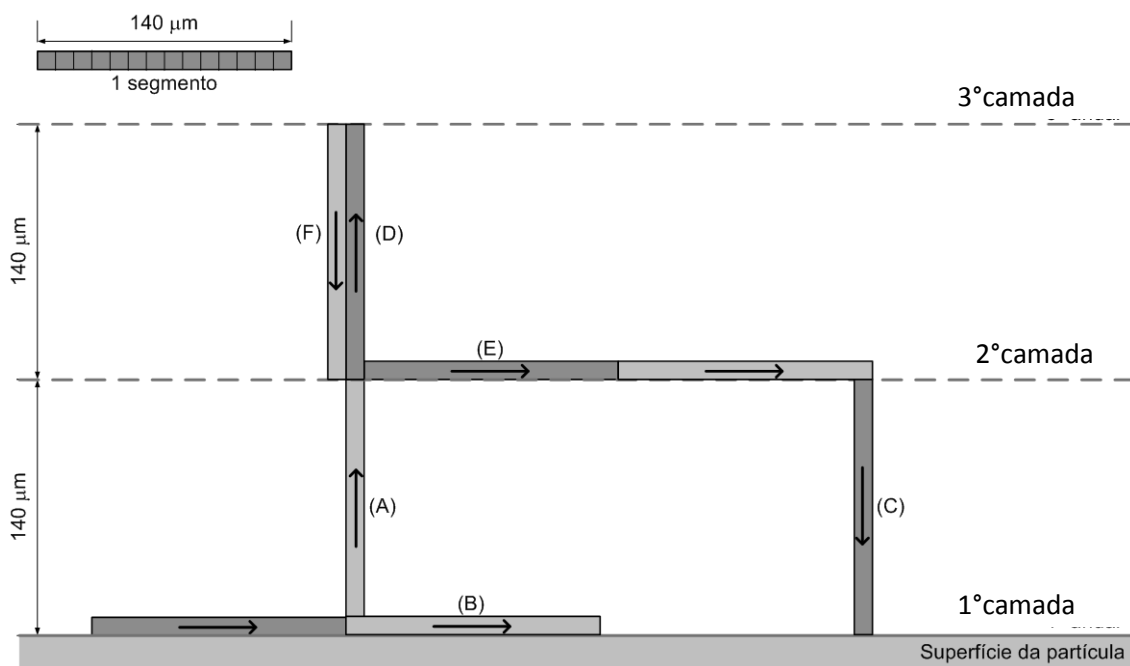


FIGURA 5.6. DESCRIÇÃO DO SISTEMA EM CAMADAS

Fonte: O autor

O programa de simulação consiste em um conjunto de regras que são aplicadas iterativamente. Em cada iteração cada segmento de hifa ativo pode ramificar, alongar ou parar de alongar. Um fluxograma das iterações é mostrado na figura 5.7. No início da simulação, o sistema é semeado regularmente com 400 esporos, que possuem uma probabilidade de germinar de 50%. Cada esporo que germinar se torna um segmento de hifa no formato de um retângulo com $140\ \mu\text{m}$ de comprimento e cresce sobre a superfície sólida, como mostra a figura 5.6 (A). Após esse primeiro alongamento, cada segmento passa por um processo de checagem, onde o segmento pode continuar alongando ou parar através da seguinte equação:

$$P_{par} = \left(\frac{C_{xn}}{C_{xmax}} \right)^2 \quad (5.2)$$

onde P_{par} é a probabilidade de que o alongamento pare, C_{xn} é a concentração de biomassa na camada onde o segmento de hifa está atualmente localizado e C_{xmax} é a concentração máxima de biomassa por camada, ou seja, é o número máximo de segmentos que cada camada pode suportar. Essa equação tem por objetivo prever o fenômeno de parada do crescimento devido ao impedimento estérico (AURIA et al., 1995). Esta equação está elevada ao quadrado porque para que a hifa pare de alongar deve haver o encontro de dois segmentos. Se o segmento passa pelo teste sem parada, esse segmento então ramifica apicalmente, formando dois novos segmentos retangulares de 140 μm . A direção que cada segmento novo pode tomar depende da posição onde está o segmento paterno. Se este segmento está sobre a superfície sólida (como é o caso do início da simulação) os segmentos gerados têm 50% de chance de continuar sob a superfície sólida e 50% de chance de alongarem para cima. Caso o segmento paterno esteja em outro lugar no espaço (a partir da 2ª iteração), os segmentos gerados vão ter chance iguais de alongar na direção vertical para cima, vertical para baixo ou horizontal.

Após o alongamento dos segmentos gerados, é feita uma nova checagem através da equação 5.2: avalia-se quais são os segmentos que vão parar ou vão continuar ativos. Os segmentos que continuarem ativos vão ramificar e, portanto, geram dois novos segmentos ativos que vão alongar. O ciclo se repete, a cada iteração. A duração de uma iteração é de 2,1 horas (parâmetro de ajuste do modelo), que equivale a uma velocidade de alongamento da hifa de 67 $\mu\text{m h}^{-1}$, compatível com os valores obtidos experimentalmente (TRINCI, 1971).

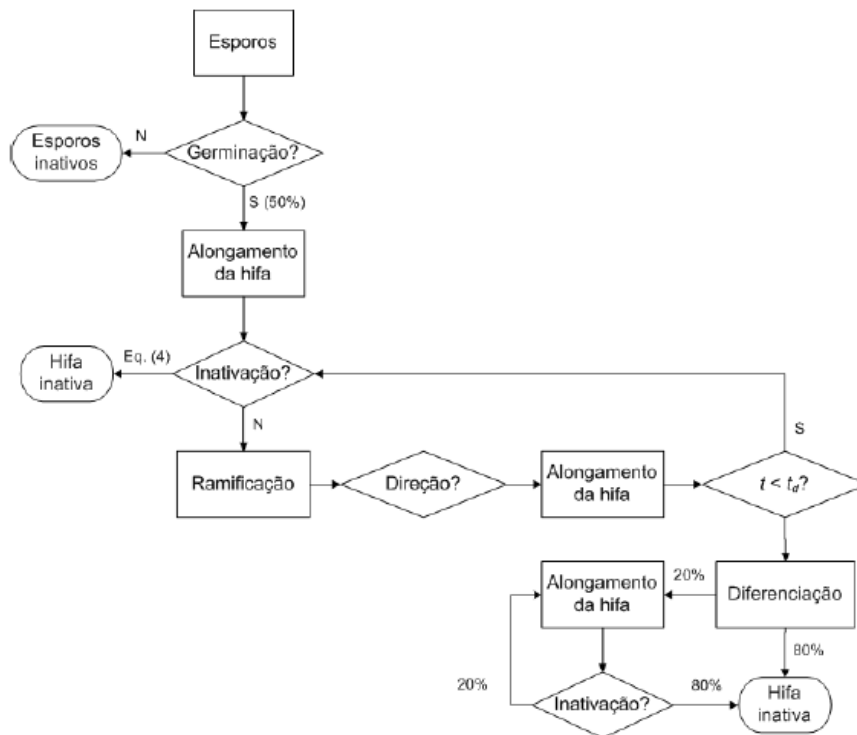


FIGURA 5.7: FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS ADOTADOS NO MODELO DISCRETO PARA DESCREVER AS HIFAS AÉREAS.

FONTE: O autor

A distribuição simétrica das possibilidades de direção foi baseada no ajuste da curva normal da biomassa vegetativa, pois se a distribuição da biomassa no espaço pode ser descrita como sendo normal, ela pode ser descrita como se fosse sendo análoga uma difusão clássica unidimensional. Um soluto difundindo unidirecionalmente a partir de um ponto central tem a probabilidade de avançar 50% e de regredir 50%, segundo a teoria do “random-walk” (CODLING et al., 2008). Este comportamento leva a formação de uma distribuição gaussiana da concentração, com o pico da curva localizado no ponto central.

Após 9 interações, que equivale a 19 horas de cultivo, as regras do modelo mudam. Assumiu-se que o crescimento das hifas vegetativas pára e ocorre a diferenciação das hifas vegetativas em reprodutivas e, então, o alongamento das hifas reprodutivas. As regras a diferenciação e para o alongamento das hifas reprodutivas seguem a seguinte ordem:

1. Só 20% dos segmentos ativos (segmentos onde a ponta está alongando e não inativada) das hifas vegetativas se transformam em segmentos ativos reprodutivos, sendo que este é um parâmetro de ajuste do modelo;
2. Os segmentos ativos reprodutivos alongam verticalmente para cima com 140 μm de comprimento;
3. Em cada iteração subsequente, o número de segmentos ativos reprodutivos por camada decai, segundo a seguinte equação:

$$N_{i+1} = N_i - k.N_i \quad (5.3)$$

onde N_i é o número de segmentos reprodutivos provenientes do camada inferior, k é constante de desativação das hifas reprodutivas e N_{i+1} é o número de segmentos reprodutivos ativos da camada superior;

4. Etapas 2 e 3 são repetidas
5. A simulação é finalizada quando um ou mais segmentos atingirem o camada 35

O valor da constante k é igual a 0,2 e isso é uma variável de ajuste do modelo.

5.2.1 Resultados e discussão das simulações do modelo das hifas aéreas

Os resultados experimentais utilizados para o ajuste do modelo foram obtidos com a equação do ajuste das distribuições normais por interpolação. O ajuste do modelo foi bastante preciso na descrição dos resultados experimentais interpolados (figuras 5.8 e 5.9), principalmente da hifa aérea com 16 horas de cultivo. Isso indica que as hifas vegetativas aéreas se movem pelo espaço em um processo análogo de difusão, que pode ser descrita a partir da teoria do “random-walk”. Já com relação à descrição dos resultados para as hifas reprodutivas e vegetativas com 40 horas de cultivo (figura 5.9), o modelo não foi tão preciso quanto foi a simulação com 16 horas. O modelo prevê a formação de um patamar de densidade espacial de biomassa nas alturas entre 0 e 0,028 cm, algo não observado nos resultados experimentais interpolados, e

a queda na concentração de biomassa é mais brusca que os dados experimentais interpolados no modelo entre 0,042 cm e 0,112 cm. Uma das formas de evitar esse patamar seria fazer com $C_{X_{max}}$ variasse em função da altura, mas isso seria uma regra muito artificial sem uma base experimental. Outra alternativa, seria modificar porcentagem de hifas reprodutivas em função da altura, ou seja, a porcentagem de 15% de hifas vegetativas ativas que se tornam reprodutivas poderia variar em função da altura, o que poderia amenizar a queda brusca. Porém isso também seria artificial porque não existe fundamentação experimental. Apesar disso, as simulações do modelo foram melhores que os resultados obtidos por Coradin et al. (2011), o que mostra que com regras mais simples e embasadas nos ajustes das distribuições foram mais eficazes para descrever o sistema. Essas discrepâncias entre o modelo e os resultados experimentais sugerem que as regras de alongamento das hifas reprodutivas precisam ser melhor estudadas e aperfeiçoadas experimentalmente.

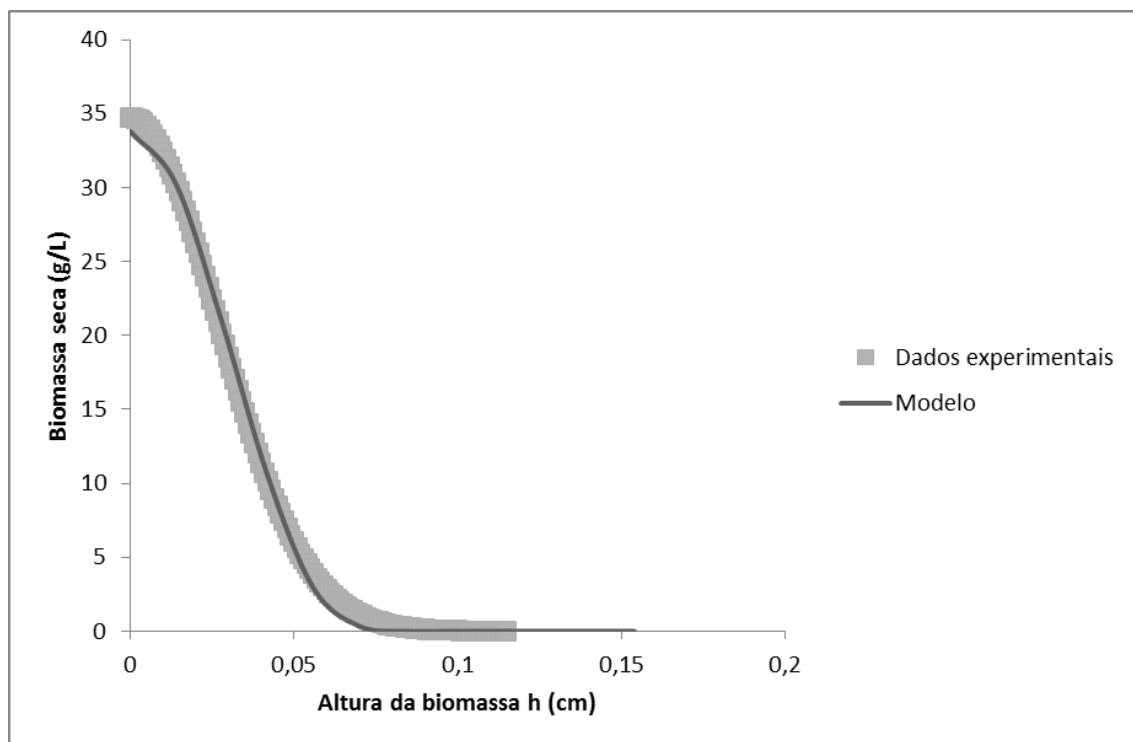


FIGURA 5.8. COMPARAÇÃO DA SIMULAÇÃO DO MODELO COM RESULTADOS EXPERIMENTAIS INTERPOLADOS DA HIFA AÉREA COM 16 HORAS DE CULTIVO.

FONTE: O autor

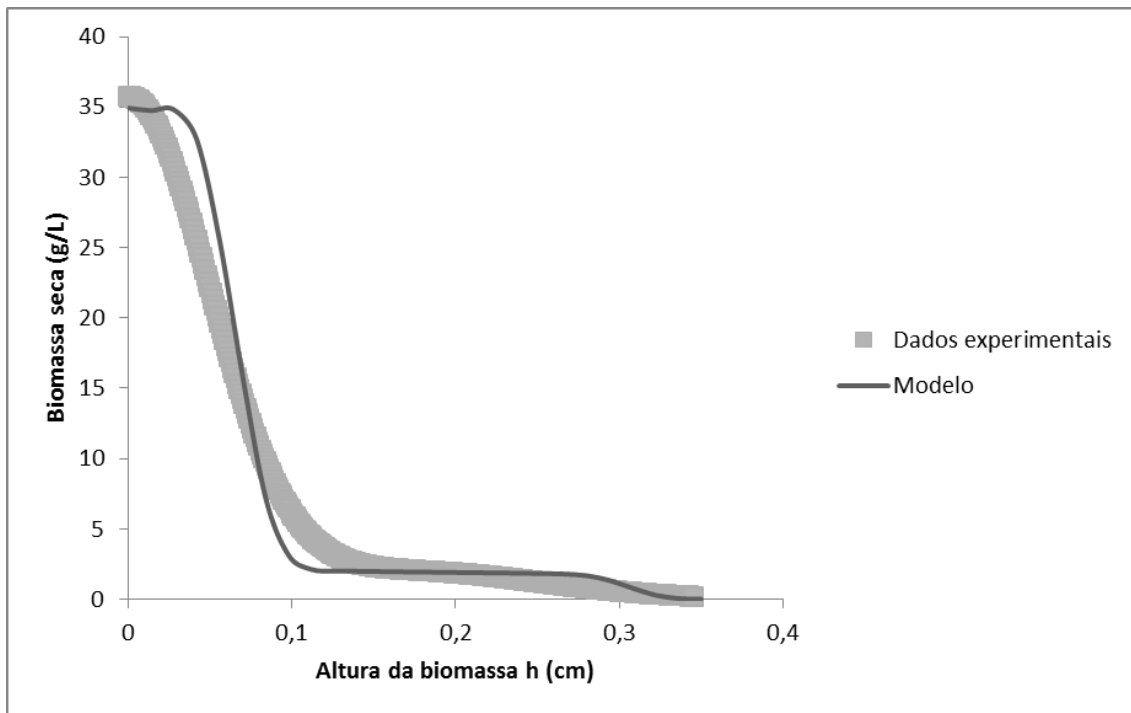


FIGURA 5.9. COMPARAÇÃO DA SIMULAÇÃO DO MODELO COM RESULTADOS EXPERIMENTAIS INTERPOLADOS DA HIFA AÉREA COM 40 HORAS DE CULTIVO.

FONTE: O autor

5.3 MODELO MATEMÁTICO PARA HIFAS PENETRANTES

As regras para o modelo de hifas penetrantes foram baseadas em dados de microscopia e fisiologia. Na figura 5.10, pode ser observada a micrografia de Nopharatana et al (2003), onde as setas indicam que as hifas penetrantes têm uma tendência de alongarem para baixo com ângulos relativamente pequenos, o que serviu de base no modelo para supor que todas as hifas penetrantes alongam para baixo na vertical. Foi pressuposto a existência de duas populações de hifas penetrantes, com base nos ajustes de duas distribuições normais que foram feitos nas figuras 5.4 e 5.5, em conjunção com as micrografias de Nopharatana et al. (2003) que são reproduzidas na figura 5.10. Foi definido um tipo de população, que foi chamada de penetrante

vegetativa que possui uma limitação na sua capacidade de penetrar no sólido. O motivo dessa limitação é que a concentração de oxigênio no sólido se esgota com 2,45 mm de profundidade (Rahardjo et al, 2002). Dessa forma, assumiu-se que acima de 2,45 mm esta hifa não pode alongar. O segundo tipo de população, que foi chamada de hifa desbravadora, esse tipo de hifa penetra mais fundo no substrato sólido. A presença desse tipo de hifa pode ser inferida através da micrografia produzida por Nopharatana et al (2003) (figura 5.10), onde é possível observar um tipo de hifa mais longa (setas amarelas). Com base nas micrografias da figura 5.10, foi pressuposto que novas hifas penetrantes vegetativas brotam das hifas vegetativas superficiais durante o cultivo: a quantidade de segmentos de hifa oriundos da hifa vegetativa superficial é muito maior na micrografia com 64 horas de cultivo (círculos vermelhos) (Figura 5.10) do que com 16 h de cultivo (Figura 5.10). O sistema também foi dividido em camadas como no modelo anterior.

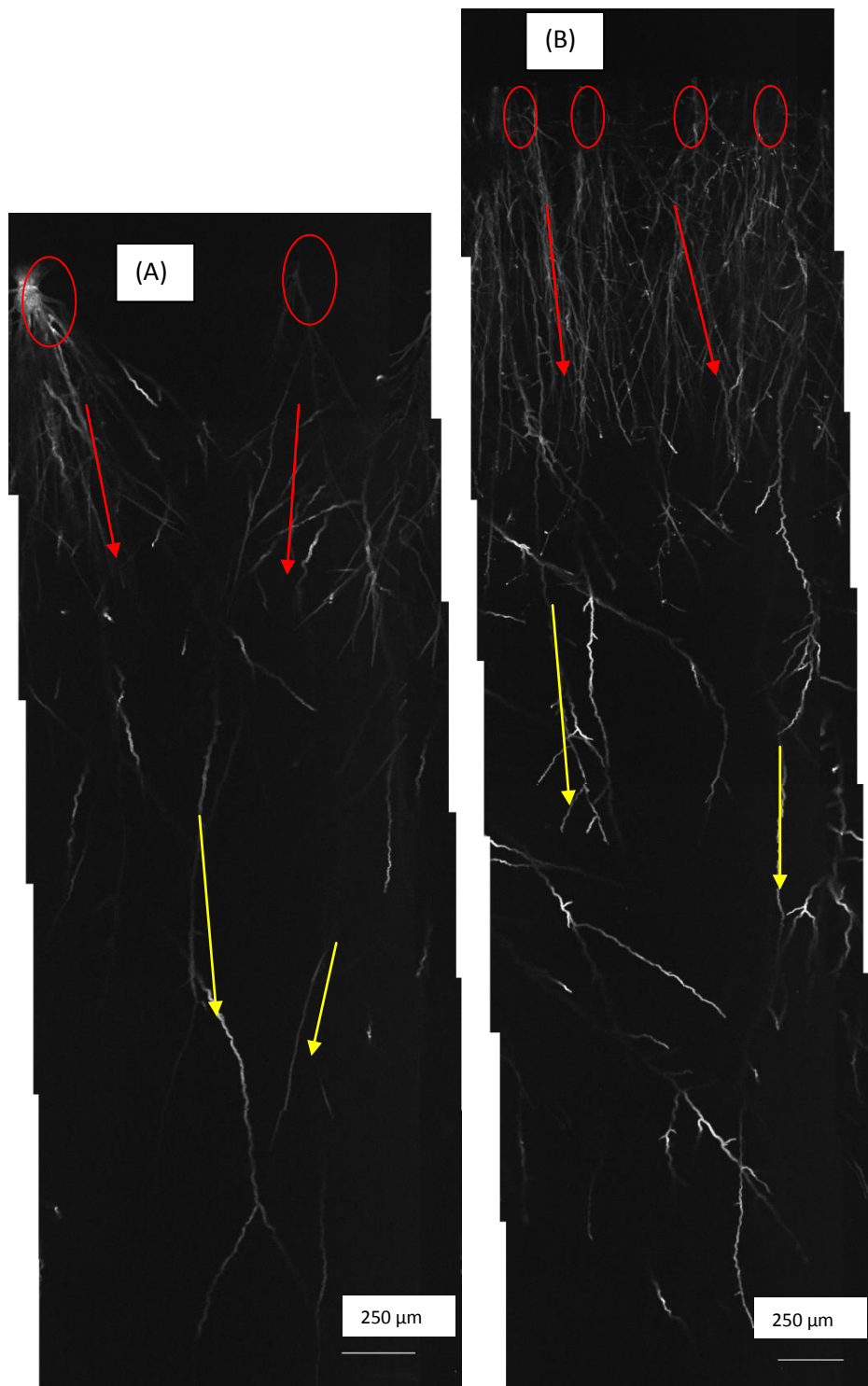


FIGURA 5.10. MICROGRAFIAS DE NOPHARATANA ET AL (2003) DAS HIFAS PENETRANTES CRESCENDO EM PDA COM 16 (A) E 64 HORAS (B) DE CULTIVO.

As setas vermelhas mostram o sentido de alongamento das hifas vegetativas e as setas amarelas o sentido das hifas desbravadoras. O círculos vermelhos mostram os brotos.

FONTE: NOPHARATANA et al. (2003)

A partir desses pressupostos e simplificações, as regras de crescimento da hifa são:

1. No início da simulação, brotam 100 pontas de segmentos supostamente a partir do conjunto de hifas vegetativas que estão na superfície sólida do meio de cultura (não descritas neste modelo), essas hifas alongam uma camada.
2. Os segmentos vegetativos podem parar de alongar, segundo a seguinte equação:

$$P_{parada} = \left(\frac{h}{h_{max}} \right)^n \quad (5.3)$$

onde P_{parada} é a probabilidade dos segmentos pararem de alongar, h é profundidade que o segmento penetrou, n (2) é um fator de ajuste da parada e h_{max} (4,9mm) é a profundidade máxima que a hifa vegetativa pode atingir.

3. Se os segmentos não pararem na checagem anterior, checa-se se os segmentos novos vão ser vegetativos ou desbravadores, segundo uma probabilidade de 5% de se tornarem segmentos de hifa desbravadores.
4. Os segmentos novos alongam verticalmente para baixo.
5. As etapas 2, 3 e 4 são repetidas até atingir 16 horas de simulação
6. Adiciona-se 100 novos segmentos de hifa que brotam da hifa sob a superfície sólida,
7. Repete-se a etapa 2, 3 e 4 até atingir 40 horas de simulação

5.3.1 Resultados e discussão do modelo de hifas penetrantes

As simulações do modelo descreveram bem os resultados experimentais (figura 5.18 e 5.19). O modelo foi capaz de descrever o comportamento da biomassa total, tanto com 16 horas quanto com 40 horas.

Este é primeiro modelo na literatura que descreve o comportamento da hifa penetrante com duas populações de hifas diferentes.

Porém, esse modelo tem a limitação de possuir alguns parâmetros que não foram medidos experimentalmente, e que tiveram que ser usados como parâmetros de ajuste do modelo. Como, por exemplo, a porcentagem de formação das hifas desbravadoras e o número de segmentos de hifa que brotam no início e com 16 horas de simulação. Apesar disso, o número de parâmetros a ser ajustados é menor que no modelo de Coradin et al (2011) (seção 2.2.1.4).

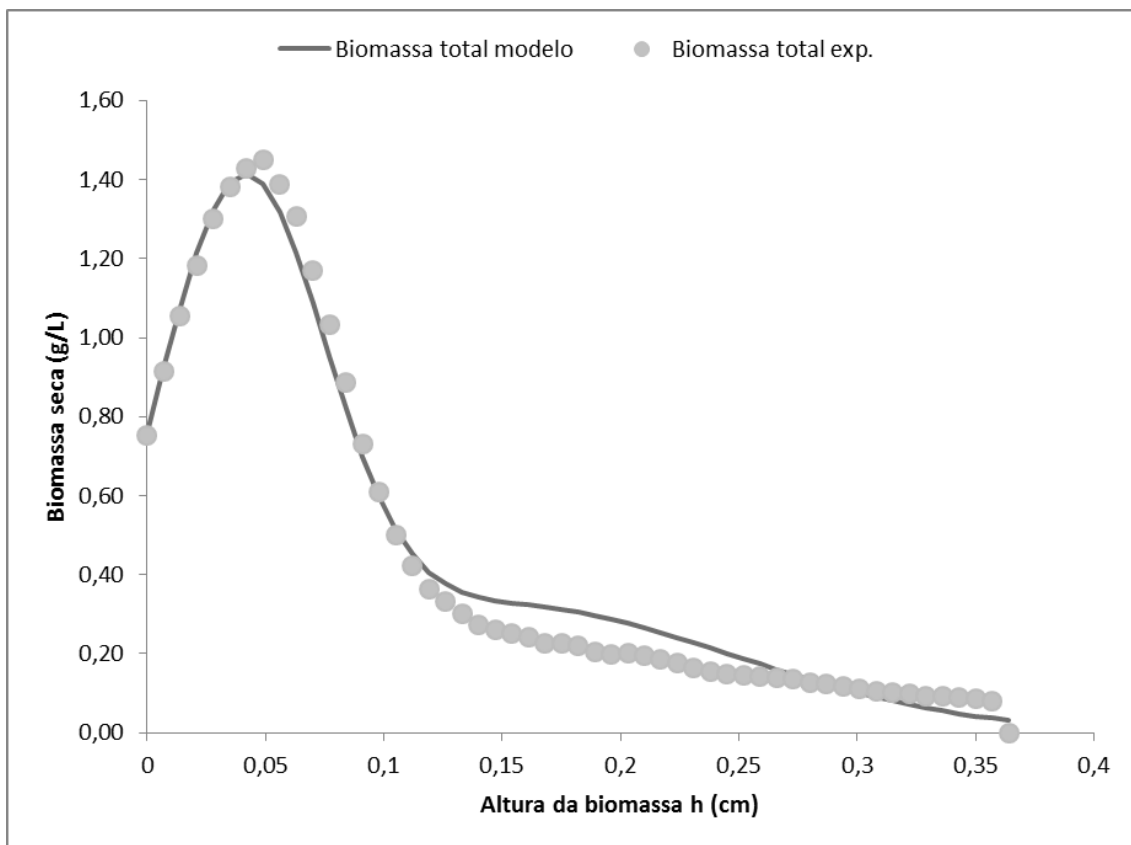


FIGURA 5.18. COMPARAÇÃO DA SIMULAÇÃO DO MODELO COM RESULTADOS EXPERIMENTAIS INTERPOLADOS DA HIFA PENETRANTE COM 16 HORAS DE CULTIVO.

FONTE: O autor

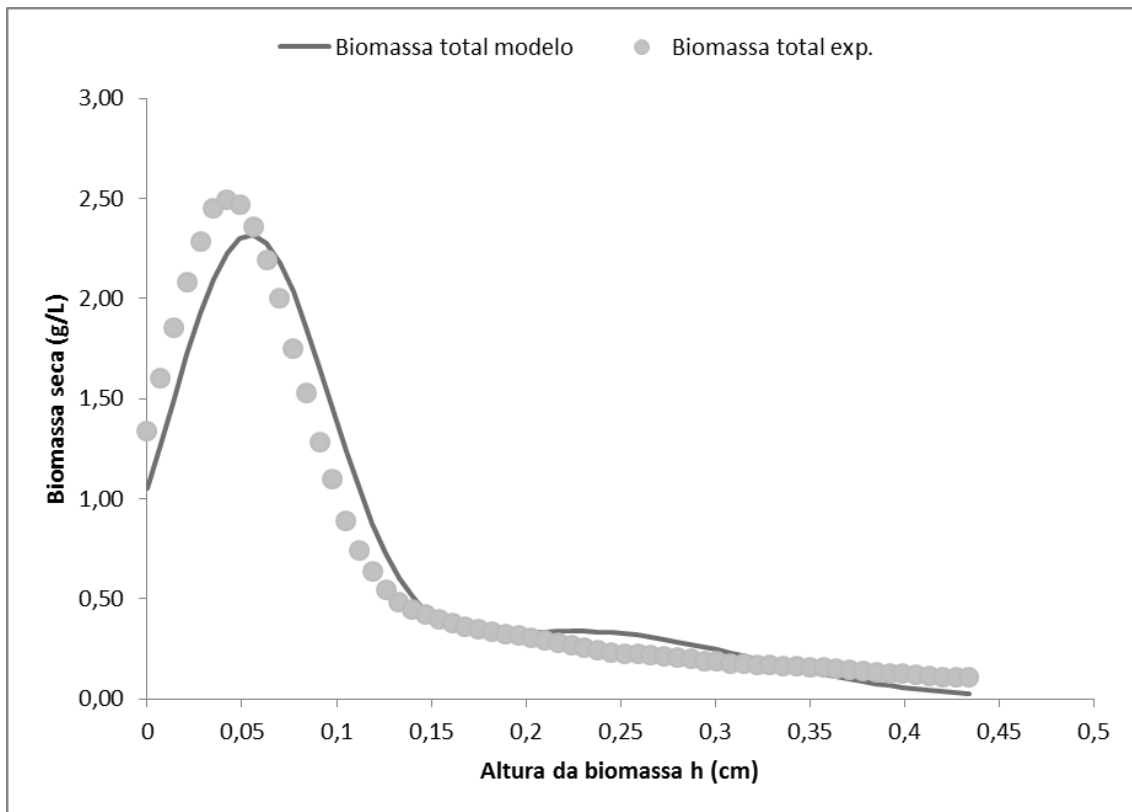


FIGURA 5.19 COMPARAÇÃO DA SIMULAÇÃO DO MODELO COM RESULTADOS EXPERIMENTAIS INTERPOLADOS DA HIFA PENETRANTE COM 40 HORAS DE CULTIVO.

FONTE: O autor

5.4 CONCLUSÕES GERAIS SOBRE OS MODELOS DE DISTRIBUIÇÃO DE PROBABILIDADES

Os modelos propostos para hifas aéreas e penetrantes também pode ser fundidos com o modelo proposto no capítulo anterior desta tese e, dessa forma, o alongamento do micélio como um todo pode ser descrito em função da concentração de substratos e vesículas. Contudo, também será necessário fazer um balanço de massa para o oxigênio no meio extracelular e dentro da hifa para que o modelo possa ser fundido, porque o oxigênio limita o crescimento da hifa penetrante (Rahardjo et al., 2002).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho concluiu duas etapas necessárias para obtenção de um modelo matemático completo para o crescimento microscópico de fungos filamentosos sobre superfícies sólidas. Na primeira etapa, o modelo foi capaz de simular o crescimento de uma hifa reprodutiva, um tipo de hifa ainda não descrito na literatura através de modelos matemáticos. Na segunda etapa, foram desenvolvidos modelos com regras estocásticas para descrever o perfil de densidade de biomassa em função da altura para as hifas aéreas e penetrantes. Estes modelos obtiveram parte de suas regras de ramificação e alongamento da hifa a partir de ajuste de distribuições estatísticas. Os modelos gerados foram capazes de descrever muito bem os resultados experimentais de Nopharatana et al (2003), tanto para as hifas aéreas, quanto para as hifas penetrantes. Com relação às hifas penetrantes, este é o primeiro modelo matemático proposto que descreve esse tipo de hifa.

Como sugestão para trabalhos futuros a próxima etapa seria a fusão do modelo fenomenológico com o modelo estocástico com regras de ramificação. A fusão de ambos os modelos pode resultar em um modelo mais completo que descreverá um número maior de fenômenos que os modelos propostos hoje na literatura. Além disso, para uma melhor validação do modelo fenomenológico serão necessários dados experimentais sobre a produção e consumo de vesículas das hifas de fungos filamentosos.

Referências

- AURIA, R. Influence of growth and high mould concentration on the pressure drop in solid state fermentations. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 751-756, 1995.
- BEREPIKI, A.; LICHIOUS, A.; READ, N. D. Actin organization and dynamics in filamentous fungi. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 876–87, 2011.
- BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 11–8, 2009.
- BOSWELL, G.P.; JACOBS, H.; DAVIDSON, F.A.; GADD, G.M.; RITZ, K. Functional consequences of nutrient translocation in mycelial fungi. **Journal of Theoretical Biology**, v. 217(4), p. 459-477, 2002.
- BOSWELL, G. P.; JACOBS, H.; DAVIDSON, F. A; GADD, G. M.; RITZ, K. Growth and function of fungal mycelia in heterogeneous environments. **Bulletin of mathematical biology**, v. 65, n. 3, p. 447–77, 2003.
- BOSWELL, G.P.; JACOBS; H., RITZ K.; GADD, G.M; DAVIDSON, F.A. The development of fungal networks in complex environments. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 69(2), p. 605-634, 2007.
- BOSWELL, G. P. Modelling combat strategies in fungal mycelia. **Journal of theoretical biology**, v. 304, p. 226–34, 2012.
- BULL, A.T.; TRINCI, A.P.J. The physiology and metabolic control of fungal growth. **Advances in Microbial Physiology**, v. 15, p. 1-84, 1977.
- CAIRNEY, J.W.G. Basidiomycete mycelia in forest soils: dimensions, dynamics and roles in nutrient distribution. **Mycological Research**, v. 109, p. 7-20, 2005.
- CHATER, K. F.; BIRÓ, S.; LEE, K. J.; PALMER, T.; SCHREMPF, H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 2, p. 171–98, 2010.
- CODLING, E. A; PLANK, M. J.; BENHAMOU, S. Random walk models in biology. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 5, n. 25, p. 813–34, 2008.
- CORADIN, J. H., **Modelagem matemática do crescimento de fungos filamentosos sobre superfícies úmidas e nutritivas em contato com o ar**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2010.
- CORADIN, J. H.; BRAUN, A.; VICCINI, G.; et al. A three-dimensional discrete lattice-based system for modeling the growth of aerial hyphae of filamentous

fungi on solid surfaces: A tool for investigating micro-scale phenomena in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, n. 3, p. 164–171, 2011.

COWAN, M. C.; LEWIS, B. G.; THAIN, J. F. Uptake of potassium by the developing sporangiophore of *Phycomyces blakesleeanus*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 58, n. 1, p. 113–126, 1972.

DAVIDSON, F.A. Modelling the qualitative response of fungal mycelia to heterogeneous environments. **Journal of Theoretical Biology**, v. 195, p. 281–291, 1998.

DAVIDSON, F.A.; OLSSON, S. Translocation induced outgrowth of fungi in nutrient free environments. **Journal of Theoretical Biology**, v. 205, p. 73–84, 2000.

DAVIDSON, F.A.; SLEEMAN, B.D.; RAYNER, A.D.; CRAWFORD, J.W.; RITZ, K. Context-dependent macroscopic patterns in growing and interacting mycelia networks. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 263, p. 873–880, 1996.

DYSON, P.; *Streptomyces: Molecular Biology Biotechnology*, Horizon Scientific Press, Norfolk, 2011.

EDELSTEIN, L. The propagation of fungal colonies: a model for tissue growth. **Journal of Theoretical Biology**, v. 98, p. 679–701, 1982.

EDELSTEIN, L.; SEGEL, L.A. Growth and metabolism in mycelial fungi. **Journal of Theoretical Biology**, v. 104, p. 187–210, 1983.

GARRET S. D., *Soil fungi and soil fertility*. Pergamon Press. 1963

GERVAIS, P.; ABADIE, C.; MOLIN, P. Fungal turgor pressure is directly involved in the hyphal growth rate. **Microbiological Research**, v. 154, n. 1, p. 81–87, 1999.

HARRIS, S.D. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. **Mycologia**, v. 100, p. 823–832, 2008.

HAYDUK, W.; LAUDIE, H. Prediction of diffusion coefficients for non-electrolytes in dilute aqueous solutions. **AIChE Journal**, v. 20, p. 611–615, 1974.

JENNINGS, D.H. *The physiology of fungal nutrition*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

KANG, D. K.; LI, X. M.; OCHI, K.; HORINOUCHE, S. Possible involvement of cAMP in aerial mycelium formation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 145 (Pt 5, p. 1161–72, 1999.

KNUDSEN, G. R.; STACK, J. P.; SCHUHMANN, S. O.; ORR, K.; LAPAGLIA, C. Individual-based approach to modeling hyphal growth of a biocontrol fungus in soil. **Phytopathology**, v. 96, n. 10, p. 1108–15, 2006.

Claudia Patricia Larralde-Corona CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS, tese, 1996

KÖCKENBERGER, W.; PANFILIS, C. DE; SANTORO, D.; DAHIYA, P.; RAWSTHORNE, S. High resolution NMR microscopy of plants and fungi. **Journal of microscopy**, v. 214, n. Pt 2, p. 182–9, 2004.

LÓPEZ-ISUNZA, F.; LARRALDE-CORONA, C.P.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Mass transfer and growth kinetics in filamentous fungi. **Chemical Engineering Science**, v. 52, p. 2629-2639, 1997.

LU, J.-P.; LIU, X.-H.; FENG, X.-X.; MIN, H.; LIN, F.-C. An autophagy gene, MgATG5, is required for cell differentiation and pathogenesis in *Magnaporthe oryzae*. **Current genetics**, v. 55, n. 4, p. 461–73, 2009.

MEDWID, R.D.; GRANT, D.W. Germination of *Rhizopus oligosporus* sporangiospores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48(6), p. 1067-1071, 1984.

MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A.; TIMBERLAKE, W. E. Ultrastructural Analysis of Conidiophore Development in the Fungus *Aspergillus nidulans* Using Freeze-Substitution. **Protoplasma**, v. 144, p. 132–141, 1988.

MITCHELL, D.A.; von MEIEN, O.F.; KRIEGER, N.; DALSENTER, F.D.H.A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, p. 15-26, 2004.

NIELSEN, J. Modelling the growth of filamentous fungi. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 46, p. 188-223, 1992.

NIELSEN, J. Modelling the morphology of filamentous microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 14(11), p. 438-443, 1996.

NOPHARATANA, M.; HOWES, T.; MITCHELL, D.A. Modelling fungal growth on surfaces. **Biotechnology Techniques**, v. 12(4), p. 313-318, 1998.

NOPHARATANA, M.; MITCHELL, D. A; HOWES, T. Use of confocal scanning laser microscopy to measure the concentrations of aerial and penetrative hyphae during growth of *Rhizopus oligosporus* on a solid surface. **Biotechnology and bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 71–7, 2003.

OLSSON, S.; JENNINGS, D.H. Evidence for diffusion being the mechanism of translocation in the hyphae of three molds. **Experimental Mycology**, v. 15, p. 302- 309, 1991.

PERSSON, C.; OLSSON, S.; JANSSON, H.B. Growth of *Arthrobotrys superba* from birch wood food base into soil determined by radioactive tracing. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, p. 47-51, 2000.

PETZOLD, L.R.; BRENNAN, K.E.; CAMPBELL, S.L; Numerical solution of initial-value problems in differential-algebraic equations, Elsevier, New York, 1989,

PROSSER, J.I.; TOUGH, A.J. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 10(4), p. 253- 274, 1991.

PROSSER, J. I.; TRINCI, A P. A model for hyphal growth and branching. **Journal of general microbiology**, v. 111, n. 1, p. 153–64, 1979.

REGALADO, C. M.; SLEEMAN, B. D.; RITZ, K. Aggregation and collapse of fungal wall vesicles in hyphal tips: a model for the origin of the Spitzenkörper. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 352, n. 1364, p. 1963–1974, 1997.

RAHARDJO, Y. S. P.; WEBER, F. J.; COMTE, E. P. LE; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system. **Biotechnology and bioengineering**, v. 78, n. 5, p. 539–44, 2002.

REYNAGA-PEÑA, C.; GIERZ, G.; BARTNICKI-GACIA, S. Analysis of the role of the Spitzenkörper in fungal morphogenesis by computer simulation of apical branching in *Aspergillus niger*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 9096-9101, 1997.

RIQUELME, M.; BARTNICKI-GARCIA, S. Key differences between lateral and apical branching in hyphae of *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 842-851, 2004.

STEELE, G.C.; TRINCI, A.P.J. Morphology and growth kinetics of hyphae of differentiated and undifferentiated mycelia of *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, v. 91, p. 362-368, 1975.

TINDEMANS, S.H.; KERN, N.; MULDER, B.M. The diffusive vesicle supply center model for tip growth in fungal hyphae. **Journal of Theoretical Biology**, v. 238, p. 937-948, 2006.

TRINCI, A.P.J. Kinetics of apical and lateral branching in *Aspergillus nidulans* and *Geotrichum lactis*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 17- 28, 1970.

TRINCI, A.P.J. Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial

growth rate of fungal colonies on solid media. **Journal of General Microbiology**, v. 67, p. 325-344, 1971.

TRINCI, A.P.J. A study of the kinetics of hyphae extension and branch initiation of fungal mycelia. **Journal of General Microbiology**, v. 81, p. 225-236, 1974.

YANG, H.; KING, R.; REICHL, U.; GILLES, E. D. Mathematical model for apical growth, septation, and branching of mycelial microorganisms. **Biotechnology and bioengineering**, v. 39, n. 1, p. 49–58, 1992.

WAINWRIGHT, M. Metabolic diversity of fungi in relation to growth and mineral cycling in soil — A review. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 90, n. 2, p. 159–170, 1988.