

Uso da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) para predição rápida de concentração de etanol em fermentados

Marcelo Lazzarotto¹

Patrícia Raquel Silva²

Bruna Pugsley³

Fabício Augusto Hansel⁴

Washington Luiz Esteves Magalhães⁵

O avanço das pesquisas relacionadas à produção de biocombustíveis é estratégico para o Brasil e será decisivo para promover o desenvolvimento sustentável do planeta e garantir a segurança energética do País. Neste contexto, o etanol tem sido uma das áreas prioritárias. Possui participação de destaque não só no cenário interno, representando 12,5% do consumo de energia em transportes em 2012 (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2013), mas também no cenário externo, pois o País é o principal exportador de etanol do mundo.

Atualmente, a produção mundial de etanol baseia-se no uso de matérias-primas açucaradas (como a cana-de-açúcar no Brasil) ou amiláceas (como o milho nos Estados Unidos). No entanto, as matérias-primas lignocelulósicas também apresentam grande potencial de utilização, sendo um dos grandes desafios o desenvolvimento de tecnologias eficientes para disponibilização e uso dos açúcares presentes nas estruturas da celulose e da hemicelulose (JARDINE et al., 2009). A obtenção de etanol lignocelulósico envolve três

etapas principais: (i) pré-tratamento; (ii) hidrólise; e (iii) fermentação (HAMELINCK et al., 2005; LIMAYEM; RICKE, 2012). A primeira etapa tem como objetivo principal aumentar a eficiência do processo de hidrólise, promovendo a quebra ou remoção da lignina e/ou da hemicelulose, aumentando a área superficial e diminuindo a cristalinidade da celulose (LIMAYEM; RICKE, 2012; MOSIER et al., 2005; WYMAN et al., 2005). Na etapa de hidrólise, os polissacarídeos (celulose e, eventualmente, hemicelulose) são convertidos em monossacarídeos, com o auxílio de ácidos ou enzimas denominadas celulasas (JARDINE et al., 2009; LIMAYEM; RICKE, 2012; TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Os açúcares gerados na hidrólise passam por um processo de fermentação biológica para a produção de etanol (GALBE; ZACCHI, 2002; JARDINE et al., 2009; LIMAYEM; RICKE, 2012).

Muitos desafios persistem para a consolidação desta tecnologia que, uma vez ultrapassados, permitirão o aproveitamento não só de biomassas lignocelulósicas brutas, mas principalmente de diversos tipos de resíduos agroindustriais e

¹Químico, Doutor, Pesquisador da Embrapa Florestas, marcelo.lazzarotto@embrapa.br

²Engenheira química, Doutora, Pesquisadora da Embrapa Florestas, patricia.silva@embrapa.br

³Bacharel em Biotecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, brupugsley@hotmail.com

⁴Químico, Doutor, Pesquisador da Embrapa Florestas, fabicio.hansel@embrapa.br

⁵Engenheiro químico, Doutor, Pesquisador da Embrapa Florestas, washington.magalhaes@embrapa.br

florestais. Como exemplo, cita-se a produção de etanol celulósico a partir de lodos de reciclagem de papel como forma de agregar valor a este resíduo, reduzindo os custos e os impactos ambientais causados por sua disposição em aterros.

Para subsidiar os estudos e acompanhamento das fermentações etanólicas, normalmente é necessária a realização de grande número de análises de etanol. Uma das técnicas mais usadas para esta finalidade é a cromatografia gasosa ou líquida, que em geral envolve custos e tempos elevados de análise. Como alternativa para o monitoramento da produção de etanol em fermentados, Blanco et al. (2004) sugerem a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), obtendo alta correlação para as predições das concentrações de etanol, glicose e biomassa usando modelos de calibração baseados em mínimos quadrados parciais (PLS). Recentemente a mesma técnica foi usada como ferramenta para avaliação rápida e eficiente na seleção de leveduras recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*, capazes de fermentar xilose além de glicose. As vantagens da aplicação do NIR incluem a economia, praticidade e a agilidade para análise de grande número de amostras (LUPOI et al., 2014; MORITA et al., 2011). A sua aplicação no monitoramento de fermentações permite a quantificação em tempo real de diferentes componentes, sem exigir um exaustivo preparo de amostra (CERVERA et al., 2009; LUPOI et al., 2014) de maneira não invasiva nem destrutiva (BLANCO et al., 2004; LUPOI et al., 2014).

O objetivo deste trabalho é o de adaptar uma metodologia para predição do teor de etanol em soluções oriundas de processos de hidrólise e fermentação usando-se quimiometria e espectrometria na região do infravermelho próximo.

Fermentações para a produção de etanol

Três substratos foram comparados: glicose anidra, polpa de celulose branqueada e lodo gerado no tratamento de efluentes de uma indústria de reciclagem de papel. Todas as amostras analisadas foram testadas na concentração aproximada de 30 g L⁻¹ de glicose equivalente. Considerando os teores de carboidratos presentes em cada material, as concentrações de substrato utilizadas foram: 238 g L⁻¹, 32,6 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹, para lodo, polpa e glicose, respectivamente. Os experimentos de fermentação foram realizados em duplicata.

Como meio de fermentação, foi utilizada uma solução contendo 0,5 g L⁻¹ extrato de levedura, 0,9 g L⁻¹ NaH₂PO₄, 0,25 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O e 4,5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ (pH 5), e para o caso do lodo também foi testada uma solução tampão de acetato de sódio pH 4,4. Pretendia-se avaliar o efeito do controle do pH na fermentação do lodo, já que seus compostos podem elevar o pH do meio, prejudicando o rendimento do processo. Para a etapa de multiplicação celular, empregou-se meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) composto por 20 g L⁻¹ glicose anidra, 10 g L⁻¹ extrato de levedura e 20 g L⁻¹ peptona bacteriológica.

Inicialmente, foi realizada a ativação em meio YPD com 1 g L⁻¹ da levedura *Saccharomyces cerevisiae* JP1 em incubadora a 30 °C com agitação orbital de 150 rpm durante 16 h. Posteriormente, adicionaram-se 3 mL do inóculo e 6% (massa enzima/massa holocelulose) de um coquetel enzimático comercial (para polpa e lodo) em todos os Erlenmeyers contendo 100 mL do meio de fermentação e dos substratos. A enzima foi gentilmente cedida pela empresa Novozymes e consistia de uma mistura de celulases, hemicelulase e alto teor de β-glucosidases. As amostras foram incubadas a 30 °C e 150 rpm por 96 h. Por fim, foi feita a centrifugação por 10 min a 5.000 rpm, seguida de filtração em membrana de 0,45 μm e realização das análises de etanol. Ao longo dos experimentos as amostras eram armazenadas a -20 °C.

Análise de etanol por cromatografia gasosa

O etanol foi determinado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). As amostras e a curva padrão (10 pontos distribuídos entre 0,1 - 60 g L⁻¹) foram preparadas a partir da adição de 10 μL da solução a ser analisada mais 10 μL de uma solução do padrão interno isopropanol (4,7 g L⁻¹) em tubos de "headspace" de 20 mL. O tempo e a temperatura de incubação das amostras foram de 3 min e 105 °C. A cromatografia gasosa foi feita em equipamento Focus (Thermo) e os compostos foram separados com uma coluna capilar SGE BPX5 (60 m, 0,25 mm de diâmetro, 0,25 μm de espessura de filme), com a seguinte programação do forno: 40 °C com isoterma de 8 min, seguido de 25 °C min⁻¹ até 200 °C. Hélio em um fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹ foi utilizado como gás de arraste. O volume de 0,5 mL foi injetado no GC utilizando o modo de divisão de fluxo 1:200, sendo a temperatura do injetor de 200 °C.

Os compostos foram detectados pelo espectrômetro de massa de "ion trap" PolarisQ (Thermo) e as curvas de calibração foram preparadas a partir da área fornecida pela soma dos fragmentos m/z 31 e m/z 45 (etanol) e m/z 45 e m/z 61 (isopropanol, padrão interno). A temperatura da interface do CG-EM e da fonte de íons foram ambas de 200 °C. O potencial de elétron ionização foi mantido a 70 eV com variação de massa/carga (m/z) entre 10-350 no modo "full scan", o tempo total de ciclo foi de 0,42 s e a emissão de corrente de 250 mA.

Preparo das soluções para análise de NIR

Para a obtenção de espectros de NIR as amostras foram obtidas por adição de etanol em matrizes de amostras originais. As quantidades adicionadas de etanol foram feitas de maneira a se obter concentrações entre 3,63 g L⁻¹ e 59,25 g L⁻¹. Portanto, foram considerados implicitamente os efeitos de matriz, ou seja, possíveis interferências causadas por enzimas, leveduras ou outras substâncias decorrentes de reações bioquímicas em todos os meios de fermentação analisados.

Os meios obtidos ao final das fermentações foram utilizados como base para o preparo de outras soluções com concentrações diferentes de etanol. Cada meio foi utilizado para preparar cinco soluções com volume final de 10 mL, adicionando-se os seguintes volumes de etanol anidro: 0 mL, 0,15 mL, 0,3 mL, 0,45 mL e 0,6 mL. Considerando a concentração de etanol que foi determinada por CG-EM para cada meio de fermentação, foi possível calcular as concentrações das soluções resultantes.

Análises de infravermelho NIR

Os espectros na região do NIR foram obtidos usando o equipamento NIR 900 (FEMTO). Os espectros foram coletados com uma resolução de 1 nm entre os comprimentos de onda de 1.100 nm a 2.500 nm, no modo de absorção. Uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1mm foi usada como amostrador.

Construção dos modelos de calibração

Os modelos matemáticos utilizados foram mínimos quadrados parciais (PLS) e regressão linear múltipla (MLR) usando o programa Unscrambler® (CAMO AS, Norway) versão 10.3. O modelo foi obtido usando os tratamentos alisamento (polinomial de segunda ordem e 5 pontos de cada lado), normalização (*Max Normalization*) e primeira derivada (polinomial de segunda ordem e 5 pontos de cada lado).

O grupo de dados foi dividido em duas partes: 2/3 foram usados para a construção do modelo de calibração e o 1/3 restante para a validação externa. A seleção das amostras para o subgrupo de calibração foi realizada organizando-as em ordem ascendente de concentrações experimentais de etanol, em g L⁻¹, e selecionando duas amostras a cada três. O subgrupo de validação foi construído usando as amostras complementares. Este procedimento permite alto controle da variabilidade em cada subgrupo.

Para a construção do modelo MLR foram usadas as absorvâncias nos comprimentos de onda mais estatisticamente significativos. Estes foram revelados após seleção de variáveis espectrais, com a utilização do algoritmo Jack Knife, durante a construção do modelo PLS. Os comprimentos de onda com maior correlação com o teor de etanol são 1410, 1905, 2005, 2250 e 2315. Diversas combinações entre estes comprimentos de onda foram testadas. O modelo MLR com maior R² e menores erros SECV e SEP foi conseguido com os comprimentos 2249 nm e 2319 nm.

O processo de fermentação usado nos substratos resultou em soluções com variadas concentrações. Com a adição de etanol anidro foi possível aumentar a faixa de concentração de etanol avaliada pelo espectrofotômetro (Tabela 1).

Os espectros na região do NIR são típicos de solução alcoólica (Figura 1) e com o mesmo padrão dos espectros obtidos por outros pesquisadores (MORITA et al., 2011).

A curva de calibração construída usando PLS apresentou coeficiente de determinação (R²) de 0,99 e o erro de validação cruzada foi cerca de 1,51 g L⁻¹ para uma concentração de etanol média de 30,90 g L⁻¹.

A Figura 2 mostra os coeficientes de predição estatisticamente significativos em função dos comprimentos de onda, usando-se três variáveis latentes. Para a obtenção do teor de etanol basta realizar a soma algébrica dos coeficientes de predição multiplicados pelas respectivas absorvâncias após as operações de alisamento, normalização e primeira derivada do espectro.

Tabela 1. Concentrações de etanol usadas para elaboração do modelo de predição usando a espectroscopia no infravermelho próximo.

Volume de etanol adicionado para 10 mL de solução final com o fermentado	Concentração final de etanol em cada condição testada (g L ⁻¹)			
	Glicose/meio de fermentação	Polpa de celulose/meio de fermentação	Lodo/meio de fermentação	Lodo/solução tampão
0,00	12,67	3,63	6,56	6,95
0,15	24,31	15,41	18,30	18,68
0,30	35,96	27,19	30,03	30,41
0,45	47,60	38,97	41,77	42,14
0,60	59,25	50,75	53,51	53,87

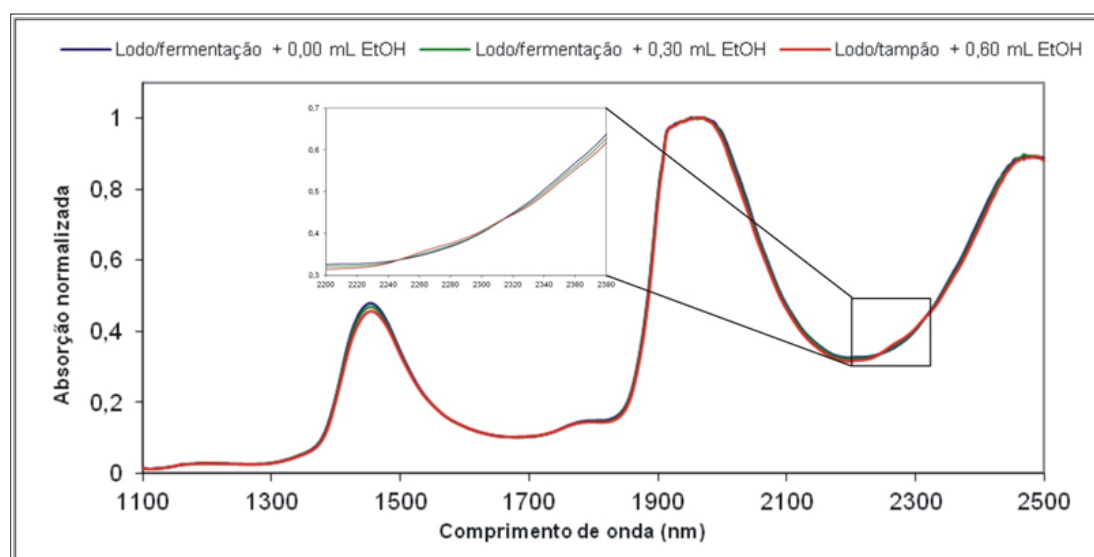


Figura 1. Espectros típicos de soluções alcoólicas obtidos para três concentrações de etanol. No detalhe, a região que os comprimentos de ondas entre 2200 nm e 2380 nm.

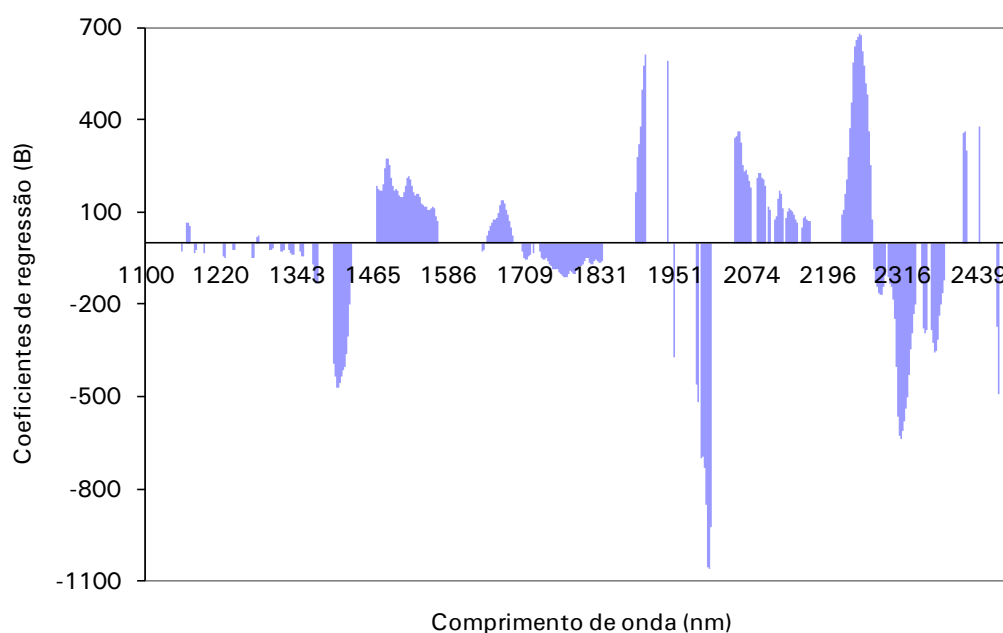


Figura 2. Coeficientes de predição do modelo PLS para cada comprimento de onda. O coeficiente independente B₀ é igual a 96,93 g L⁻¹. São mostrados apenas os coeficientes usados no modelo após a seleção de variáveis espectrais, com a utilização do algoritmo Jack Knife.

A curva de calibração obtida foi testada com amostras que não participaram na construção da curva de calibração (predição externa). O erro padrão de predição encontrado foi de 1,25 g L⁻¹, com um coeficiente de determinação R² de 0,99, sendo o número de amostras usadas nessa validação externa igual a 6. A Figura 3 mostra os valores das concentrações de etanol determinados pelo CG/EM versus os valores preditos pela técnica NIR para a validação externa do modelo construído. Os principais parâmetros do modelo de calibração usando PLS e da sua validação externa estão sumarizados na Tabela 2.

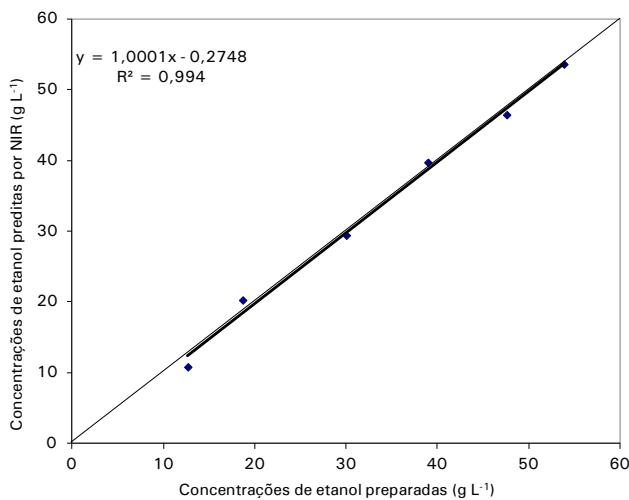


Figura 3. Valores de concentrações de etanol após adição e preditos através do infravermelho próximo (NIR), usando o modelo PLS com amostras externas àquelas usadas na calibração.

Tabela 2. Resultados das análises estatísticas para os grupos de calibração e predição para as concentrações de etanol usando o modelo PLS.

Parâmetros	Grupo de calibração	Grupo de predição externa
Número de amostras	13	6
Mínimo (g L ⁻¹)	3,63	12,67
Máximo (g L ⁻¹)	59,25	53,87
Média (g L ⁻¹)	31,48	33,64
SD (g L ⁻¹)	17,72	16,18
R ²	0,99	0,99
RMSE (g L ⁻¹)	0,77	1,18
SE (g L ⁻¹)	0,80	1,25
SD/SE	22,15	12,94

SD = desvio padrão; R² = coeficiente de determinação; RMSE = erro quadrático; SE = erro padrão.

A avaliação da qualidade de ajuste da curva de predição pode ser inferida, dentre outros parâmetros, pela razão de performance que é a razão entre o desvio padrão da amostra na análise convencional

e o erro de predição, fornecido pelo método quimiométrico (RDP = SD/SE, Tabela 2). Esta razão avalia o quanto a técnica pode distinguir entre amostras diferentes. Ou seja, altos valores da razão SD/SE (acima de 1,5) indicam que o erro de estimativa da concentração de etanol é muito menor que o desvio padrão das amostras. Ao contrário, baixos valores (abaixo de 1,5) indicam a baixa eficiência do modelo (SCHIMLECK et al., 2003).

Outro modelo testado foi o MLR, que se baseia em ferramentas matemáticas mais simples. O coeficiente de determinação (R²) encontrado para este modelo para a calibração foi 0,99 e o erro de validação cruzada foi cerca de 1,89 g L⁻¹, para uma concentração média de etanol de 30,90 g L⁻¹.

Após os tratamentos de alisamento, normalização e primeira derivada, as intensidades nos comprimentos de onda em 2249 nm e 2319 nm foram usadas para a calibração. A Equação 1 representa este modelo, onde foram usadas 13 amostras para a sua construção (R² = 0,9948):

$$[\text{EtOH}] \text{ Predita} = 51410,30 \frac{dA}{d\lambda}_{2249 \text{ nm}} - 25039,24 \frac{dA}{d\lambda}_{2319 \text{ nm}} + 33,88$$

Onde: dA/dλ = derivada da absorvância em função do comprimento de onda.

A curva de calibração obtida foi testada com amostras que não participaram da construção da curva de calibração. O erro padrão de predição encontrado foi de 1,86 g L⁻¹, com um coeficiente de determinação R² de 0,99, sendo usadas 6 amostras nessa validação externa.

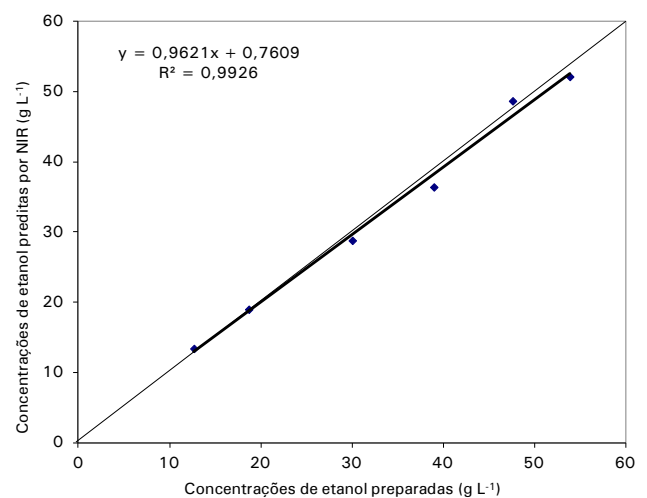


Figura 4. Valores de concentrações de etanol determinados após adição e preditos através do infravermelho próximo (NIR), usando o modelo MLR (Equação 1) com amostras externas àquelas usadas na calibração.

A Tabela 3 sumariza os principais parâmetros obtidos para o modelo de calibração e de validação externa, usando a técnica MLR.

Tabela 3. Resultados das análises estatísticas para os grupos de calibração e predição para as concentrações de etanol, usando o modelo MLR.

Parâmetros	Grupo de calibração	Grupo de predição externa
Número de amostras	13	6
Mínimo (g L ⁻¹)	3,63	12,67
Máximo (g L ⁻¹)	59,25	53,87
Média (g L ⁻¹)	31,48	33,64
SD (g L ⁻¹)	17,72	16,18
R ²	0,99	0,99
RMSE (g L ⁻¹)	1,22	1,45
SE (g L ⁻¹)	1,27	1,86
SD/SE	13,95	8,70

SD = desvio padrão; R² = coeficiente de determinação; RMSE = erro quadrático; SE = erro padrão.

Comparando-se o erro médio de predição externa (cerca de 5,3% e 4,1% para os modelos PLS e MLR, respectivamente) com o erro médio da medida convencional (7,7%), percebe-se como a técnica proposta é eficiente. O tratamento quimiométrico permitiu, neste caso, a diminuição do erro de predição para os teores de etanol em solução contendo enzimas, leveduras, solução tampão, entre outros. Mais ainda, como o tempo de análise convencional é de alguns dias e o tempo da metodologia proposta de cerca de 2 min, a técnica pode ser usada para controle de qualidade. O desvio da razão de performance (RDP) para este caso é em torno de 12,94 e 8,7 para os modelos PLS e MLR, respectivamente.

Para a construção de um modelo de predição é necessário que o conjunto amostral contemple uma variação muito ampla de valores para a concentração de etanol. Ressalta-se que a equação de predição deve ser usada dentro da faixa de valores de concentrações testadas. As concentrações de etanol devem estar entre 3,63 g L⁻¹ e 59,25 g L⁻¹.

A curva de calibração foi construída usando-se para as concentrações de etanol quantidades adicionadas a matrizes de amostras originais. Portanto, foram considerados implicitamente os efeitos de matriz, ou seja, possíveis interferências causadas por enzimas, leveduras ou outras substâncias decorrentes de reações bioquímicas. Tais efeitos não inviabilizaram o uso da técnica, indicando que os modelos propostos são robustos.

Conclusão

Uma metodologia para predição do teor de etanol em soluções oriundas de processos biotecnológicos foi adaptada com sucesso usando-se quimiometria, PLS ou MLR (com tratamentos de alisamento, normalização e primeira derivada), e espectrometria na região do infravermelho próximo.

O modelo foi calibrado considerando as amostras provenientes da adição de etanol e nenhum efeito de matriz foi detectado.

A técnica poderá ser usada por pesquisadores e empresas que necessitem avaliar, caracterizar ou gerenciar processos fermentativos para produção de bioetanol. Para isto, trabalhos futuros deverão ser conduzidos para validação em outros equipamentos de NIR, otimização da metodologia e ampliação da faixa de concentrações de etanol testadas.

Referências

- BLANCO, M.; PEINADO, A. C.; MAS, J. Analytical monitoring of alcoholic fermentation using NIR spectroscopy. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 88, n. 4, p. 536-42, 2004.
- CERVERA, A. E.; PETERSEN, N.; LANTZ, A. E.; LARSEN, A.; GERNAEY, K. Application of near-infrared spectroscopy for monitoring and control of cell culture and fermentation. **Biotechnology Progress**, New York, v. 25, n. 6, p. 1561-81, 2009.
- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balço energético nacional 2013: ano base 2012: relatório síntese**. Rio de Janeiro, 2013. 55 p.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, n. 6, p. 618-28, 2002.
- HAMELINCK, C.; HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 384-410, 2005.
- JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. **Considerações sobre o bioetanol lignocelulósico para subsidiar a elaboração de conteúdo da árvore do conhecimento agroenergia**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2009. 28 p. (Embrapa Informática Agropecuária. Documentos, 95).

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects: review. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 449-67, 2012.

LUPOI, J. S.; SINGH, S.; SIMMONS, B. A.; HENRY, R. J. Assessment of lignocellulosic biomass using analytical spectroscopy: an evolution to high-throughput techniques. **BioEnergy Research**, v. 7, n. 1, p.1-23, 2014.

MORITA, H.; HASUNUMA, T.; VASSILEVA, M.; TSENKOVA, R.; KONDO, A. Near infrared spectroscopy as high-throughput technology for screening of xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Analytical Chemistry**, Washington, US, v. 83, p. 4023-29, 2011.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 6, p. 673-86, 2005.

SCHIMLECK, L. R.; DORAN, J. C.; RIMBAWANTO, A. Near infrared spectroscopy for cost-effective screening of foliar oil characteristics in a *Melaleuca cajuputi* breeding population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 2433-37, 2003.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**. v. 2, n. 4; p. 707-38, 2007.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 18, p. 1959-66, 2005.

Comunicado Técnico, 335

Embrapa Florestas
Endereço: Estrada da Ribeira Km 111, CP 319
Colombo, PR, CEP 83411-000
Fone / Fax: + 55 41 3675-5600
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

1ª edição
Versão eletrônica (2014)



Comitê de Publicações

Presidente: *Patrícia Póvoa de Mattos*
Secretária-Executiva: *Elisabete Marques Oaida*
Membros: *Alvaro Figueredo dos Santos, Claudia Maria Branco de Freitas Maia, Elenice Fritzsos, Guilherme Schnell e Schuhlí, Jorge Ribaski, Luis Claudio Maranhão Froufe, Maria Izabel Radomski, Susete do Rocio Chiarello Pentead*

Expediente

Supervisão editorial: *Patrícia Póvoa de Mattos*
Revisão de texto: *Patrícia Póvoa de Mattos*
Normalização bibliográfica: *Francisca Rasche*
Editoração eletrônica: *Rafaele Crisostomo Pereira*