



ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA 2D: FUNDAMENTOS, APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS

Fabio Cesar Diehl¹, Jorge Otávio Trierweiler¹

¹ Laboratório de Controle e Intensificação de Processos
Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos - GIMSCOP
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: {diehl, jorge}@enq.ufrgs.br

Resumo: Os bioprocessos vêm ganhando cada vez mais espaço frente à indústria química convencional, seja pela substituição de combustíveis fósseis por renováveis ou pela síntese de biomateriais (polímeros, fármacos, etc.). Mesmo que as matérias primas e os meios de transformação sejam distintos, quando comparados os processos químicos e bioquímicos, a essência da operação industrial ainda se mantém. De um ponto de vista operacional, o controle do processo requer o conhecimento do estado do sistema, que venha a possibilitar a busca de condições ótimas através da ação de variáveis manipuladas. Entretanto, a quantificação dessas variáveis em tempo real está longe de ser uma tarefa trivial. Usualmente são as on line de variáveis como temperatura, nível, vazão, agitação, pH, pO₂, que são diretamente relacionadas com as condições do meio, mas não são suficientes para definir o estado do processo (conversão de substrato em produto, taxa de crescimento da biomassa, geração de produto e consumo de substrato, por exemplo). Devido à complexidade de tais medidas, sua quantificação é geralmente determinada por procedimentos laboratoriais inviabilizando a retroalimentação dessas informações em um algoritmo de controle. O método mais comum para a análise on line dessas variáveis, de forma on line, é através da utilização de cromatografia, o que resulta em considerável tempo morto para a realimentação. Este artigo descreve a espectroscopia de fluorescência bidimensional, como uma alternativa promissora para o monitoramento de bioprocessos. Esse método, além de ser não-intrusivo, possibilita a análise em tempo real do estado metabólico do meio gerando um grande número de informações sobre o processo.

Palavras-chave: monitoramento on line, feedback, controle, espectrofluorescência bidimensional, bioprocessos

1 Introdução

Inerente à evolução da humanidade vão surgindo diferentes exigências econômicas, sociais e, atualmente, ambientais. Isso resulta da fusão das necessidades e vontades do homem ao gradativo acúmulo de conhecimento adquirido, seja esse empírico ou conceitual. De um modo simplificado, pode-se perceber no passado o emprego de tecnologia e biologia na produção de gêneros alimentícios fermentados (pães e bebidas). Com a expansão das relações comerciais, aliada aos anseios da modernidade e ao desenvolvimento científico iniciou-se uma era dominada pela manufatura industrial. Neste contexto, a biotecnologia teve seu marco revolucionário a partir da descoberta da penicilina, por Alexander Fleming em 1928, que possibilitou o desenvolvimento de uma série de antibióticos em todo o mundo. Antes disso, no final do século XIX, a fermentação industrial já era uma realidade na síntese de etanol e ácido láctico. Mas foram as grandes guerras que definitivamente motivaram a produção industrial de produtos advindos de processos fermentativos (STANBURY *et al.*, 1995). Durante a primeira guerra mundial foram desenvolvidos processos de fermentação de

glicerol e acetona pela Alemanha e Inglaterra, respectivamente. Já na segunda guerra mundial os Estados Unidos incorporaram a produção dos antibióticos penicilina e a estreptomicina. Após isso, ainda houve avanços relativo à síntese química de DNA e manipulações genéticas, que deram origem ao campo de estudo denominado engenharia genética. Isso permitiu a alteração de organismos vivos formados pela hibridização do DNA em nível molecular. Entre outros, o resultado foi o desenvolvimento de microorganismos capazes de sintetizar insulina humana, utilizada no tratamento de diabéticos. Hoje é crescente o desenvolvimento da indústria de bioprocessos, havendo fortes relações de multidisciplinaridade que envolve uma diversidade de áreas da biologia, química e engenharia. Além disso, a reestruturação e otimização da indústria convencional fermentativa para a produção de bioenergia e biomateriais, em substituição à petroquímica, conduzirá a indústria um novo paradigma: as biorrefinarias (KOUTINAS *et al.*, 2006; ZVERLOV *et al.*, 2006). O uso de subprodutos agrícolas (fontes de hidratos de carbono, proteínas, lignina e gorduras) na fabricação de múltiplos produtos (polímeros, combustíveis, etc.) será provavelmente

essencial para a viabilidade econômica do futuro (ZVERLOV *et al.*, 2006; LYND *et al.*, 1999).

Historicamente, o caminho mais eficaz para a obtenção de incremento produtivo, em uma planta de bioprocesso, está ligado 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 dos bioprocessos, pelo fato de possibilitar reduções nos custos de produção, incremento na conversão das reações, além de manter a qualidade do produto desejado (YAMUNA RANI & RAMACHANDRA RAO, 1999). A Figura 1 ilustra o típico sistema de monitoramento e controle de um processo de fermentação apresentado por LIU *et al.* (2001), onde o controle de inventário é realizado em tempo real enquanto que as concentrações são determinadas por cromatografia líquida (HPLC).

Em processos químicos ou bioquímicos certas propriedades são de difícil aquisição, 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, o que é altamente prejudicial para o sistema de controle devido ao elevado atraso de tempo para a realimentação. Isto porque os controladores requerem uma realimentação mínima de informações do processo. Para minimizar esse problema de realimentação deve ser considerado principalmente:

- Desenvolvimento de biosensores;
- Melhora nos sistemas de amostragem e sistemas de análise automática;
- Utilização de técnicas de estimação on line.

2 Transdutores em Bioprocessos

Segundo WEBSTER (1999) as principais características dos transdutores usados em bioprocessos são a precisão, resolução, sensibilidade, confiabilidade e praticidade. Além disso, quando se fala em bioprocessos é essencial atentar para os riscos de contaminação do meio. Uma barreira segura deve ser mantida entre o interior e o exterior de fermentadores e tal restrição varia conforme o princípio do medidor utilizado. Em relação à medida é conveniente a seguinte classificação: *in situ*, *on line* e *off line*. Sensores *in situ* estão diretamente em contato com o meio, o que torna a medição intrusiva mesmo que o elemento sensor não seja (i.e., existência de membranas). As respostas desse sensor são geralmente rápidas devido a sua proximidade com o meio, porém apresenta certa resistência a esterilização. Sensores *on line* não ficam em contato com o meio, uma amostra é retirada e seu tempo de resposta é maior do que o sensor *in situ*. Contudo o tempo de resposta é consistente com outras constantes de tempo do sistema. Por fim, os sensores *off line* são utilizados para análises mais complexas, as amostras retiradas passam por procedimentos laboratoriais e o tempo de resposta é excessivamente elevado (MCMILLAN, 1999). Os transdutores também podem ser classificados pelo tipo de variável medida. Sensores físicos medem grandezas físicas (temperatura, pressão, vazão, etc.) e são em geral bem estabelecidos. Já os sensores químicos quantificam espécies químicas básicas (pH, O₂, CO₂, condutividade, etc.). Requerem certa manutenção, mas mesmo assim são considerados bem consolidados. Por último os sensores bioquímicos medem espécies diretamente envolvidas em biorreações (biomassa,

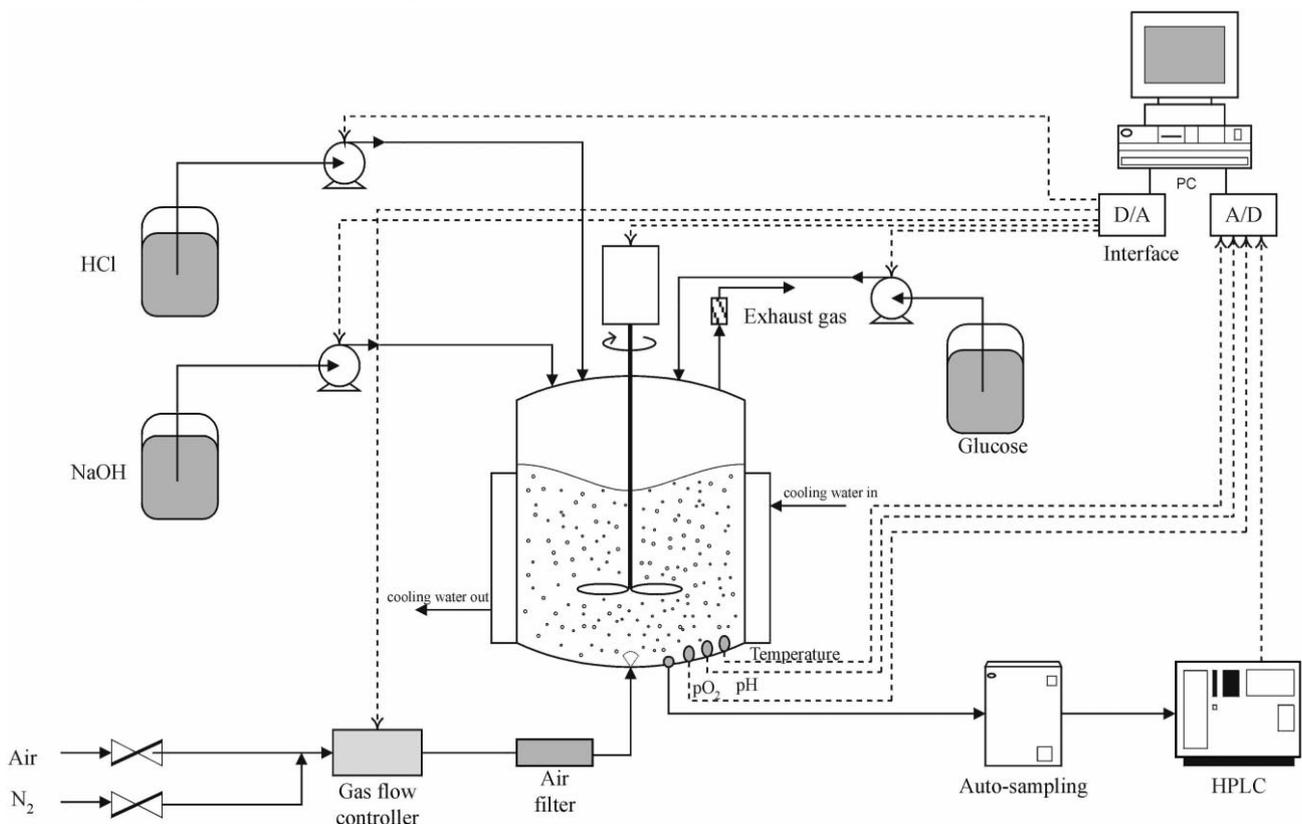


Figura 1. Típico monitoramento e controle de um bioprocesso. Fonte: LIU *et al.* (2001)

substrato, produto, etc.). Um exemplo são os sensores óticos, que permitem monitorar componentes extra e intracelular sem interferir no bioprocesso (SCHEPER *et al.*, 1999).

Nos últimos anos os sensores óticos vêm se tornando cada vez mais importantes em aplicações biotecnológicas. Detectores óticos podem ser 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). Todo tipo de espectroscopia é possível através dessa técnica. Neste contexto os sensores de fluorescência vêm sendo investigados na determinação de biomassa e células viáveis, caracterização do biorreator, estudos metabólicos (i.e. transição aeróbica/anaeróbica) e principalmente no monitoramento de bioprocessos. Esses sensores monitoram metabólitos NAD(P)H, cuja concentração revela informações sobre o estado metabólico das células. O princípio dos espectrofluorômetros se baseia na re-emissão de luz com mudança espectral, que algumas espécies químicas sofrem. Determinados comprimentos de onda são enviados ao meio reacional, excitando eletronicamente certas substâncias químicas. Ao retornar ao seu estado inicial, tais componentes emitem ondas de diferentes comprimentos que são filtradas por lentes e processadas por um sistema de aquisição de dados (SOLLE *et al.*, 2003; HITZMANN *et al.*, 1998). A Figura 2 ilustra o esquema de um espectrofluorômetro bidimensional.

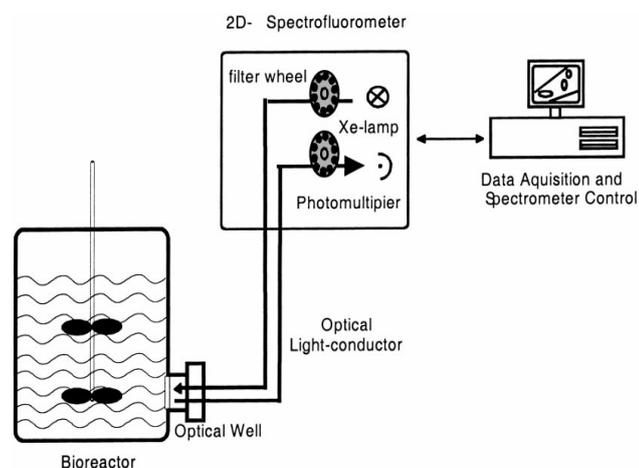


Figura 2. 2D-espectrofluorômetro. Fonte: SCHEPER *et al.* (1999)

Além da espectroscopia de fluorescência, outras técnicas são descritas na literatura para um monitoramento mais aprimorado em bioprocessos. O mais tradicional é a cromatografia que permite quantificar a concentração de espécies químicas (VOGEL & TODARO, 1997). A cromatografia gasosa é mais utilizada para componentes leves, enquanto que a líquida é mais utilizada em bioprocessos. As maiores desvantagem da cromatografia estão relacionadas à necessidade de retirada de amostras do meio e ao considerável tempo de atraso inerente ao método de análise. Exemplos da utilização de HPLC (*high performance liquid chromatography*), para a quantificação de etanol em processos fermentativos, são os trabalhos de

MAHECA-BOTERO *et al.* (2006) e DAVIS *et al.* (2006), ambos utilizam a coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H.

Análises de espectroscopia de infravermelho (*infrared*) também são propostas e baseiam-se no princípio de que cada estrutura química tem uma forma e tamanho característico na banda de absorção (devido a vibrações específicas de ligações químicas que correspondem a níveis de energia ou níveis vibracionais). Devido a interferências e similaridades entre as bandas, são necessários avançados métodos de análise de dados (i. e., calibração de modelos multivariáveis). A espectroscopia de infravermelho de baixo comprimento de onda (700-1100 nm) pode ser utilizada para monitoramento da concentração de etanol em fermentadores, por exemplo, com a utilização de cabos de fibra ótica (MAZAREVICA *et al.*, 2004).

Outro método de identificação é a chamada espectroscopia de Raman, que baseia-se numa técnica fotônica de alta resolução baseada na dispersão de luz monocromática em determinada frequência. A luz que se mantém na frequência original é chamada de dispersão de Rayleigh e não revela informações sobre a estrutura química do material. A luz que muda de frequência é chamada de dispersão de Raman e revela informações sobre a composição do material analisado (SHAW & KELL, 1999).

A característica comum entre essas técnicas é que praticamente todas necessitam da análise de dados por métodos avançados (i. e., regressões multivariáveis) e existem poucos trabalhos na literatura que descrevem o monitoramento em tempo real de bioprocessos por espectroscopia de infravermelho ou de Raman. Dentre os métodos não invasivos, a espectroscopia de fluorescência 2D é a técnica que mais vem chamando atenção, nos últimos anos, quando o assunto é determinação em tempo real de informações ligadas ao estado metabólico de sistemas fermentativos. Essa análise possibilita a geração de inúmeros dados, que associados a técnicas de aprendizagem de máquina e mineração de dados (PCA, ICA, PCR, PLS, QPLS, redes neuronais, etc.) podem determinar: transições aeróbicas/anaeróbicas, concentrações de espécies químicas (substrato, produto, etc.) e biológicas (biomassa), através do monitoramento de metabólitos NAD(P)H.

3 Monitoramento por Espectrofluorimetria 2D

Sensores de fluorescência são instrumentos que utilizam cabos de fibras óticas e vêm sendo investigados na última década para diferentes aplicações na biotecnologia: determinação da concentração de biomassa, caracterização do biorreator, estudos metabólicos, etc. (SCHEPER *et al.*, 1999). Esse sensor permite o monitoramento de metabólitos NAD(P)H cuja concentração revela informações sobre o estado metabólico celular.

A espectroscopia de fluorescência, também conhecida como espectrofluorimetria, analisa a fluorescência de uma amostra como resultado de um processo emissão/re-emissão de luz de baixa energia, normalmente luz ultravioleta. O fundamento do método é baseado na excitação do meio, através de diferentes

comprimentos de onda, que absorve uma parte da energia da luz e re-emite luz com diferentes comprimentos de onda (VOGEL *et al.*, 2002). E luz re-emitada é proporcional a concentração de espécies químicas do meio analisado.

É essencial a utilização de analisadores virtuais ou estimadores de estado para traduzir o que é lido on-line pelo espectroscópio em informação útil à operação do sistema. Um espectro completo pode ser gerado em aproximadamente um minuto, em um 2D-espectrofluorômetro. Na figura 3 são vistos os fluoróforos biogênicos capazes de serem detectados por espectroscopia de fluorescência 2D. O número de informações gerado por tal equipamento é extremamente alto. Se uma varredura completa de espectro é realizada a cada 10 minutos, são gerados aproximadamente 150.000 pontos de medida (o equivalente a 1,5 MB) em 24 horas. Para filtrar o elevado número de informação são utilizadas técnicas de regressão multivariável, redes neurais, PCA, PLS, etc. Em outras palavras analisadores virtuais vêm sendo empregados no tratamento das informações produzidas por espectrometria em 2D. Esses modelos são chamados de *chemometric models* (SOLLE *et al.*, 2003; HITZMANN *et al.*, 1998).

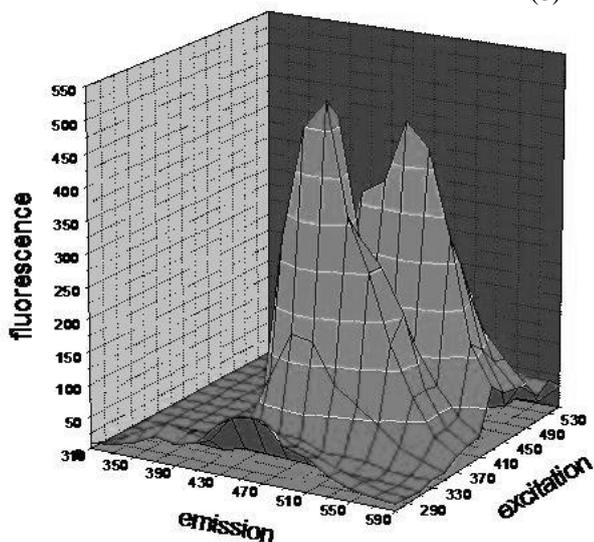
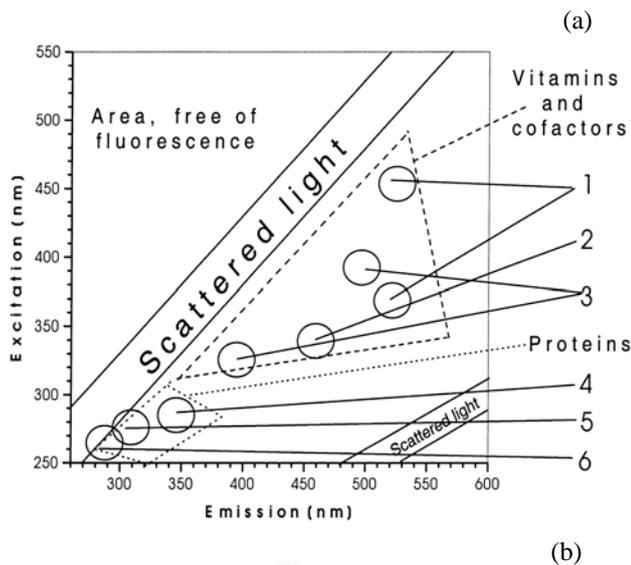


Figura 3. Fluoróforos capazes de serem determinados por espectroscopia 2D (a) e espectro gerado pelo equipamento (b). Fonte: SCHEPER *et al.* (1999)

4 Aplicações da Espectrofluorimetria 2D

Uma série de publicações vem reportando aplicações de 2D-espectrofluorescência em processos biotecnológicos. Em BOEHL *et al.* (2003) técnicas de espectroscopia de fluorescência são empregadas com sucesso na predição de biomassa, proteínas e concentração de alcalóides durante o cultivo fúngico de *Claviceps purpurea*, para a produção de fármacos. FRITZSCHE *et al.* (2007) utiliza análises espectrais e chemometric models para monitoramento de pH, onde a medida pode ser calculada independentemente da intensidade absoluta e da temperatura da amostra. No trabalho de SURRIBAS *et al.* (2006) é avaliado o desempenho da espectroscopia 2D para a estimação de variáveis de estado da fermentação (concentração de biomassa, substrato e produto). BOEHL *et al.* (2001) mostram a possibilidade da aplicação do método não-invasivo na determinação de diversas variáveis simultaneamente, através de modelos gerados pela técnica PLS (*Partial Least Square*), na produção de cerveja. Um artigo muito interessante é o de GEISLER *et al.* (2003), onde são apresentados resultados da predição da concentração de substrato, biomassa e produto através de dados provenientes de espectrofluorescência 2D para a fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados podem ser visualizados na Figura 4, onde a linha contínua representa a predição e os pontos medidas *off line* (resultado de análises de laboratório).

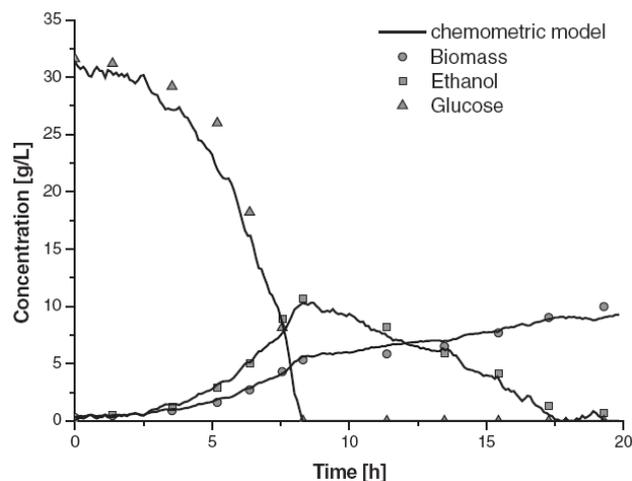


Figura 4. Predição de variáveis do processo utilizando um *chemometric model* filtrando dados de um espectrofluorômetro 2D e medidas *off line* (pontuais) das variáveis. Fonte: GEISLER *et al.* (2003)

5 Considerações Finais

Muitos desafios surgem quando o assunto é o monitoramento de bioprocessos. Primeiramente surgem dificuldades relativas à manutenção estéril dos equipamentos, e em segundo lugar em relação à complexidade do meio analisado que dificulta a quantificação em tempo real de variáveis chave do processo. Frente a essa realidade alguns métodos de monitoramento são propostos na literatura, no entanto a técnica que mais vem chamando atenção é a espectroscopia de fluorescência bidimensional por ser uma técnica não-invasiva capaz de revelar informações sobre o

estado metabólico do meio analisado sem inserir tempo morto no sistema. A espectrofluorimetria 2D gera muitas informações sobre o processo, porém essas informações precisam ser transformadas em conhecimento do processo. Para tanto, torna-se necessária a utilização de técnicas de interpretação de dados, baseadas em modelos matemáticos (analisadores virtuais, estimadores de estado, etc.). Assim, associando a espectrofluorimetria bidimensional com técnicas de análise de dados é possível se monitorar em tempo real diversas características de bioprocessos. Como resultado disso é possível aprimorar sistemas de controle com uma realimentação de melhor qualidade; monitorar parâmetros chave que revelem informações sobre conversão, produtividade, consumo de substrato, etc.; identificar melhores modelos matemáticos do processo; implementar técnicas de otimização em tempo real; entre outros benefícios.

5. Referências

- AYNSLEY M.; HOLFLAND A.; MORRIS 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.; TOUSSAINT H. J.; LINDERMANN C.; HITZMANN B.; SCHEPER T. Use of fluorescence spectroscopy for the monitoring of beer brewing processes. *G.I.T. Laboratory Journal*, 2001.
- DAVIS L.; ROGERS P.; PEARCE J.; PEIRIS P. Evaluation of Zymomonas-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream. *Biomass and Bioenergy* 30, pp. 809- 814, 2006.
- 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.
- FRITZSCHE M.; BARREIRO C. G.; HITZMANN B.; SCHEPER T. Optical pH sensing using spectral analysis. *Sensors and Actuators*. Elsevier, 2007.
- GEISSLER D.; SOLLE D.; STÄRK E., SCHEPER T.; MÂRKL H.; HITZMANN B. A new evaluation method for 2-D fluorescence spectra based on theoretical modeling. *Engineering Life Science* 3, pp. 397-400. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003.
- HALTELMANN K.; KOLLECKER M.; HÜLL D.; HITZMANN B.; SCHEPER T. Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a novel approach for controlling fed-batch cultivations. *Journal of Biotechnology*, 121, p. 410-417. Elsevier, 2006.
- HITZMANN B.; PEKELER T.; LINDERMANN C.; MAROSE S.; 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.
- KOUTINAS A. A.; WANG R.; WEBB C. Restructuring upstream bioprocessing: technological and economical aspects for production of a generic microbial feedstock from wheat. *Biotechnology and Bioengineering* 85, 524-538, 2004.
- LIU Y. C.; WANG F. S.; LEE W.C., On-line monitoring and controlling system for fermentation processes. *Biochemical Engineering Journal* 7, p. 17-25. Elsevier, 2001.
- LYND L. R.; WYMAN C. E., GEMGROSS T. U. Biocommodity engineering. *Biotechnology Progress* 15, 777-793, 1999.
- MAHECA-BOTERO A.; GARHYAN P.; ELNASHAINE S. S. E. H. Non-linear characteristics of a membrane fermentor for ethanol production and their implications. *Nonlinear Analysis: Real World Applications* 7, 432-457, 2006.
- MAZAREVICA G.; DIEWOK J.; BAENA J. R.; ROSENBERG E.; LENDL B. On-line fermentation monitoring by mid-infrared spectroscopy. *Appl. Spec.* 58, pp. 804-810, 2004.
- MCMILLAN G. K. *Process/industrial instruments and controls handbook*. McGraw-Hill Companies, Inc., 5 ed. New York, 1999.
- SCHEPER T.; HITZMAN B.; STÄRK E.; ULBER R.; FAURIE R.; SOSNITZA P.; REARDON K. F. Bioanalytics: detailed insight into bioprocesses. *Analytica Chimica Acta*, 400, p. 121-134. Elsevier, 1999.
- SHAW A. D.; KELL J. J. Noninvasive on-line monitoring of the biotransformation by yeast of glucose to ethanol using dispersive Raman spectroscopy and chemometrics. *Appl. Spec.* 53, pp. 1419-1428, 1999.
- SOLLE D.; GEISSLER D.; STÄRK E.; SCHEPER E.; HITZMANN B. Chemometric modelling based on 2D-fluorescence spectra without a calibration measurement. *Bioinformatics*, 2, vol. 19, p. 173-177. Oxford University Press, 2003.
- STANBURY P. F.; WHITAKER A.; HALL S., *Principles of fermentation technology*. 2 ed., Elsevier Science Ltd., Burlington, 1995.
- SURRIBAS A.; GEISSLER 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*, 124, p. 412-419. Elsevier, 2006.
- VOGEL A. R.; MENDHAM J.; DENNEY R. C.; BARNES J. D.; THOMAS M. *Análise Química*

Quantitativa 6 ed, Editora LTC, 2002.

VOGEL H.; TODARO C. *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook*. 2.ed. Naves Publ., 1997.

WEBSTER J. G. *Measurement, instrumentation, and sensors handbook*. CRC Press LLC, New York, 1999.

YAMUNA RANI K.; RAMACHANDRA RAO V. S. Control of fermenters – a review. *Bioprocess Engineering* 21, 77-88, 1999.

ZVERLOV V. V.; BEREZINA O.; VELIKODVORSKAYA G. A.; SCHAWARZ W. H. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hidrolized agricultural waste for biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 587-597, 2006.