



## APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA FLUORESCENTE 2D COMO FERRAMENTAL PARA MONITORAMENTO ON-LINE DE BIOPROCESSOS

Cassiano Ranzan<sup>1</sup>, Luciane F. Trierweiler<sup>1</sup>, Bernd Hitzmann<sup>2</sup>, Jorge O. Trierweiler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GIMSCOP – Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos  
Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,

E-MAIL: {cassiano, luciane, jorge}@enq.ufrgs.br

<sup>2</sup> Institut für Lebensmittel Wissenschaft und Biotechnologie

Universität Hohenheim – Stuttgart – Alemanha

E-MAIL: Bernd.Hitzmann@uni-hohenheim.de

---

**Resumo:** A ascensão de processos biotecnológicos vem motivando continuamente a busca por novas técnicas de incremento produtivo e otimização destes. Análogo à processos químicos, a otimização de bioprocessos está intimamente associada à aplicação de técnicas de controle, entretanto, bioprocessos são característicos por apresentarem alta dificuldade na caracterização dos estados do sistema. Este trabalho tem por objetivo avaliar a possibilidade de aplicação da técnica de espectroscopia fluorescente 2D (EF2D) como ferramenta para a caracterização de estados, além de apresentar uma nova metodologia de seleção de pares Excitação/Emissão para o desenvolvimento de biossensores. Neste trabalho é feita o estudo da caracterização de um processo fermentativo de glicose com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, através da utilização de modelos quimiométricos, propostos e ajustados com sucesso, mostrando a viabilidade da utilização da técnica de EF2D na caracterização de processos, sendo os conjuntos de pares (Ex290/Em330, Ex270/Em330 e Ex410/Em590), (Ex270/Em310 ExALL/Em350 e Ex470/Em570) e (Ex290/Em330 Ex390/Em490 e Ex270/Em390) os mais indicados para mensurar, respectivamente, glicose, biomassa e etanol em processos fermentativos de glicose para a produção de etanol.

**Palavras-chave:** bioprocessos, espectro fluorescência 2D, caracterização, biossensores.

---

### 1. Introdução

Processos biotecnológicos vêm assumindo cada vez mais espaço em relação a processos químicos industriais. Analogamente a processos químicos, o incremento produtivo de bioprocessos está associado com o controle destes. Do ponto de vista operacional, o controle de processos implica na necessidade de caracterização dos estados do sistema. O grande problema associado a bioprocessos encontra-se justamente nesta caracterização (RANZAN *et al.*, 2011(a)).

Historicamente, o caminho mais eficaz para a obtenção de incremento produtivo, em uma planta de bioprocessos, estava associado à evolução das cepas utilizadas nos processos fermentativos (AYNSLEY *et al.*, 1993). Entretanto, os últimos anos revelam significantes avanços na área de supervisão e controle, pelo fato de possibilitar reduções nos custos de produção, incremento na conversão das reações, além de manter a qualidade do produto desejado (YAMUNA e RAMACHANDRA, 1999).

Em processos químicos ou bioquímicos certas propriedades são de difícil medição, seja pelos custos proibitivos de analisadores em linha ou pela inexistência de

técnicas de determinação *on line* (DIEHL *et al.*, 2009). Assim torna-se comum quantificar as variáveis chave de bioprocessos através de análises laboratoriais ou cromatográficas acarretando um elevado atraso de tempo para a realimentação, podendo limitar consideravelmente o desempenho alcançável. Isto porque os controladores requerem uma realimentação mínima de informações do processo. Para minimizar esse problema de realimentação deve ser considerado principalmente o desenvolvimento de biossensores, a melhora nos sistemas de amostragem e a utilização de técnicas de estimação *on-line* (RANZAN, 2010).

A fim de obtermos maior produtividade, qualidade de produtos constante, assim como otimização e controle de processos biotecnológicos, o monitoramento em tempo real dos parâmetros chave da fermentação (biomassa, substrato e produtos) se faz necessário (SURREBAS *et al.*, 2006). Além destas, a demanda por técnicas de monitoramento rápidas de processo favorecem a obtenção de melhores modelos de processo, melhor controle de alimentação, desenvolvimento de operadores independentes de processo robustos, padronizados e transferíveis, dentre outros parâmetros (WHITFORD & JULIEN, 2007).

Diversos artigos de revisão vêm sendo publicados acerca deste assunto, que demonstram a vasta quantidade de técnicas que têm sido aplicadas para este fim (RHEE *et al.*, 2004; SCHÜGERL, 2001; MULCHANDANI & BASSI, 1995).

O natural desenvolvimento de sensores fluorométricos e suas vantagens intrínsecas como medidas não invasivas, alta especificidade e sensibilidade da técnica tem possibilitado a aplicação destes no monitoramento de processos biotecnológicos (SKIBSTED *et al.*, 2001).

Inicialmente, sensores *on-line* baseados em espectroscopia fluorescente eram baseados unicamente em um comprimento de onda de excitação e emissão, o que limitava a medida à apenas um fluoróforo, fornecendo informação limitada acerca do processo mensurado (ZABRISKIE & HUMPHREY, 1978). Com o desenvolvimento de sensores de fluorescência multi-comprimento de onda, passou a ser possível o acompanhamento de diversos fluoróforos simultaneamente, como triptofano, vitaminas (piridoxina, riboflavina) e coenzimas (NADH), além de outros, através da espectroscopia fluorescente bidimensional (2D) (LI & HUMPHREY, 1991; LINDEMANN *et al.*, 1998; MAROSE *et al.*, 1998). É importante salientar, que não é toda informação coletada pelo espectrofluorômetro multi comprimento de onda, que apresenta relevância para aplicações biológicas e modelos quimiométricos podem ser utilizados para determinar a relação entre os dados de fluorescência e as variáveis de processo (BOEHL *et al.*, 2003). Dentre as técnicas de modelagem quimiométrica usualmente empregadas no tratamento de dados, podemos citar as técnicas de mínimos quadrados parciais (*Partial Least Square*, PLS) (HAGERDON *et al.*, 2003), regressão de componentes principais (*Principal Component Regression*, PCR) (CHRISTENSEN *et al.*, 1999; SOLLE *et al.*, 2003) e redes neurais (*Neural Network*) (WOLF *et al.*, 2001).

A utilização da técnica de espectroscopia fluorescente 2D como ferramenta de monitoramento *in line* ainda encontra-se em fase de estudos. Diversos trabalhos têm sido publicados buscando aplicações desta técnica no monitoramento de bioprocessos (KARA *et al.*, 2010; SURRIBAS *et al.*, 2006; GANZLIN *et al.*, 2007). Nosso objetivo principal é avaliar a viabilidade desta técnica no monitoramento *on-line* de processos fermentativos para produção de etanol, utilizando a levedura *S. cerevisiae*, ajustando modelos quimiométricos para a predição dos estados deste sistema, através da seleção de pares restritos de comprimentos de onda de excitação/emissão.

O desenvolvimento de uma metodologia robusta que permita a avaliação e combinação de pares de comprimento de onda distintos, para o ajuste de modelos quimiométricos, é de grande necessidade, uma vez que a quantidade de informações fornecidas pelo espectrofluorômetro é demasiadamente elevada. O principal objetivo no desenvolvimento desta metodologia é possibilitar a proposta de sensores em baixa escala, com alta aplicabilidade no setor industrial de bioprocessos.

Como objetos de estudos deste trabalho, são utilizados dados reais de processos fermentativos de glicose com a levedura *Sccharomyces cerevisiae*.

## 2. Materiais e Métodos

Sensores de fluorescência são instrumentos que utilizam cabos de fibras óticas para conduzir feixes de luz, do equipamento até ao meio reacional e vice-versa, interfaceados através do vidro de escotilhas de reatores. Assim sendo, trata-se de um método de medida *in situ*, não-invasivo e em tempo real (HANTELMANN *et al.*, 2006; SCHEPER *et al.*, 1999).

A espectroscopia de fluorescência, também conhecida como espectrofluorometria, analisa a fluorescência de uma amostra como resultado de um processo emissão/re-emissão de luz de baixa energia, normalmente luz no comprimento do ultravioleta. O princípio dos espectrofluorômetros se baseia na re-emissão de luz com mudança espectral, que algumas espécies químicas sofrem. A luz re-emitida é proporcional a concentração de espécies químicas do meio analisado e possui comprimento de onda igual ou superior ao de emissão, caracterizando a geração de um espectro diagonal inferior. (SOLLE *et al.*, 2003; HITZMANN *et al.*, 1998).

Os dados experimentais utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo professor B. Hitzmann, do Institut für Technische Chemie, University of Hannover e utilizados no trabalho de SOLLE *et al.* (2003). Nos experimentos realizados foi utilizada a levedura *S. cerevisiae* H620, crescendo em biorreator de 1,5 L à temperatura constante de 30 °C e pH 5,5 pela utilização de suplemento de meio Schatzmann com glicose. Durante o cultivo o espectro fluorescente foi coletado a cada 6 minutos pelo BioView-espectrômetro (Delta Light & Optics, Dinamarca) como descrito por STÄRK *et al.* (2002). Cada espectro é constituído de 150 pares de comprimento de onda de excitação/emissão, composto como segue: 15 filtros na região de 270 à 550 nm para excitação e 15 filtros na região de 310 à 590 nm para emissão com largura de banda de 20 nm cada e coletado equidistante 20 nm.

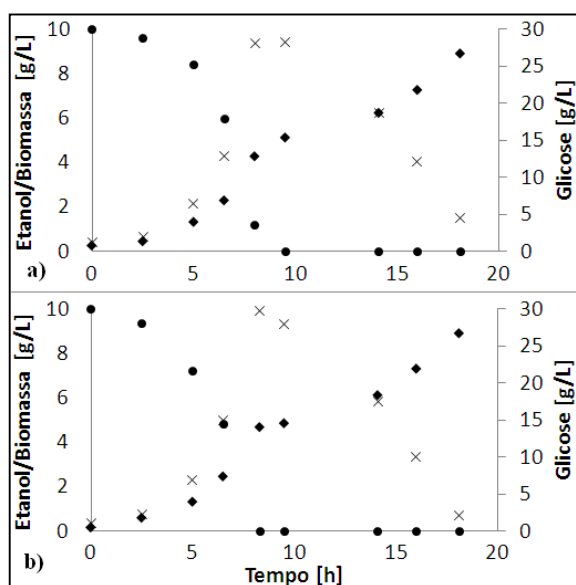
No decorrer de um único cultivo, 201 espectros são coletados, desta forma, 30150 pontos individuais são avaliados no decorrer do processo. O software do espectrômetro BioView fornece os resultados em arquivos do tipo ASCII. Neste trabalho, os dados foram importados e processados no software MATLAB (Ver. 5.3.0.10183 R11, The Math-Works, Inc., Netick, USA).

Paralelamente à coleta de dados *on-line* por espectroscopia fluorescente, os cultivos foram caracterizados de forma *off-line* por análise cromatográfica líquida de alto desempenho (HPLC), de forma a possibilitar o acompanhar a evolução das concentrações de glicose, etanol e biomassa no decorrer dos processos fermentativos, sendo estes dados utilizados nos procedimentos de ajuste e validação. A Figura 1 apresenta a caracterização *off-line* obtida para os dois ensaios fermentativos avaliados.

Devido à baixa quantidade de informações *off-line* disponíveis, foi feito uso de ferramentas de simulação dinâmica de processos, a partir de modelo dinâmico proposto e ajustado para representar os ensaios fermentativos em questão. Desta forma, foram simulados dados de caracterização *off-line* para os dois ensaios fermentativos, com amostragem equivalente a aquela utilizada na coleta de dados de espectroscopia fluorescente 2D, gerando desta forma, um conjunto maior de

informações a serem utilizadas no processo de ajuste de modelos quimiométricos.

Os dados *off-line* simulados são utilizados como padrões, no lugar dos dados obtidos por cromatografia líquida de alto desempenho, para todos os procedimentos nos quais a utilização de dados *off-line* dos ensaios fermentativos se fazem necessários neste trabalho. Descrições detalhadas da estrutura de modelo utilizada, parâmetros ajustados e metodologia empregada na simulação dos ensaios fermentativos podem ser obtidos em RANZAN *et al.*, 2011(b).



**Figura 1:** Caracterização *off-line* dos estados fermentativos (a) ensaio fermentativo 1 e (b) ensaio fermentativo 2. (x) Etanol, (●) Glicose e (◆) Biomassa.

### 3. Resultados e Discussões

Durante a realização dos ensaios fermentativos 1 e 2, foram coletados, em intervalos de seis minutos, leituras de espectro fluorescência 2D. Cada experimento teve duração de aproximadamente 20 horas, o que implica na coleta de aproximadamente 190 espectros por ensaio. Os dados são dispostos em tabelas onde as colunas fazem referência ao par comprimento de onda emissão/excitação, e as linhas dizem respeito ao ensaio amostral avaliado.

Devido à alta correlação apresentada pelos elementos contidos no espectro, é necessário promover um pré-tratamento destes dados de forma a permitir uma avaliação geral das informações contidas. Neste trabalho foi feito uso da técnica de PCA (Principal Component Analysis), obtendo desta forma o número de componentes principais da matriz de fluorescência deste sistema fermentativo. PCA é uma técnica linear de redução de dimensionalidade, eficaz em termos de capturar a variabilidade dos dados (FACCHIN, 2005).

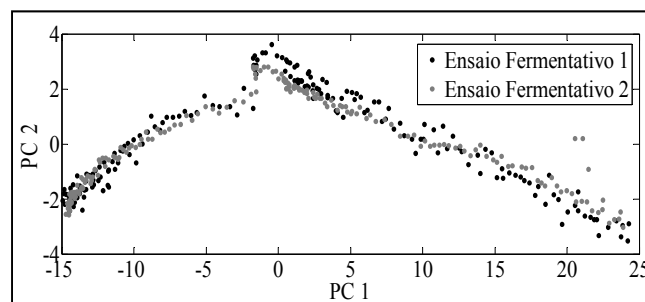
Os dados originais são decompostos em um novo conjunto de vetores ortogonais, denominados vetores de carga, que são combinações lineares dos vetores de dados originais. Os novos vetores são ordenados pelo montante de variância explicada – informação contida. Para a aplicação da técnica de PCA, é necessário promover um pré-tratamento da matriz de dados. Este tratamento

consiste em normalizar os dados, obtendo dados centrados e normalizados. Para isto, é retirada a média e o desvio padrão de cada componente da matriz de dados.

A partir desta decomposição em componentes principais, é possível constatar que os dados contidos na matriz de fluorescência dos processos fermentativos avaliados, podem ser representados através da utilização de três componentes principais, desta forma reduzindo de forma significativa a dimensionalidade da matriz de fluorescência. A Figura 3 apresenta a representação gráfica dos dois principais componentes (PC1 e PC2) de cada ensaio fermentativo. Podemos ver que não existe uma diferença significativa entre o decorrer dos processos fermentativos, indicando que ambos os processos possuem as mesmas condições iniciais, de forma que a avaliação de modelos quimiométricos pode ser feita diretamente comparando os resultados dos dois processos.

De forma geral, mesmo pequenas variações de temperatura nos processos, ou outras variáveis não monitoradas (cor do meio, concentrações de compostos secundários, etc), podem ocasionar uma variação significativa na qualidade dos espectros de fluorescência (LAKOWICZ, 2006). Devido à característica dos resultados da análise de PCA realizada, pode-se concluir que não é necessário levar em consideração influências de meio ou temperatura na comparação destes processos.

Caso houvesse uma diferença significativa entre os resultados obtidos por PCA para os dois processos, seria necessário promover um pré-tratamento em ambos os conjuntos de dados. Este procedimento tem por objetivo retirar da matriz de fluorescência a influência de diferenças nas condições iniciais e variações nos meios entre os ensaios. Uma das formas possíveis de diminuir este tipo de influência é retirar a média de intensidade de fluorescência, apresentada pelas primeiras medidas de cada ensaio (início do processo fermentativo), onde ainda não ocorreram mudanças significativas nos estados do processo, para cada par excitação/emissão, e esta média é reduzida das medidas subsequentes (KARA, 2010).

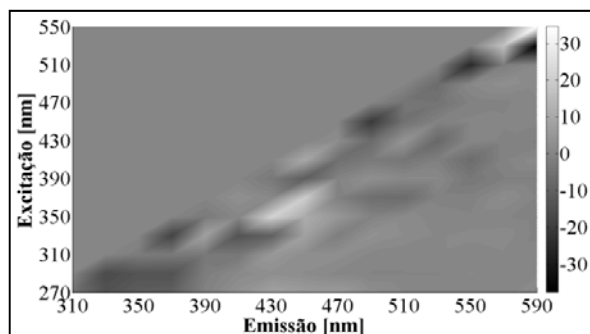


**Figura 3:** Análise de PCA dos espectros de fluorescência dos ensaios fermentativos 1 e 2.

De acordo com KARA (2010), a diferença entre dois processos pode ser visualizada como a diferença entre os respectivos espectros iniciais de cada corrida reacional (figure 4). Na maior parte do diagrama de Ex/Em, resultante da diferença entre os espectros iniciais dos ensaios fermentativos 1 e 2, pode ser observado que não existem regiões com variações na intensidade de fluorescência significativas, sendo as diferenças apresentadas inferiores à 3%, indicando que existem baixas variações na temperatura reacional de ambos os processos. Entretanto, uma pequena diferença é aparente

nas regiões Ex290nm/Em350nm e Ex370nm/Em450nm, regiões estas, comumente associadas à triptofano e NADH, respectivamente.

Como as corridas fermentativas não diferem de forma significativa nos espectros iniciais, modelos quimiométricos para caracterização destas, podem ser propostos diretamente baseados nas intensidades de fluorescência apresentada por um ensaio e validados nos dados oriundos do segundo, sem a necessidade de utilizar espectros de diferença.



**Figura 4:** Espectro da diferença entre ensaios fermentativos 1 e 2, para os instantes iniciais dos processos.

Com base nos resultados apresentados pela análise de PCA foi feita a busca das regiões Ex/Em, com maior representatividade para cada um dos estados fermentativos a serem caracterizados por modelagem quimiométrica. Neste procedimento foi feita a procura pelos pares Ex/Em que apresentam maior correlação linear com os estados da fermentação. A busca destas regiões de representatividade foi feita através da avaliação do comportamento dinâmico de cada par Ex/Em individual, frente os dados de caracterização *off-line*. Nesta etapa, ambos os conjuntos de dados oriundos dos dois ensaios fermentativos foram utilizados, já que esta é uma etapa qualitativa de análise dos resultados.

Do ponto de vista prático, a seleção de pares específicos de Ex/Em para o ajuste de modelos quimiométricos é essencial para viabilizar a construção de sensores. O intuito é que estes sensores em pequena escala possam ser projetados bastando que o processo a ser caracterizado tenha sido previamente monitorado por espectroscopia fluorescente 2D. Sensores em pequena escala tratam-se, basicamente, de versões reduzidas do espectro de fluorescência 2D, e para tanto, a utilização de poucos pares Ex/Em é necessária, para viabilizar sua construção.

A seleção do número ótimo de pares Ex/Em a ser utilizada para cada processo é feita a partir da análise de PCA, onde o número de PC's que apresentam a maior variabilidade de informação, é tido como o número ótimo de pares a serem utilizados na obtenção de modelos quimiométricos e futuramente construção de sensores. Nos ensaios fermentativos em questão, o número de PC's ideal, é equivalente a três, o que indica que o ideal é utilizarmos entorno de três pares Ex/Em na construção de modelos quimiométricos para a caracterização deste processo.

Mesmo com reduzido número de pares, devido à alta quantidade de informações contidas nas matrizes de espectroscopia fluorescente, a busca exaustiva por elementos torna-se demasiadamente trabalhosa, sem a

utilização de processos de pré-seleção ou ranqueamento de pares.

Partindo de uma matriz de fluorescência composta por 150 pares Ex/Em, como é o caso das matrizes utilizadas na caracterização dos ensaios fermentativos 1 e 2, a avaliação exaustiva de todas as possíveis combinações de modelos quimiométricos pode ser muito demorada. Partindo desta configuração de matriz de fluorescência, 11175 combinações de pares dois a dois podem ser avaliadas, já três a três, este número passa para 551300 possibilidades.

Na configuração de modelos três a três pares, dependendo do número de parâmetros a serem ajustados nos modelos quimiométricos, o tempo de avaliação de cada modelo pode variar. Supondo que um modelo seja avaliado a cada segundo, a busca exaustiva levará cerca de 150 horas para testar todas as combinações de modelos possíveis. Levando em consideração que a dimensão da matriz de espectroscopia fluorescente é função da resolução do equipamento utilizada, podendo ser de no mínimo 1 nm, o número de pares que compõe as matrizes de espectroscopia pode ser significativamente maior. Associado ao fato de que sensores compostos por mais de três pares Ex/Em são viáveis na prática, a pré-seleção de pares é essencial no projeto de sensores quimiométricos.

Uma possível forma de ranqueamento inicial pode ser realizada através da avaliação da correlação linear apresentada entre os elementos da matriz de fluorescência e os estados a serem caracterizados. A escolha por esta metodologia foi feita devido a esta análise fornecer resultados rápidos e que indicam o quanto influenciada é a fluorescência de cada par Ex/Em pela concentração dos estados no meio fermentativo. A partir desta primeira análise, modelos de um, dois e três pares são propostos e ajustados.

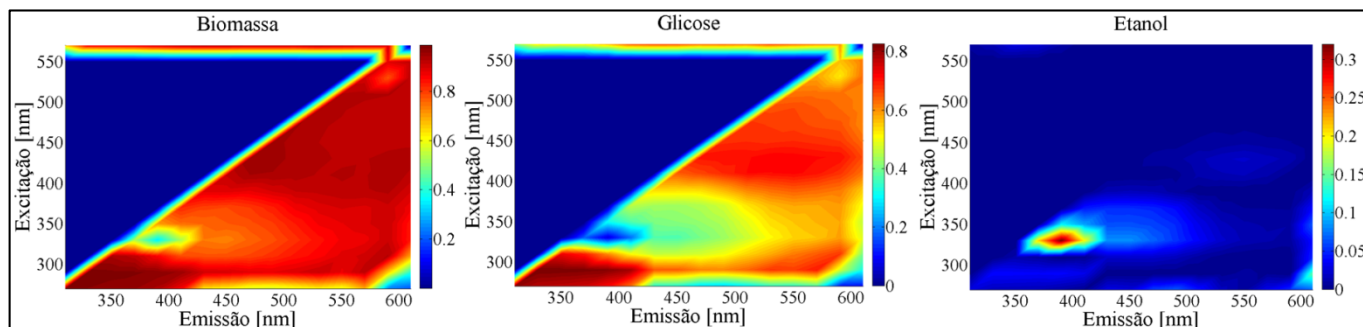
A Figura 5 apresenta os índices de correlação obtidos na matriz de espectroscopia. Nesta figura, podemos visualizar os pares, ou regiões no espectro, que apresentam maiores valores de correlação e, portanto, apresentam maiores dependências lineares das concentrações dos estados, sendo desta forma os pares mais indicados para a obtenção de modelos quimiométricos.

Através da análise destes resultados, podemos concluir que a caracterização das concentrações de biomassa e glicose, estaria associada ao monitoramento da região de espectroscopia fluorescente sensível à proteínas, compreendida entre **Ex270-300/Em310-370**, aproximadamente. O fato de estes dois estados afetarem a matriz de espectroscopia fluorescente em uma mesma região pode dificultar a segmentação entre ambos a partir dos dados de espectro fluorescência. Assim, modelos quimiométricos que utilizem componentes diferentes de espectro fluorescência devem ser ajustados para estes estados, sendo a seleção destes determinados pares Ex/Em, específicos para cada estado, crucial para o ajuste de modelos quimiométricos eficazes em caracterizar cada estado separadamente.

A concentração de produto, etanol, aparentemente encontra-se relacionada com a região do espectro de fluorescência compreendida entre Ex330-350/Em350-430, região essa associada usualmente à metabolitos celulares, como NADH, vitaminas, etc. Entretanto, o índice de

correlação apresentado entre os elementos da matriz de fluorescência e o comportamento dinâmico da concentração de etanol não é satisfatório, de forma que

pode ser concluído que nenhum elemento desta matriz apresenta relação linear com este estado.



**Figura 5:** Matrizes de índice de correlação ao quadrado dos pares Ex/Em avaliados linearmente frente os estados caracterizados nos ensaios fermentativos 1 e 2.

Apesar de estas regiões apresentarem melhor comportamento dinâmico linearmente associado às concentrações de biomassa, glicose e etanol no meio fermentativo, modelos quimiométricos que levem em consideração elementos e regiões distintas devem ser avaliadas, já que apesar destas regiões apresentarem melhor representatividade, é possível que a combinação entre diferentes regiões (sensíveis a diferentes metabólitos), venham a produzir melhores modelos.

Esta análise qualitativa inicial permite a obtenção de modelos que levam em consideração um único componente da matriz de fluorescência. A Figura 6 apresenta os modelos de quarta ordem obtidos para os quatro melhores elementos apontados pela análise anterior para concentração de biomassa e glicose. Nesta, podemos constatar que apesar destes modelos serem função dos dados de intensidade de fluorescência de um único par Ex/Em, eles apresentam capacidade de prever de forma aceitável os estados avaliados.

A concentração de etanol, por outro lado, como não apresenta pares de fluorescência linearmente dependentes associados, necessita da busca por pares de fluorescência que apresentem comportamento de maior ordem associados. A Figura (7a) apresenta a avaliação através do índice de correlação quadrado da relação entre a intensidade de fluorescência com a concentração de etanol no meio fermentativo, associados de forma quadrática, enquanto que a Figura (7b) apresenta quatro modelos de quarta ordem ajustados para inferir a concentração de etanol a partir da intensidade de fluorescência apresentada pelos pares Ex/Em indicados na Figura (7a).

Partindo das pré-análises e modelos simplificados obtidos, foi feita a busca exaustiva pela melhor combinação de pares Ex/Em, associados dois a dois e três a três. Nesta busca não foram incluídos todos os pares disponíveis, apenas os melhores qualificados através dos índices de correlação apresentados nas análises anteriores.

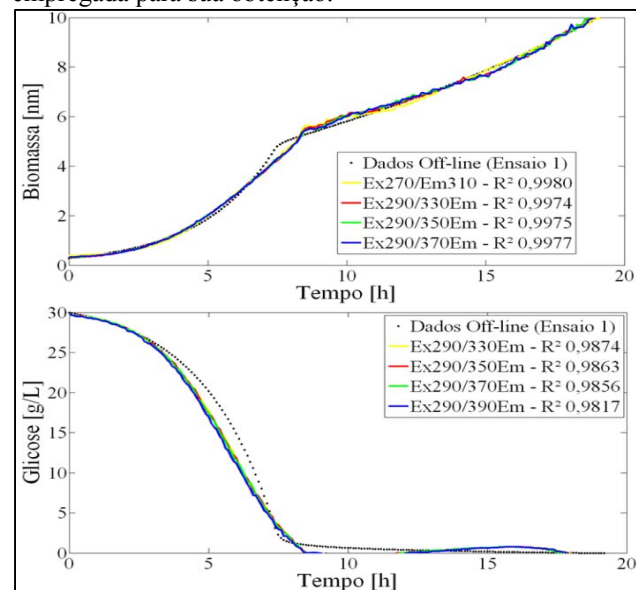
Os modelos quimiométricos ajustados para cada conjunto de pares, leva em consideração efeitos quadráticos e combinatórios dos pares, sendo que novamente foi feita a seleção dos melhores modelos através do índice de correlação apresentado pelos estados preditos e medidos.

A Tabela 1 apresenta os quatro melhores conjuntos de pares Ex/Em, obtidos no ranqueamento de modelos compostos por dois e três pares. Esta tabela também apresenta o índice de correlação apresentado pelos

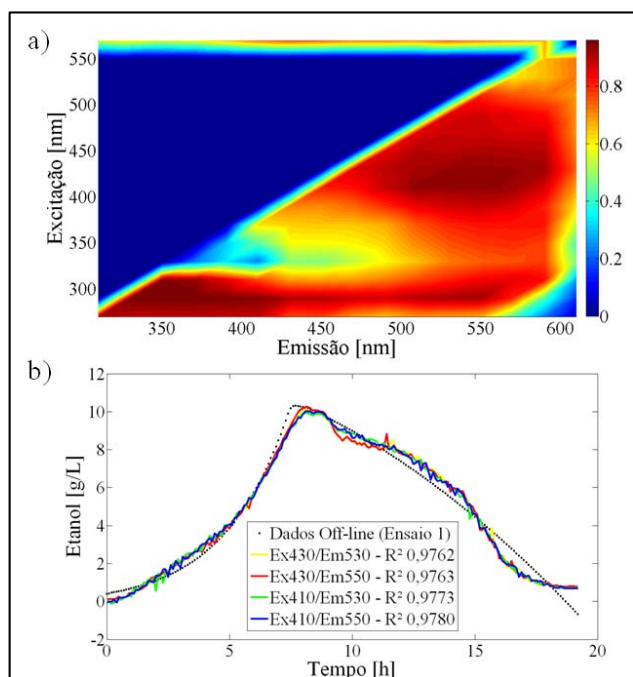
respectivos modelos quimiométricos ajustados, em comparação aos dados *off-line*. As predições dos modelos apresentados na Tabela 1 são visualizadas na Figura 8, onde são graficados os dados *off-line* dos estados do ensaio fermentativo 1 e os estados preditos pelos modelos quimiométricos ajustados. Nesta figura, a legenda de 1 à 4, diz respeito aos modelos obtido pelos conjuntos de pares apresentados na Tabela 1, para cada um dos estados. Esta ordenação foi feita de acordo com o índice de correlação quadrado obtido em cada modelo.

As figuras 8 (a) e (b) mostram que apesar dos modelos propostos serem estruturalmente distintos (Figura 8 (a) consiste de modelos baseados em dois pares Ex/Em, enquanto a Figura 8 (b) mostra modelos compostos por três pares), ambas estruturas de modelos permitem a caracterização dos estados do ensaio fermentativo 1. Em comparação, os modelos que levam em consideração três pares, apresentaram melhores resultados de caracterização, sendo capazes de prever com maior precisão os valores das concentrações de etanol, biomassa e substrato no meio fermentativo.

De posse dos modelos ajustados, é necessário fazer a validação destes, e por consequência, da metodologia empregada para sua obtenção.



**Figura 6:** Modelos quimiométricos baseados em um único par Ex/Em ajustados para prever as concentrações de Biomassa e Glicose no ensaio fermentativo 1.



**Figura 7:** a) Índice de correlação associado à concentração de etanol e intensidade de fluorescência, comparando comportamentos relacionados de forma quadrática. b) Modelos quimiométricos de quarta ordem baseados em um único par Ex/Em ajustados para prever a concentração de etanol no ensaio fermentativo 1.

O procedimento de validação é feito através da utilização dos dados do ensaio fermentativo 2, onde os

dados de espectroscopia fluorescente 2D são alimentados nos modelos quimiométricos, obtidos e ajustados com os dados do ensaio fermentativo 1, e é feita a avaliação da capacidade preditiva destes modelos para este novo conjunto de dados *on-line*.

O processo de validação é realizado para os modelos quimiométricos compostos por três pares Ex/Em, já que estes modelos são os que conseguiram representar de forma mais adequada os estados fermentativos do primeiro ensaio. A Figura 9 apresenta a aplicação destes modelos na estimação dos estados fermentativos do ensaio 2, bem como a correlação apresentada entre os dados preditos e os medidos para este ensaio.

A Figura 9 mostra claramente que apesar dos modelos quimiométricos terem sido ajustados sem a utilização dos dados do ensaio fermentativo 2, estes foram capazes de prever com precisão os estados deste ensaio, mostrando assim a viabilidade na utilização desta técnica analítica na caracterização de processos fermentativos desta natureza, além da metodologia empregada na escolha dos conjuntos de pares Ex/Em.

Os altos índices de correlação, obtidos na etapa de validação dos modelos quimiométricos ajustados, indicam a alta correlação existente entre os pares selecionados e os estados mensurados, de forma a permitir a caracterização dos respectivos estados com precisão significativa.

**Tabela 1:** Conjuntos de pares Ex/Em selecionados para a caracterização dos estados do ensaio fermentativo 1, através do ajuste de modelos quimiométricos com dados *on-line* de espectroscopia fluorescente 2D deste ensaio.

Glicose							
	Par 1	Par 2	R <sup>2</sup>	Par 1	Par 2	Par 3	R <sup>2</sup>
1)	Ex290/Em370	Ex390/Em570	0,99271	Ex290/Em330	Ex270/Em330	Ex410/Em590	0,99715
2)	Ex290/Em330	Ex410/Em590	0,99234	Ex290/Em370	Ex310/Em350	Ex270/Em370	0,99706
3)	Ex290/Em330	Ex390/Em570	0,99231	Ex290/Em330	Ex270/Em350	Ex410/Em590	0,99697
4)	Ex290/Em350	Ex390/Em570	0,99217	Ex290/Em330	Ex310/Em350	Ex270/Em370	0,99696
Biomassa							
	Par 1	Par 2	R <sup>2</sup>	Par 1	Par 2	Par 3	R <sup>2</sup>
1)	Ex270/Em310	Ex470/Em570	0,99638	Ex270/Em310	ExALL/Em350	Ex470/Em570	0,99827
2)	Ex290/Em370	Ex310/Em350	0,99622	Ex270/Em310	Ex470/Em550	ExALL/Em350	0,99827
3)	Ex270/Em310	Ex470/Em550	0,99617	Ex270/Em310	ExALL/Em350	Ex430/Em590	0,99825
4)	Ex270/Em310	Ex270/Em390	0,99610	Ex270/Em310	ExALL/Em350	Ex450/Em530	0,99823
Etanol							
	Par 1	Par 2	R <sup>2</sup>	Par 1	Par 2	Par 3	R <sup>2</sup>
1)	Ex290/Em330	Ex270/Em390	0,97794	Ex290/Em330	Ex390/Em490	Ex270/Em390	0,99233
2)	Ex290/Em330	Ex270/Em370	0,97447	Ex290/Em330	Ex390/Em470	Ex270/Em390	0,99201
3)	Ex290/Em330	Ex270/Em350	0,96682	Ex290/Em330	Ex370/Em590	Ex270/Em390	0,99158
4)	Ex290/Em330	Ex290/Em410	0,96435	Ex290/Em330	Ex390/Em430	Ex270/Em390	0,99157

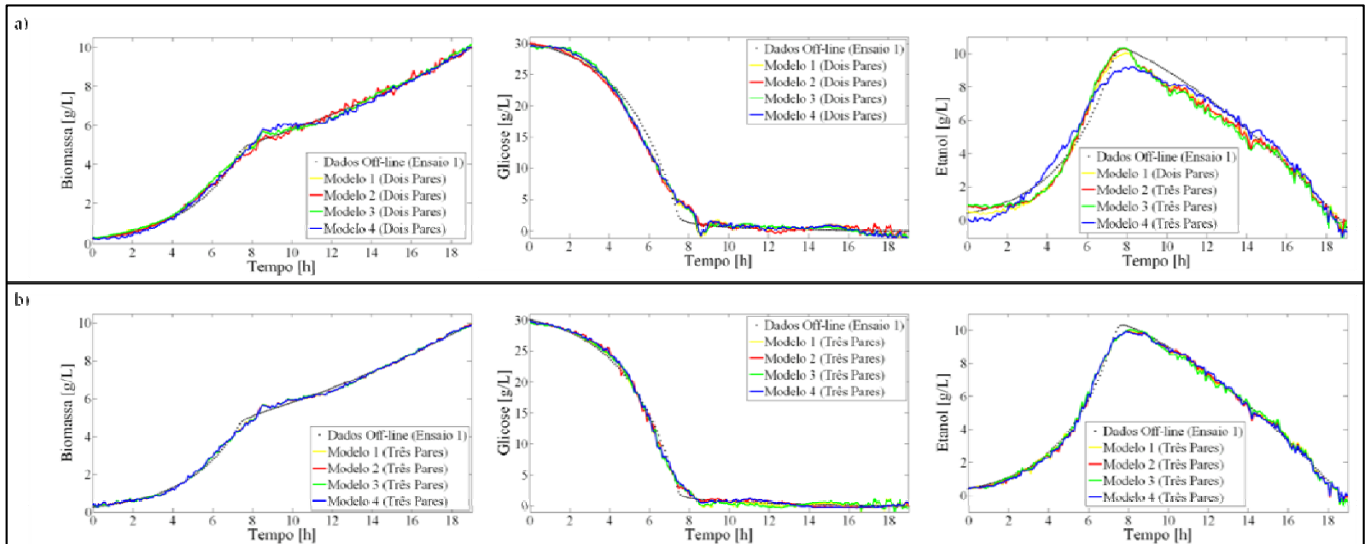


Figura 8: Modelos quimiométricos baseados em dois (a) ou três (b) pares Ex/Em, apresentados na Tabela 1.

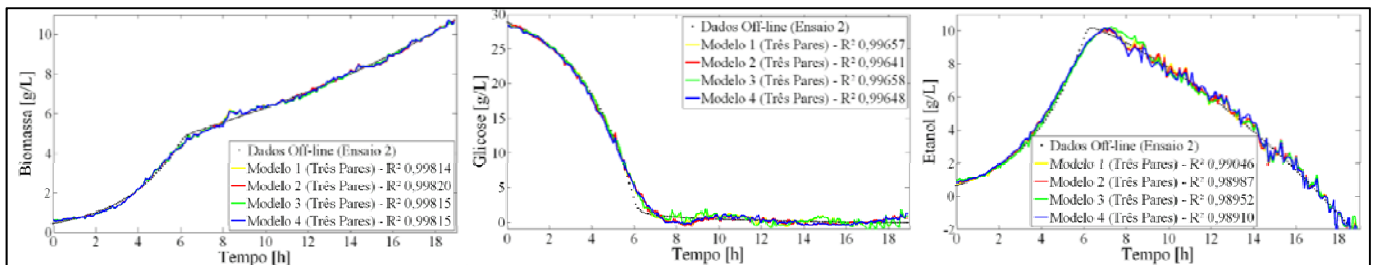


Figura 9: Validação dos modelos quimiométricos ajustados com dados do ensaio fermentativo 1, aplicados na caracterização do ensaio fermentativo 2.

#### 4. Conclusão

A utilização da técnica e espectroscopia fluorescente 2D como componente do ferramental de monitoramento e caracterização de processos, apresenta alta viabilidade de aplicação industrial e laboratorial. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a viabilidade da aplicação desta técnica na caracterização *on-line* de processos fermentativos de glicose, utilizando o micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae* (atualmente utilizado em uma grande gama de processos industriais, em diferentes escalas de produção). Além deste, também foi comprovada a viabilidade na utilização desta técnica na caracterização de correntes contendo glicose e frutose.

A utilização de espectroscopia fluorescente 2D como ferramenta para a caracterização de processos é conhecida à muitos anos, entretanto, a utilização da matriz completa de espectroscopia fluorescente acarreta a necessidade da utilização de fluorômetros 2D na linha do processo, cuja viabilidade é dependente do porte da empresa. Partindo do pressuposto que nem toda informação contida na matriz de espectroscopia é útil na caracterização dos compostos e metabolitos presentes nas correntes de processo, a escolha dos pares de Ex/Em mais indicados para mensurar estados específicos é essencial para o desenvolvimento de sensores rápidos, confiáveis e de fácil utilização.

A metodologia apresentada para o ranqueamento de pares de fluorescência mostrou ser eficiente e capaz de gerar modelos quimiométricos de forma rápida para os dois tipos de caracterização avaliados, de processos e de correntes.

Com relação à caracterização de processos

fermentativos de glicose com a levedura *SC*, a caracterização dos estados de processo (concentrações de glicose, etanol e biomassa) é possível de ser feita através da utilização de três pares fluorescentes distintos, para cada estado. Esta informação é essencial para determinar o número de pares mais indicados para a construção de modelos quimiométricos. A análise de PCA foi a técnica aplicada na determinação deste dado, apresentando resultados satisfatórios. Os dados de espectroscopia dos ensaios fermentativos podem ser representados através da utilização de três PC's, assim como os dados de caracterização de correntes de glicose e frutose, os quais também podem ser representados através da utilização de três PC's, de acordo com a análise de PCA.

O acompanhamento da evolução na concentração de biomassa no meio fermentativo mostrou ser mais bem obtida através da utilização do modelo quimiométrico composto pelos pares Ex270/Em310 ExALL/Em350 e Ex470/Em570, apresentando 0,99827 e 0,99814 como índices de correlação quadrados, respectivamente aos dados de ajuste de parâmetros de modelo e validação de modelo quimiométrico. Por fim, o modelo composto pelos pares Ex290/Em330 Ex390/Em490 e Ex270/Em390 foi o que apresentou melhores resultados na caracterização de etanol no meio fermentativo, apresentando índices de correlação quadrático de 0,99233 e 0,99046 referente aos dados de ajuste de parâmetros e validação de modelo, respectivamente.

Com relação ao processo de caracterização de correntes contendo frutose e glicose, os modelos quimiométricos que apresentaram melhor capacidade de predição destes estados foram os conjuntos de pares

Ex360/Em430 Ex260/Em620 e Ex270/Em470 para predição da concentração de glicose e Ex290/Em420 Ex280/Em440 e Ex290/Em320 para a predição de frutose. Na caracterização da concentração de glicose, a utilização de modelos compostos por três pares Ex/Em apresentaram um ganho esperado na capacidade preditiva do modelo, quando comparado com modelos compostos por apenas dois pares, entretanto os resultados não alcançaram o nível de satisfação atingido pelos demais modelos. Uma possível forma de obtermos modelos mais representativos seria utilizando um maior número de pares, ou então diferentes estruturas de modelos.

A utilização de bio-sensores, compostos por poucos pares Ex/Em e específicos para determinados compostos e/ou metabólitos de processos, permite a aplicação de técnicas de controle e monitoramento de processos mais eficientes, de forma a permitir um incremento de produção significativa, levando os bioprocessos a um novo patamar de produção. Não apenas vantagens operacionais são obtidas, mas também no âmbito da pesquisa, aumentando o entendimento sobre processos e micro-organismos.

## 5. Referências

- AYNSLEY, M.; HOLFLAND, A.; MMORRIS, A. J.; MONTAGUE, G. A.; DI MASSIMO, C. Artificial intelligence and the supervision of bioprocesses (real-time knowledge-based systems and neural networks). *Bioprocess Design and Control*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Berlin, 1993.
- BOEHL, D., SOLLE, D., HITZMANN, B., SCHEPER, T. Chemometric modeling with two-dimensional fluorescence data for *Claviceps purpurea* bioprocess characterization. *J. Biotechnol.* v. 105, p. 179–188, 2003.
- CHRISTENSEN, J., NORGAARD, L., LINDEMANN, C. On-line fluorescence spectroscopy and chemometrics for qualitative and quantitative analysis: application in the sugar industry. *Spectrosc. Eur.* 11 (5), 1999
- DIEHL, F. C.; SECCHI, A. R.; LUSA, L. P.; MUNIZ, L. A. R.; LONGHI, L. G. S. Simulação operacional de uma torre de destilação atmosférica via Aspen Plus e avaliação de modelos de analisadores virtuais. Publicação aceita na revista Controle & Automação, 2009.
- FACCHIN, S. Técnicas de análise multivariável aplicadas ao desenvolvimento de analisadores virtuais. Dissertação de Mestrado. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2005.
- GANZLIN, M., MAROSE, S., LU, X., HITZMANN, B., SCHEPER, T., RINAS, U. In situ multi-wavelength fluorescence spectroscopy as effective tool to simultaneously monitor spore germination, metabolic activity and quantitative protein production in recombinant *aspergillus niger* fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, v. 132, p. 461–468, 2007.
- HAGERDON, A., LEGGE, R.L., BUDMAN, H. Evaluation of spectrofluorometry as a tool for estimation in fed-batch fermentations. *Bioeng. v.* 83, p. 104–111, 2003.
- HANTELMAH, K.; KOLLECKER, M.; HÜLL D.; HITZMANN, B.; SCHEPER, T. Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a novel approach for controlling fed-batch cultivations. *Journal of Biotechnology*, v. 121, p. 410–417. Elsevier, 2006.
- HITZMANN, B.; PEKELER, T.; LINDERMANN, C.; MAROSE, S. E SCHEPER, T. Chemometric models for the on-line estimation of bioprocess variables from 2-D fluorescence spectra. Preprints of 7th International Conference on Computer Applications in Biotechnology. Osaka, 1998.
- KARA, S., ANTON, F., SOLLE, D., NEUMANN, M., HITZMANN, B., SCHEPER, T., LIESE, A. Fluorescence spectroscopy as a novel method for on-line analysis of biocatalytic C-C bond formations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* v. 66, p. 124–129, 2010.
- LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3<sup>a</sup> ed., Springer, Baltimore, Maryland, USA, 2006.
- LI, J., HUMPHREY, A. E.. Use of fluorometry for monitoring and control of a bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* v. 37, p. 1043–1049, 1991.
- LINDEMANN, C., MAROSE, S., NIELSEN, H.O., SCHEPER, T. 2-Dimensional fluorescence spectroscopy for on-line bioprocess monitoring. *Sens. Actuators B: Chem.* v. 51, p. 273–277, 1998.
- MAROSE, S., LINDEMANN, C., SCHEPER, T. Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a new tools for on-line bioprocess monitoring. *Biotechnol. Prog.* v.14, p. 63–74, 1998.
- MULCHANDANI, A., BASSI, A.S. Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control. *Crit. Rev. Biotechnol.* v. 1, p. 105–124, 1995.
- RANZAN, C. Fermentação Contínua de *Zymomonas mobilis*: Modelagem, Ajuste de Parâmetros e Inferências a Partir do Consumo de Hidróxido de Sódio. Dissertação de Mestrado. UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2010.
- RANZAN, C., TRIERWEILER, L., HITZMANN, B. e TRIERWEILER, J. O. Modelagem quimiométrica para caracterização de bioprocessos através de espectroscopia fluorescente-2D. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos 2011, 18. 2011, Caxias do Sul, Anais. (a)
- RANZAN, C., TRIERWEILER, L., HITZMANN, B. e TRIERWEILER, J. O. Validação com Dados de Espectroscopia Fluorescente 2D de Modelo Dinâmico para Fermentações Batelada de *Saccharomyces cerevisiae*. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos 2011, 18. 2011, Caxias do Sul, Anais. (b)
- RHEE, J.I., RITZKA, A., SCHEPER, T. On-line monitoring and control of substrate concentrations in biological processes by flowinjection analysis system. *Biotechnol. Bioproc.* v. 9, p. 156–165, 2004.
- SCHÜGERL, K. Progress in monitoring and control of bioprocesses during the last 20 years. *J. Biotechnol.* v. 85, p. 149–173, 2001.
- SCHEPER, T.; HITZMANN, B.; STÄRK, E.; ULBER, R.; FAURIE, R.; SOSNITZA, P.; REARDON, K. F. Bioanalytics: detailed insight into bioprocesses. *Analytica Chimica Acta*, v. 400, p. 121–134. Elsevier, 1999.
- SKIBSTED, E., LINDEMANN, C., ROCA, C., OLSSON, L. On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence sensor using multivariate calibration. *J. Biotechnol.* v. 88, p. 47–57, 2001.
- SOLLE, D., GEISLER, D., STÄRK, E., SCHEPER, T., HITZMANN, B. Chemometric modeling based on 2D-fluorescence spectra without a calibration measurement. *Bioinformatics.* v. 19, p. 173–177, 2003.
- STÄRK, E.; HITZMANN, B.; SCHÜGERL, K.; SCHEPER, T.; FUCHS, C.; KÖSTER, D. E MÄRKEL, H. In-Situ-fluorescence-probes: a useful tool for non-invasive bioprocess monitoring. *Advances in biochemical engineering Biotechnology*, v. 74, p. 21–38, 2002.
- SURRIBAS, A., GEISLER, D., GIERSE, A., SCHEPER, T., HITZMANN, B., MONTESINOS, J. L., VALERO, F. State variables monitoring by in situ multi-wavelength fluorescence spectroscopy in heterologous protein production by *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*. v. 124, p. 412–419. 2006.
- WHITFORD, W., JULIEN, C. Analytical Technology and PAT. *BioProcess International*. p. 32–41, 2007.
- WOLF, G., ALMEIDA, J.S., PINHEIRO, C., CORREIA, V., RODRIGUES, C., REIS, M.A.M., CRESPO, J.G. Two-dimensional fluorometry coupled with artificial neural networks: a novel method for on-line monitoring of complex biological processes. *Biotechnol. Bioeng.* v. 72, p. 297–306, 2001.
- ZABRISKIE, D.W., HUMPHREY, A.E. Estimation of fermentation biomass concentration by measuring culture fluorescence. *Appl. Eur. Microbiol.* v. 35, p. 446–450, 1978.