



## Utilização de espectroscopia Raman no monitoramento de fermentação alcoólica em microrreatores

Gabriel Vitor Guari de Almeida\*, Adriano G.P. da Silva, Harrson S. Santana e Osvaldir Pereira Taranto

### 1. Introdução

A microfluídica é definida como a ciência a qual estuda escoamento de fluidos em pequenas quantidades, em estruturas com dimensões de dezenas a centenas de micrômetros, e que apresenta como principais vantagens o baixo custo de fabricação, elevadas transferência de calor e área superficial, tempo de reações menores e menor utilização de reagentes e amostras (Fogler, 2016; Whitesides, 2006).

Em trabalhos anteriores, o grupo de pesquisa buscou investigar a síntese de biodiesel em microrreatores, desenvolvendo técnicas tanto de modelagem quanto de simulação no processo de síntese de biodiesel em microescala e, com a aplicação destas técnicas, foi possível a visualização da influência na eficiência reacional de diversos fatores e variáveis de processo (Santana *et al.*, 2017; Santana *et al.*, 2016; Santana *et al.*, 2015, Yeh *et al.*, 2016). Comparou-se então os resultados obtidos com dados experimentais, possibilitando assim que o grupo desenvolvesse micromisturadores mais eficientes para a síntese do biodiesel. Paralelamente, o grupo também estuda a aplicação de novas técnicas de fabricação na construção destes microdispositivos, com maior enfoque na impressão 3D.

Outro ramo de aplicações que vem sendo estudado pelo grupo é a fermentação alcoólica de vinho, avaliando a influência das condições de processo no rendimento na produção de etanol. As reações de fermentação alcoólica consistem na conversão de açúcares, como glicose e frutose, em etanol devido à ação de leveduras. Estudos conseguiram indicar a rapidez em que ocorrem as reações quando utilizados microrreatores em processos microbiológicos envolvendo fermentação Brás *et al* (2016). Mostrando também a estabilidade do método, Seo *et al* (2012) conseguiram imobilizar leveduras utilizando ligações covalentes na superfície de um microrreator.

O estudo das variáveis em ambos os processos são dadas principalmente por meio de análises de Cromatografia Gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Estas técnicas, contudo, são caracterizadas como *off-line*, no qual retiram-se amostras para análise, impossibilitando o monitoramento em tempo real da reação, bem como a alteração de suas condições com o uso de controladores. Sendo assim, uma forma de contornar este empecilho é o uso de técnicas alternativas e de preferência com menores custos, como a espectroscopia de absorção no ultravioleta (comprimentos de onda entre 100 - 400 nm) e visível (comprimentos de onda entre 400-800 nm) e, principalmente a espectroscopia Raman, sendo estas tecnologias de tempo real e com um menor custo de aquisição dos equipamentos necessários. A técnica escolhida então pelo foi a do Raman.

A espectroscopia Raman consiste na dispersão Raman inelástica de um laser de luz monocromática, com uma faixa compreendendo do visível até próximo ao ultravioleta. O laser interage com vibrações moleculares, fônons ou outras excitações, resultando em informações sobre os modos vibracionais, permitindo assim a caracterização e interpretação direta de diferentes moléculas. Esta técnica, portanto, tem uma grande vantagem residindo na sua capacidade de fornecer dados com facilidade e rapidez, sem a necessidade de serem retiradas amostras, sendo uma técnica não destrutiva (Goh *et al*, 2017).

### 2. Objetivos

O projeto teve como objetivo geral o monitoramento em tempo real da reação de fermentação alcoólica em microdispositivos utilizando a técnica de espectroscopia Raman. Para tal, os objetivos específicos estabelecidos foram: estimar o rendimento da produção de etanol no processo de fermentação, de acordo com as variáveis concentração de leveduras e tempo de residência, bem como a comparação e validação da metodologia Raman com os métodos usualmente utilizados.

### 3. Materiais e Métodos

Os microrreatores utilizados pelo aluno foram criados com software *Autodesk Inventor* e fabricados utilizando a impressora Sethi3D S3 a partir de ácido polilático (PLA). O equipamento utilizado para a obtenção de espectros Raman foi o espectrômetro *Ava-Raman-C* da Avantes (*AvaSpec – ULS20481-TEC-RS-USB2*), com laser de comprimento de onda de 785 nm.

Para a obtenção dos espectros, a configuração do espectrômetro foi: tempo de integração de 20 segundos, 3 médias e potência do laser de 500 mV. Para a análise em batelada para testes, preparava-se as soluções de diferentes concentrações para a obtenção das curvas de calibração, e estas eram uma a uma colocadas em uma cubeta de quartzo, que era inserida em um suporte desenvolvido para o laser e então analisadas.

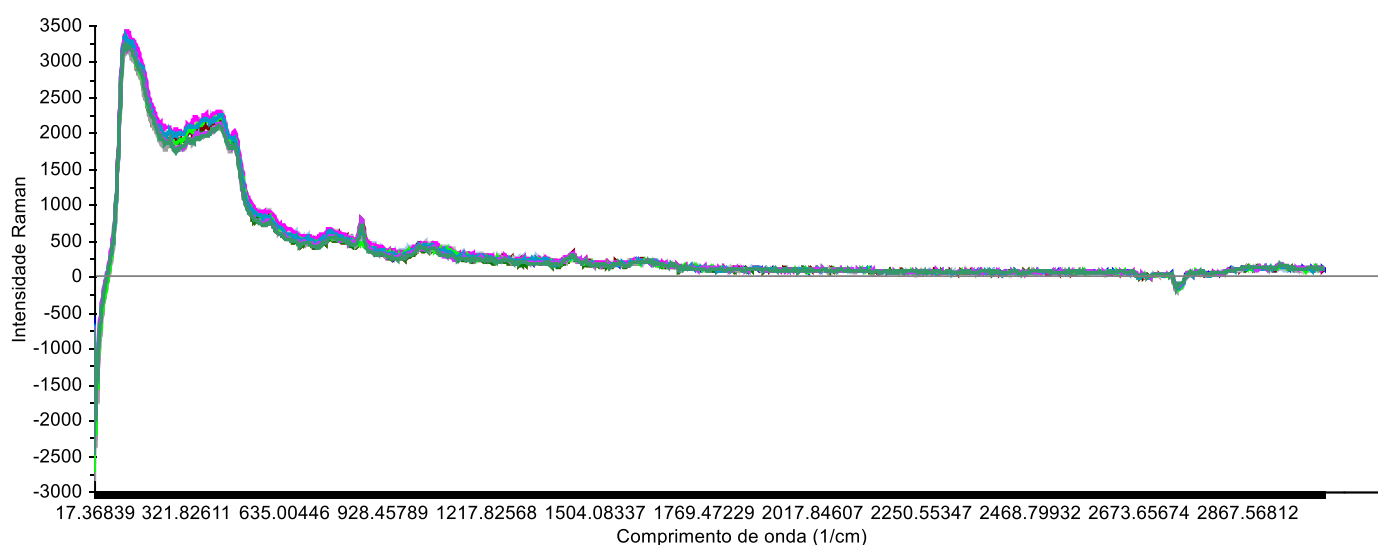
Foram realizadas a construção de curvas de calibração para modelar o que ocorre durante a reação de fermentação alcoólica: leveduras *Saccharomyces cerevisiae* presentes numa solução com glicose e água convertem, através do processo de fermentação, a glicose em etanol e gás carbônico. Assim, para o monitoramento desta reação de modo *online* com o uso do Raman, era necessária a criação de um modelo que pudesse captar e quantificar a presença dos três principais componentes a serem estudados presentes durante a reação: as leveduras e a glicose consumida, e o etanol formado subsequentemente. Para isso foram preparadas inicialmente 11 amostras com etanol e glicose para treinamento do aluno e, posteriormente, 16 amostras com os três componentes para a leitura no Raman, todos em batelada.

Os espectros foram obtidos através do software *Avasoft 8*, disponibilizado pela fabricante do equipamento. O tratamento dos dados foi realizado com o software *The Unscrambler X*, buscando obter um modelo que pudesse quantificar as concentrações de glicose, etanol e leveduras numa amostra a partir dos dados de intensidade do pico e comprimento Raman, utilizando a regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), devido a presença de diversas variáveis que influenciam os espectros obtidos e que, com este método, podem ser preditas com um único modelo para cada componente. Por fim, foi analisada sua eficácia a partir do valor do coeficiente  $R^2$  obtido para modelo.

### 4. Resultados e discussões

Para as 11 amostras preparadas contendo glicose e etanol para treinamento do aluno e comprovação da eficácia da técnica Raman, os espectros obtidos encontram-se na Figura 1 a seguir, e os modelos das curvas de calibração para cada componentes encontram-se dispostos na Tabela 1.

**Figura 1.** Espectros obtidos para as 11 amostras da solução com etanol e glicose, sem tratamento.

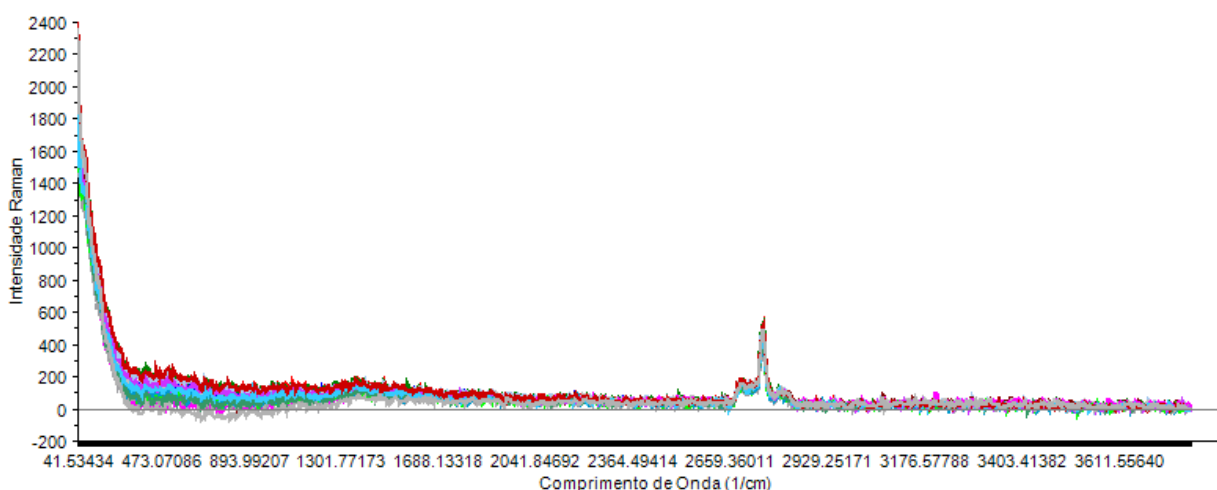


**Tabela 1.** Coeficientes de determinação para os melhores modelos obtidos para as curvas de calibração para as substâncias glicose e etanol

Substância	Faixa do espectro	Tratamento	R <sup>2</sup> C	R <sup>2</sup> V
Glicose	0 - 1700 cm <sup>-1</sup>	Nenhum	0,995	0,906
Etanol	0 - 1700 cm <sup>-1</sup>	Baseline	0,994	0,871

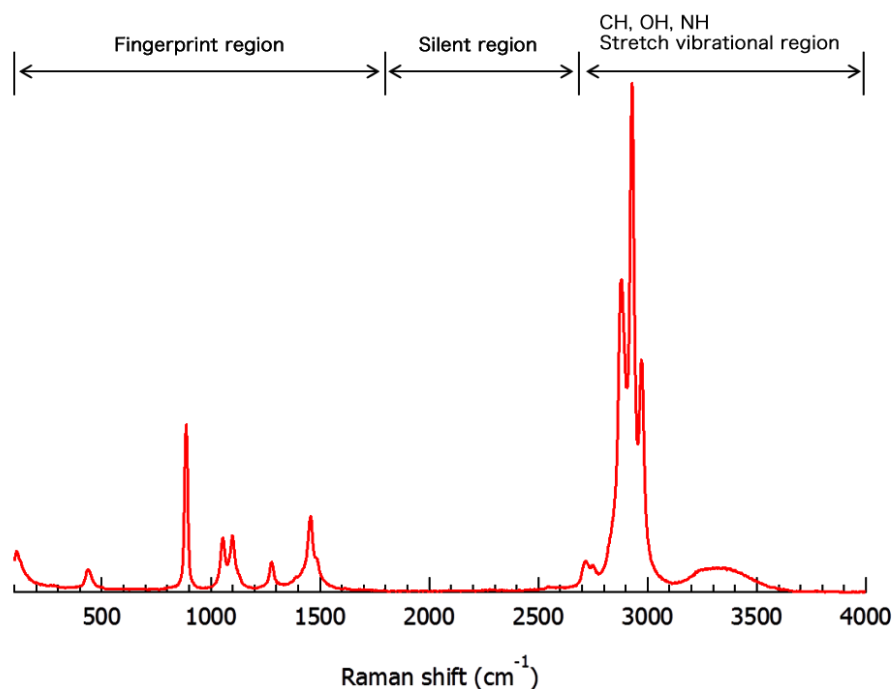
Com os dados da Tabela 1, é possível ver que a espectroscopia Raman gerou bons modelos preditivos em batelada tanto para a glicose quanto para o etanol, com valores de coeficiente de determinação muito próximos a 1 para a calibração para ambas as substâncias, e muito próximos de 0,9 e, portanto, altos, para a validação também em ambos os casos.

Feito isto, o próximo passo foi a busca de um modelo que pudesse prever de maneira adequada as concentrações de etanol e glicose durante o processo de fermentação, que conta também com a presença de leveduras no sistema. Para isso, foram utilizadas 16 amostras com diferentes concentrações e massas de etanol, levedura e glicose. As medidas também foram tomadas em batelada, facilitando assim a execução destes testes iniciais que visam principalmente analisar a resposta do Raman em um sistema com a presença das leveduras, e não o andamento da reação num primeiro momento. O resultado encontra-se na Figura 2:



**Figura 2.** Espectros obtidos para as 16 amostras contendo etanol, glicose e leveduras, sem tratamento.

Analisando a Figura 2, é possível ver que o espectro não é muito claro. Isto ocorre principalmente devido a interferência das leveduras no espectro. Como afirma Jiang *et al* (2020), a fermentação com leveduras é um complexo sistema no qual diversos produtos secundários são formados nutrientes são consumidos, num sistema com vários fatores diferentes que influenciam na análise quantitativa do processo de fermentação, tornando-a imprecisa e com a necessidade de tratamentos não lineares, como o método PLS. Embora as leveduras interfiram no espectro, é possível reconhecer na Figura 2 picos característicos do espectro Raman de etanol: entre 2700 e 3000 há as bandas referentes ao alongamento das ligações de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> (Godinho *et al*, 2016) de forma semelhante ao mostrado na Figura 4:



**Figura 4.** Espectro Raman de etanol em solução (Fonte: Nanophoton.com)

Na Tabela 2 encontram-se os valores do coeficiente de determinação para os modelos obtidos para cada componente a partir do espectro contido na Figura 3:

**Tabela 2.** Coeficientes de determinação para os melhores modelos obtidos para as curvas de calibração para a reação de fermentação

Substância	Faixa do espectro	Tratamento	R <sup>2</sup> C	R <sup>2</sup> V
Glicose	2500 - 3000 cm <sup>-1</sup>	Normalização	0,978	0,088
Etanol	2500 - 3000 cm <sup>-1</sup>	Baseline	0,983	0,240
Leveduras	2500 - 3000 cm <sup>-1</sup>	1 <sup>a</sup> derivada	0,998	0,462

Analisando os resultados contidos na Tabela 2, percebe-se que os valores do coeficiente de determinação de calibração das três substâncias foram satisfatórios, indicando uma boa adequação do modelo aos dados. Porém, os valores do R<sup>2</sup> de validação foram todos baixos, com o maior dentre eles ainda com um valor inferior a 0,5. Isto mostra que, embora haja potencial nos modelos obtidos, eles também são passíveis de melhorias, como a obtenção de espectros num tempo menor para que as condições na qual se encontram as leveduras (inicialmente mantidas a baixas temperaturas para que não iniciem o processo de fermentação) sejam iguais em todos os pontos e não haja reação ao longo da obtenção da curva.

## 5. Conclusões

Ao longo do projeto houve o desenvolvimento de habilidades na modelagem e impressão de microrreatores com o uso de softwares de design e impressoras 3D, explorando assim as diversas vantagens possibilitadas pela microfluídica e incorporando ferramentas que serão cada vez mais comuns num futuro próximo.

O trabalho apresentou resultados promissores quanto a utilização da espectroscopia Raman, um método mais rápido e não destrutivo, para análises quantitativas que atualmente são feitas em sua maioria com técnicas destrutivas e offline. A partir dos testes realizados, pôde-se obter curvas de calibração através do método PLS para dois sistemas: solução com etanol e glicose e solução com etanol glicose e levedura, sendo o modelo obtido para este último contendo os principais componentes envolvidos na reação de fermentação.

Por fim, com os resultados deste projeto mostraram-se positivos ainda que passíveis de melhoria, bem como diversos exemplos bem-sucedidos encontrados na literatura, pode-se afirmar que a espectroscopia Raman tem

um enorme potencial ainda inexplorado, sendo uma técnica rápida e de simples aplicação que pode contribuir e muito na expansão dos limites conhecimento nas mais diversas áreas da ciência.

## 6. Agradecimentos

Agradeço ao CNPQ pelo suporte à minha pesquisa, ao Professor Dr. Osvaldir Pereira Taranto, ao Dr. Harrison S. Santana e ao Doutorando Adriano G.P. da Silva pelo apoio e pela orientação durante o trabalho.

## 7. Referências

BRÁS, E. J., CHU, V., AIRES-BARROS, M. R., CONDE, J. P. AND FERNANDES, P. (2017), A microfluidic platform for physical entrapment of yeast cells with continuous production of invertase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 92: 334–341.

FOGLER, H. S. *Elements of chemical reaction engineering*. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall PTR, 2006.

GODINHO, R. B. SANTOS, M. C. POPPI, R. J. Determination Of Fragrance Content In Perfume By Raman Spectroscopy And Multivariate Calibration. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 157, 15 March 2016, pp. 158-163.

GOH P.S., ISMAIL A.F., NG B.C., 2017, RAMAN SPECTROSCOPY, CHAPTER IN: N HILAL ETAL.,(Ed), Membrane Characterization, Part 1, Chapter 2, Universiti Teknologi Malaysia, Johor Bahru, Johor, Malaysia, 31-46.

HUI JIANG, WEIDONG XU, YUHAN DING. Quantitative analysis of yeast fermentation process using Raman spectroscopy: Comparison of CARS and VCPA for variable selection. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 5, Março de 2020.

SANTANA H.S.; TORTOLA, D.S.; SILVA JR. J.L.; TARANTO, O.P. Biodiesel synthesis in micromixer with static elements. *Energy Conversion and Management*, v. 141, p. 28-39, 2017.

SANTANA, H. S.; SILVA Jr, J. L.; TARANTO, O. P. Numerical simulations of biodiesel synthesis in microchannels with circular obstructions. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 98, p. 137-146, 2015.

SANTANA, H. S.; TORTOLA, S.; REIS, É. M.; SILVA, J. L.; TARANTO, O. P. Transesterification reaction of sunflower oil and ethanol for biodiesel synthesis in microchannel reactor: Experimental and simulation studies. *Chemical Engineering Journal*, v. 302, p. 752-762, 2016a.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. *Journal Brazilian Chemistry Society*, v. 9(1) p. 199-210, 1998.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, v. 442, p. 368-373, 2006.

YEH SI, HUANG YC, CHENG CH, CHENG CM, YANG JT. Development of a millimetrically scaled biodiesel transesterification device that relies on droplet-based coaxial fluidics. *Sci Rep-UK* 2016;6:29288.