



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PPG CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



***Upcycling* do resíduo cervejeiro: obtenção de um hidrolisado proteico com  
peptídeos bioativos**

Dissertação de mestrado

Matheus Cardoso Vieira

Porto Alegre  
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PPG CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Matheus Cardoso Vieira

***Upcycling* do resíduo cervejeiro: obtenção de um hidrolisado proteico com  
peptídeos bioativos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadores: Prof. Dr. Adriano Brandelli  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roberta Cruz Silveira Thys

Porto Alegre  
2021

#### CIP - Catalogação na Publicação

Cardoso Vieira, Matheus  
Upcycling do residuo cervejeiro: obtenção de um  
hidrolisado proteico com peptídeos bioativos / Matheus  
Cardoso Vieira. -- 2021.  
58 f.  
Orientadores: Adriano Brandelli, Roberta Cruz  
Silveira Thys.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Bioprocessos. 2. Reaproveitamento  
agroindustrial. I. Brandelli, Adriano, orient. II.  
Cruz Silveira Thys, Roberta, orient. III. Título.



## **AGRADECIMENTOS**

Meus agradecimentos vão para todos aqueles que me apoiaram e acreditaram no meu trabalho, mesmo naqueles momentos mais difíceis e que tudo parecia não dar certo. A todos, minha gratidão.

Agradeço a minha família por todo suporte e apoio. Em especial meus pais, Jesus Ivan Camargo Vieira e Gislaine Cardoso Vieira. Saibam que sem vocês nada disso seria possível, obrigado por me incentivar e acreditar no meu potencial. Sabemos quanta coisa vocês precisaram abrir mão para me proporcionar as melhores condições na realização dos meus estudos, desde a graduação até o mestrado. Vocês são minha maior alegria e motivação, os amo mais que tudo. Obrigado por entenderem todos os momentos que precisei estar ausente e por sempre terem aquela palavra de carinho e força para me motivar.

Agradeço também aos meus amigos pela alegria compartilhada, pelos abraços nos momentos difíceis e pela compreensão quando não pude estar presente. Seria injusto citar nomes aqui, mas cada um de vocês sabe que essa mensagem está endereçada a ti também. Vocês são fundamentais para meu desenvolvimento aqui em Porto Alegre.

Às minhas colegas de mestrado do PPGCTA, muito obrigado por compartilhar todos os momentos de angústia e por todos os conselhos naqueles momentos de incerteza, pelo apoio, torcida e amizade que construímos nesses anos. Aos colegas de laboratório, meu muito obrigado por toda ajuda durante as análises e momentos de descontração.

Agradeço também a todos os professores do PPGCTA pela disponibilidade em todos os momentos que precisei, assim como os técnicos que sempre se mostraram dispostos a ajudar quando solicitado.

Em especial, quero agradecer aos meus orientadores: Professor Adriano sempre contribuindo naqueles momentos que as análises precisavam de um rumo e a Professora Roberta sempre me recebendo com um sorriso e uma palavra amiga para motivar os estudos. Vocês foram uma excelente escolha para me conduzir nesse caminho. Meu muito obrigado.

Por fim, agradeço à UFRGS pela oportunidade de realizar esse trabalho em uma universidade tão conceituada, usufruindo de toda sua infraestrutura. Sempre grato pelo ensino público, gratuito e de qualidade que me formou desde a graduação.

*“O mais corajoso dos atos ainda é pensar com a própria cabeça.”*

**(Coco Chanel)**

## RESUMO

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas no mundo e o Brasil tem papel de destaque no setor sendo o 3º maior produtor mundial com o Rio Grande do Sul sendo um dos principais polos de pequenas cervejarias. Durante seu processo de fabricação são gerados alguns resíduos, como o bagaço de malte (BM) que é composto basicamente de cereais e água. A cada 100 litros de cerveja são produzidos cerca de 20 kg de BM. Apesar de ser rico em nutrientes como proteínas e fibras, esse resíduo não é utilizado pela indústria e acaba sendo destinado à ração animal. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi utilizar o bagaço de malte gerado na produção de cerveja do tipo *Pilsen* para obtenção de um hidrolisado proteico, caracterizando-o e avaliando a atividade antioxidante dos peptídeos gerados, agregando valor ao mesmo e, desta forma, realizando o *upcycling* deste subproduto. Inicialmente, a aplicação de calor e a remoção de gordura do RC com solvente foram testados como pré-tratamentos para verificar o impacto dos mesmos na extração proteica. O concentrado proteico foi obtido pelo método de variação do pH com precipitação das proteínas no ponto isoelétrico pré-estabelecido. A enzima Alcalase foi utilizada para a realização da hidrólise proteica, onde as condições tempo de hidrólise e relação enzima:substrato foram determinadas. A atividade antioxidante foi avaliada por três mecanismos: sequestro do radical ABTS, sequestro do radical DPPH e atividade quelante de ferro. Além disso avaliou-se a influência da hidrólise na capacidade de formação de espuma e de emulsão. Foi possível observar que a aplicação da enzima Alcalase para hidrólise do concentrado proteico obtido por extração alcalina seguido de precipitação ácida é efetiva na produção de um hidrolisado com peptídeos potencialmente antioxidantes conforme os mecanismos de ação testados, onde a capacidade de captura de radical ABTS chegou a mais de 90%. Além disso, observou-se propriedades funcionais interessantes na tecnologia de alimentos, como o aumento na capacidade de formação e estabilidade da emulsão que subiu de 30,8% para 72,8% e de 51,7% para 62,1%, respectivamente.

**Palavras-chave:** hidrolisado proteico; concentrado proteico; reaproveitamento de resíduos; propriedades tecnológicas.

## ABSTRACT

Beer is one of the most consumed beverages in the world and Brazil has a prominent role in the sector, being the 3rd largest producer in the world, with Rio Grande do Sul being one of the main centers of small breweries. During its manufacturing process, some residues are generated, such as brewers' spent grain (BSG), which is basically composed of cereals and water. Every 100 liters of beer produced result about 20 kg of BM. Despite being rich in nutrients such as proteins and fibers, this residue is not used by the industry and ends up being destined for animal feed. Thus, the objective of this work was to use the BSG generated in the production of Pilsen-type beer to obtain a protein hydrolysate, characterizing it and evaluating the antioxidant activity of the generated peptides, adding value to it and, in this way, realizing the upcycling of this by-product. First, the application of heat and the degreasing of BSG with solvent were tested as pre-treatments to verify their impact on protein extraction. The protein concentrate was obtained by the pH variation method with protein precipitation at the pre-established isoelectric point. The enzyme Alcalase was used to carry out the protein hydrolysis, where the conditions time of hydrolysis and enzyme:substrate ratio were determined. Antioxidant activity was evaluated by three mechanisms: ABTS radical scavenging, DPPH radical scavenging and iron chelating activity. Furthermore, the influence of hydrolysis on foaming and emulsifying capacity was evaluated. It was possible to observe that the application of the enzyme Alcalase for hydrolysis of the protein concentrate obtained by alkaline extraction followed by acid precipitation was effective in the production of a hydrolysate with potentially antioxidant peptides according to the tested mechanisms of action, where the ABTS radical scavenging capacity reached more than 90%. In addition, interesting functional properties were observed in food technology, such as the increase in the formation capacity and stability of the emulsion, which rose from 30.8% to 72.8% and from 51.7% to 62.1%, respectively.

**Keywords:** protein hydrolysate; protein concentrate; reuse of waste; technological properties.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>10</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>12</b>
2.1. Objetivo Geral .....	12
2.2 Objetivos Especificos .....	12
<b>3. Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>13</b>
3.1 Cerveja.....	13
3.1.1 Conceitos, classificação e mercado.....	12
3.1.2 Processo produtivo.....	14
3.2 Resíduos da produção de cerveja: bagaço de malte .....	16
3.3 <i>Upcycling</i> de subprodutos agroindustriais .....	17
3.4 Proteínas e concentrado proteico .....	18
3.5 Hidrolisado proteico.....	19
3.6 Peptídeos bioativos .....	20
3.7 Atividade antioxidante .....	21
3.8 Propriedades funcionais das proteínas e seus peptídeos .....	22
3.8.1 Formação de espuma .....	23
3.8.2 Formação de emulsão .....	24
<b>4. Artigo</b> .....	<b>26</b>
<b>5. Conclusões do trabalho</b> .....	<b>46</b>
<b>6. Considerações finais</b> .....	<b>47</b>
<b>Referências bibliográficas</b> .....	<b>48</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos produz uma série de resíduos que, em alguns casos, apresentam características danosas ao ambiente e à saúde da população. Esses dejetos podem ser provenientes das diferentes etapas da cadeia produtiva de alimentos e, atualmente, somam 1,3 bilhão de toneladas anuais (ROTH; JEKLE; BECKER, 2019). Apesar de serem subutilizados, esses resíduos podem revelar um alto potencial de reutilização, o que minimiza o impacto ambiental e agrega valor a estes (SOUZA; ALMEIDA; SANTOS, 2009; ALEXANDRE *et al.*, 2013).

A cerveja, uma das bebidas mais apreciadas pelos consumidores, acumula uma quantidade relevante de resíduos: a cada 100 L produzidos, são gerados 20 kg do resíduo úmido, representando 85% do total de resíduo sólidos do processo cervejeiro (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006). O processo cervejeiro tem duas etapas distintas sendo que na primeira etapa, denominada brassagem, obtêm-se uma fração líquida (mosto) e uma sólida (bagaço de malte) que é caracterizada como resíduo.

Em 2019, a indústria cervejeira global produziu cerca de 1,91 bilhões de hL de cerveja (STATISTA, 2021). Estima-se que essa produção gere uma quantidade de resíduo cervejeiro (RC) – ou bagaço de malte (BM) – aproximado de 390 milhões de toneladas (ROTH; JEKLE; BECKER, 2019). Para as indústrias cervejeiras, a remoção inadequada desta alta quantidade de resíduos gera um impacto fortemente negativo no âmbito da sustentabilidade, responsabilidade social e ambiental e, assim sendo, exige a implementação de uma gestão de resíduos eficiente.

O BM é um subproduto que se destaca pelo seu elevado teor de fibras e, principalmente, por sua potencialidade como fonte proteica (LYNCH; STEFFEN; ARENDT, 2016). As proteínas são indispensáveis à saúde por serem fontes de aminoácidos essenciais ao organismo humano, além de possuírem uma extensa variedade de propriedades estruturais e funcionais, onde desempenham um papel de grande importância sobre o aspecto sensorial de produtos alimentícios (YADA, 2004). Devido à relevância das características funcionais e nutricionais das proteínas nos alimentos, elas vêm sendo extraídas de fontes vegetais e animais para obtenção de concentrados e isolados proteicos.

Novas fontes de proteínas podem ser utilizadas como ingredientes e são aceitas pela indústria alimentícia se possuírem propriedades vantajosas (SCHWENZFEIER *et al.*, 2013). Além disso, é crescente a valorização dos subprodutos gerados durante o processamento de alimentos e bebidas, o que pode ser comprovado pela obtenção de inúmeros produtos de alto valor agregado derivados de subprodutos industriais, conceito conhecido como *upcycling* (ROTH; JEKLE; BECKER, 2019).

Apesar da grande disponibilidade do BM, as pesquisas com esse subproduto ainda são muito limitadas. A caracterização deste subproduto, bem como de suas propriedades tecnológicas, potencializará sua aplicabilidade industrial, sendo, portanto, de grande interesse industrial.

O processo de hidrólise de proteínas possibilita a liberação de peptídeos biologicamente ativos de interesse para o enriquecimento de produtos alimentícios (UDENIGWE; ALUKO, 2012). Diversas fontes proteicas, animais e vegetais, tem sido exploradas como fontes de peptídeos bioativos, como soja, arroz, chia e feijão (BOONLA *et al.*, 2015; KANNAN; HETTIARACHCHY; MAHEDEVAN, 2012; PUCHALSKA; MARINA; GARCÍA, 2014; UDENIGWE; ALUKO, 2012; COELHO *et al.*, 2019). Esses compostos podem apresentar propriedades antioxidante, anti-hipertensiva, imunomoduladora, antimicrobiana, hipocolesterolêmica, antidiabética, vasodilatadora entre outras, sendo dependentes das propriedades estruturais da cadeia peptídica (PRIPP *et al.*, 2005; FONTOURA *et al.*, 2018).

Os peptídeos antioxidantes são de grande relevância para a ciência e tecnologia já que esse tipo de atividade atua na prevenção de doenças e na conservação de alimentos, inibindo a sua oxidação (DI BERNARDINI *et al.*, 2011). Ishak & Sarbon (2018) relatam que a composição, estrutura e hidrofobicidade dos aminoácidos são fatores de maior influência nas propriedades antioxidantes. No entanto, a contribuição específica de resíduos individuais de aminoácidos para a atividade antioxidante de peptídeos depende, em grande parte, da natureza das substâncias oxidantes e do meio de reação (UDENIGWE; ALUKO, 2012). Na literatura há registro de diversos métodos para avaliação da atividade antioxidante e, segundo pesquisadores, são necessários dois ou mais métodos de análise para alegar essa propriedade em hidrolisados e peptídeos bioativos (CENTENARO, *et al.*, 2011; VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017).

Diante dos fatores expostos, este trabalho tem como objetivo indicar uma alternativa sustentável para o aproveitamento do BM, através da geração de um produto de maior valor agregado destacando seu potencial antioxidante para valorização do material.

O presente trabalho está estruturado da forma descrita a seguir. O item 2 se destina aos objetivos do estudo. No item 3 estão abordados os fundamentos teóricos e revisão bibliográfica sobre a cerveja, resíduo da produção de cerveja, *upcycling* de subprodutos agroindustriais, proteínas e concentrados proteicos, hidrolisados proteicos, peptídeos bioativos, atividade antioxidante e propriedades funcionais. No item 4 está apresentado o artigo gerado a partir dos resultados desse trabalho e no item 5 estão as conclusões do estudo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a utilização do bagaço de malte gerado na produção de cerveja do tipo *Pilsen* para obtenção de um concentrado proteico para hidrólise enzimática, avaliando seu potencial antioxidante e propriedades funcionais.

### 2.2. Objetivos específicos

- **Os objetivos específicos deste trabalho foram:**

- Caracterizar o BM da cerveja Pilsen quanto aos teores de proteínas, lipídios, cinzas e carboidratos totais;
- Avaliar a melhor condição de extração e concentração das proteínas do BM, através da determinação do ponto isoelétrico para precipitação proteica;
- Realizar a hidrólise enzimática do concentrado proteico obtido, avaliando diferentes condições de tempo de hidrólise e da relação enzima:substrato;
- Analisar a atividade antioxidante dos peptídeos gerados na hidrólise do BM, através dos testes de DPPH, ABTS e atividade quelante de ferro;
- Avaliar a influência da ultrafiltração na atividade antioxidante do hidrolisado;
- Determinar a capacidade de formação e estabilidade de espuma, assim como a capacidade de emulsificação e a estabilidade da emulsão do concentrado e hidrolisado de BM.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse capítulo serão apresentados os itens mais importantes relacionados ao assunto, como a produção de cerveja, geração de resíduos e seu reaproveitamento. Também serão abordados tópicos relacionados à extração, concentração e hidrólise proteica e a aplicação na obtenção de peptídeos com bioatividade e funcionalidade tecnológica.

#### 3.1. Cerveja

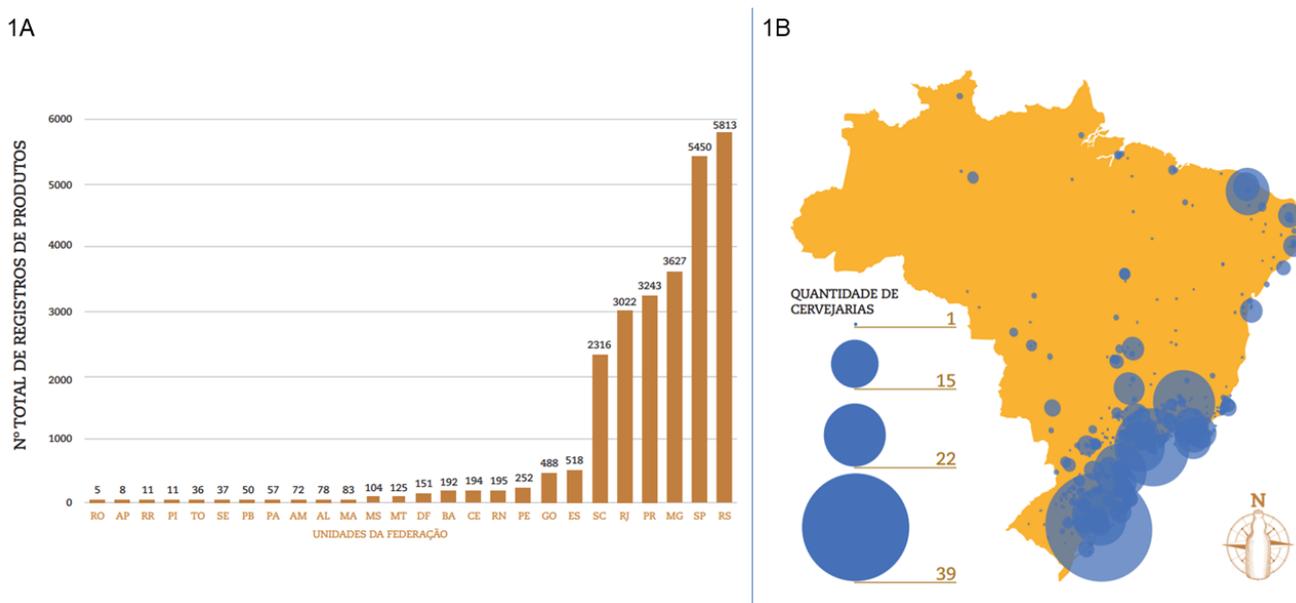
##### 3.1.1. Conceitos, classificação e mercado

Conforme o Decreto nº 9.902 de 8 de Julho de 2019, que regulamenta a Lei nº 8.918 de 14 de Julho de 1994, a cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro. Esse decreto – que traz modificações relevantes ao anterior (Decreto nº 6.871/2009) – estabelece ainda mudanças como a permissão da adição à cerveja de ingredientes de origem animal, vegetal e outros aditivos. A norma também atualiza regras para padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas no país (BRASIL, 2019).

A legislação vigente permite interpretações e desenvolvimento de produtos diversos e cervejas com características muito singulares. As matérias-primas e os parâmetros de produção (tempo e temperatura de cozimento, fermentação e maturação) têm uma influência significativa nos atributos sensoriais e físico-químicos do produto elaborado (SOARES, 2011; VIOTTI, 2012). A classificação mais usual e abrangente divide as cervejas em dois grandes grupos: *Ale* e *Lager*. As cervejas tipo *Ale*, de alta fermentação, são cervejas cujo processo fermentativo ocorre na parte superior, próximo à superfície, com temperatura entre 15 e 24 °C, utilizando, principalmente, *Saccharomyces cerevisiae*; nota-se um sabor e aroma bastante característicos, mais encorpados e complexos (MORADO, 2009; BJCP, 2015). As cervejas tipo *Lager*, de baixa fermentação, utilizam temperaturas mais baixas (8 – 12 °C), e emprega-se a levedura *Saccharomyces pastorianus*; são o tipo de cerveja mais comercializadas no mundo devido às suas características de sabor e aroma mais leves, além de terem um menor teor alcoólico. Dentre as cervejas *Lager* a mais comum é a cerveja tipo *Pilsen*, correspondente a cerca de 99% da produção de cervejas *Lager* no mundo (MORADO, 2009; VIOTTI, 2012; BJCP, 2015).

O Brasil se destaca como um grande produtor de cerveja no cenário mundial atrás apenas da China e Estados Unidos, com uma produção estimada de 16,1 bilhões de litros por ano (CERVBRASIL, 2020). Apesar de cerca de 98,6% da produção cervejeira do Brasil estar concentrada em três grandes companhias, as micro e pequenas cervejarias têm cada vez mais buscado seu espaço entre os consumidores e correspondem a 1,4% do mercado, sendo responsáveis por 17,5% dos empregos gerados no setor (BRESSIANE, 2015). O Rio Grande do Sul se destaca no setor, sendo o estado com maior número de registro de produtos cervejeiros (Fig. 1A) e, junto à região Sul, concentra a maior parte das cervejarias do Brasil (Fig. 1B). Em destaque nota-se o município de Porto Alegre – RS, com 39 cervejarias, sobre diversos outros círculos que representam outros municípios com cervejarias (CERVBRASIL, 2020).

**Figura 1.** Registros de produto totais por unidade da federação e mapa de símbolos pontuais proporcionais com a distribuição das cervejarias no Brasil por município.



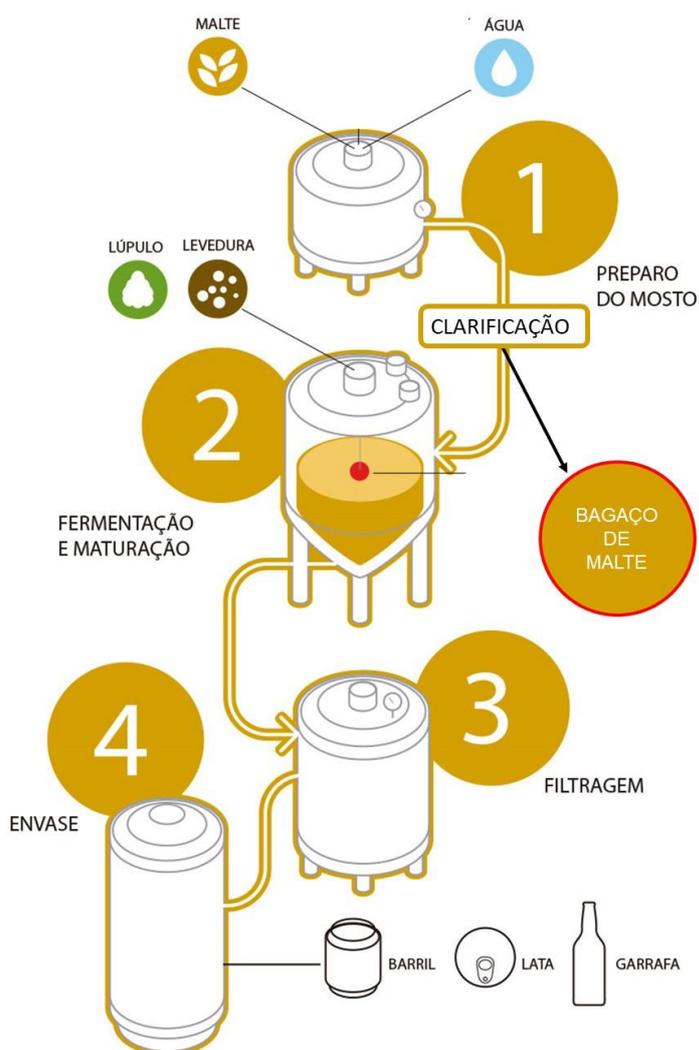
Fonte: Adaptado de “Anuário da Cerveja 2019” (CERVBRASIL, 2020)

### 3.1.2. Processo produtivo

O processo de fabricação da cerveja pode diferir em vários aspectos, desde os parâmetros utilizados nas etapas (tempo e temperatura) até adequações às estruturas disponíveis na cervejaria e/ou matérias-primas e adjuntos utilizados (BOULTON; QUAIN, 2001; PIRES; BRANYIK, 2015). Porém, algumas operações unitárias são consideradas primordiais na produção da bebida e estão representadas na Figura 2.

Os ingredientes base para a produção de cerveja, segundo a Lei da Pureza Alemã – datada de 1516 –, são: o malte, a água e o lúpulo. O primeiro estágio da produção cervejeira consiste na moagem dos grãos malteados (geralmente cevada, mas pode ser outros cereais também, como o trigo), com o objetivo de danificar a estrutura do grão, expondo o amido e facilitando a ação das enzimas que irão hidrolisar esses polissacarídeos em açúcares menores durante a mosturação (DRAGONE; ALMEIDA; SILVA, 2010; VENTURINI FILHO, 2010; PIRES; BRANYIK, 2015).

**Figura 2.** Fluxograma simplificado do processo de produção de cerveja com destaque à etapa de geração do bagaço de malte



Fonte: Adaptado de CERVBRASIL, 2020

A mosturação é a primeira etapa propriamente dita do processo cervejeiro e tem como principal objetivo solubilizar os componentes do malte solúveis em água com controle de temperatura e pH propício às reações enzimáticas e químicas (BOULTON;

QUAIN, 2001; VENTURINI FILHO, 2010). Durante a mosturação, cerca de 35-40% das proteínas do malte são solubilizadas (PIRES; BRANYIK, 2015). Após o período pré-estabelecido para ação enzimática, ocorre uma primeira filtração – também denominada clarificação – que tem a finalidade de separar o bagaço de malte (parte sólida considerada resíduo da produção cervejeira), da porção líquida de real interesse para o processo, o mosto cervejeiro (BLEIER et al., 2013).

As etapas subsequentes da produção cervejeira, conforme ilustradas na Figura 2, consistem na fermentação e maturação do mosto, seguida de uma segunda filtragem e o envase da bebida.

### 3.2. Resíduos da produção de cerveja: bagaço de malte

O bagaço de malte (Figura 3) (BM), é o principal subproduto gerado no processo cervejeiro, correspondendo a 85% dos resíduos gerados nesse setor da indústria (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006; LYNCH; STEFFEN; ARENDT, 2016). O BM é a fração insolúvel separada do mosto cervejeiro após a etapa de mistura do malte e água, sendo sua composição condicionada à matéria-prima utilizada para obtenção do malte, principalmente cevada, e constituindo-se basicamente da casca, pericarpo e revestimento de sementes do grão, com quantidades residuais do endosperma e da camada de aleurona (ROTH; JEKLE; BECKER, 2019; VIEIRA et al., 2017).

**Figura 3.** Bagaço de malte após separação do mosto



Fonte: Polastri et al. (2019)

O destino principal do BM produzido nas fábricas de cerveja é para alimentação animal, sendo apenas uma pequena parcela (menos de 3%) utilizada para outros fins, como insumo na indústria farmacêutica (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006).

O uso do BM como ração se deve aos elevados teores de fibras e proteínas que o constituem e, justamente por isso, estima-se que possa ser utilizado para fins mais nobres, como nutrição humana (NOCENTE et al., 2019; REIS; ABU-GHANNAM, 2014; AJANAKU et al., 2011; STOJCESKA et al., 2006), e processos biotecnológicos: substrato para cultivo de microrganismos e produção de enzimas (HASSAN et al., 2020; RAVINDRAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2019), entre outros. Pesquisas recentes, inclusive realizadas no Brasil, tem explorado o BM para aplicação em alimentos, observando resultados promissores, como no desenvolvimento de cookies, pães e snacks enriquecidos com aumento do teor de fibras e proteínas nos produtos (BIELI et al., 2017; RIGO et al., 2017; KUIAVSKI et al., 2020).

Da mesma forma que outros resíduos agroindustriais, o bagaço de malte apresenta uma grande concentração de matéria orgânica, sendo que se destaca o teor de fibra (principalmente celulose, hemicelulose e lignina) que pode chegar a 70% (m/m) e o teor de proteínas, entre 25 e 30% (m/m) (MUSSATO, 2014; MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006). As proteínas mais abundantes no BM são hordeína, glutelina, globulina e albumina (CELUS; BRIJS; DELCOUR, 2006; LYNCH; STEFFEN; ARENDT, 2016), sendo que o conteúdo de aminoácidos essenciais representa cerca de 30% do conteúdo total de proteínas, com lisina sendo o mais abundante (28%) (LYNCH; STEFFEN; ARENDT, 2016; ROTH; JEKLE; BECKER, 2019), o que é uma particularidade importante e que destaca esse subproduto já que a lisina é, em muitos casos, o aminoácido limitante em alimentos derivados de cereais (BLANDINO et al. 2003). Outro fator importante relacionado à composição do BM é que estudos utilizando a casca de cevada encontravam elevados teores de compostos fenólicos em sua composição e, com isso, o BM é um potencial fonte natural de substâncias antioxidantes (FĂRÇAŞ et al., 2014; ROTH; JEKLE; BECKER, 2019).

### **3.3. *Upcycling* de subprodutos agroindustriais**

As indústrias e centros de pesquisa do mundo todo estão cada vez mais buscando alternativas para reaproveitar os resíduos gerados durante os processos de obtenção de alimentos e bebidas (CHANDRASEKARAN, 2013). Muitos desses subprodutos apresentam grande potencial nutricional podendo assim serem reutilizados para obtenção de produtos com alto valor agregado e que possibilitam o enriquecimento nutricional e funcional na formulação de alimentos (ROTH; JEKLE; BECKER, 2019).

Nesse contexto, um novo conceito – *upcycling* – vem sendo difundido e abordado por pesquisadores. Segundo Roth et al. (2019), o termo *upcycling* é definido como a busca da valorização de subprodutos que são destinados a fins menos nobres como,

no caso dos resíduos agroindustriais, à alimentação animal, mas que apresentam grande potencial como fonte de proteínas e fibras, por exemplo. Grasso & Asioli (2020) realizaram uma pesquisa com consumidores locais avaliando sua aceitação em relação à biscoitos produzidos com ingredientes clássicos (farinha de trigo) e “reciclados” (chamado de farinha de girassol *upcycled*), considerando atributos como preço, tipo de farinha, fonte de proteína (ou não) e rotulagem *Carbon Trust* (ou não). Apesar dos resultados indicarem uma preferência pelos biscoitos tradicionais, há uma tendência de que o uso de ingredientes alternativos obtidos a partir de resíduos possam ser incorporados na dieta desse grupo, desde que sejam implementadas políticas que fomentem essa prática e comuniquem de forma mais eficaz os benefícios do *upcycling* desses ingredientes.

Na literatura, apesar de ainda escassos, já se encontram outras pesquisas que viabilizam a obtenção, valorização e aplicação de ingredientes ditos reciclados (GRASSO et al., 2019; MAY & GUENTHER, 2020; GRASSO et al., 2020). Nocente et al. (2019) utilizaram o bagaço de malte em sua forma íntegra como ingrediente para formulação de macarrão com alegação nutricional e empregando o termo *upcycling* para valorizar essa prática. Nesse trabalho, observou-se que o BM promoveu o aumento do teor de fibras e proteínas além de promover efeitos mínimos na aceitação sensorial.

### **3.4. Proteínas e concentrado proteico**

A crescente demanda da população por produtos nutritivos, tal como o aumento de adeptos a dietas vegetarianas e veganas – em torno de 15% da população brasileira (IBOPE, 2018) – abre espaço para que fontes alternativas de proteínas sejam exploradas. Segundo a ONU (2012), estima-se que será necessário a produção de 70% a mais de carne para alimentar a população, que em poucas décadas deve alcançar 9,5 bilhões de pessoas. Uma das áreas de maior potencial e viabilidade é, justamente, a tecnologia com base em produtos vegetais (“*plant based foods*”), que se torna mais eficiente e sustentável. É nesse contexto que diversas pesquisas buscam a partir de materiais subutilizados, fonte para obter concentrados proteicos e, a partir daí, explorar suas potencialidades nutricionais e biológicas.

Além da necessidade de atender à demanda crescente por proteínas, os concentrados proteicos têm grande relevância industrial sendo empregados como ingredientes funcionais em diversas formulações. Diante disso, desencadeia-se uma necessidade de buscar mecanismos simples e rápidos para extração dessas proteínas mantendo ou melhorando suas propriedades funcionais como capacidade de formação de espuma, emulsionante e solubilidade (AJIBOLA et al., 2016).

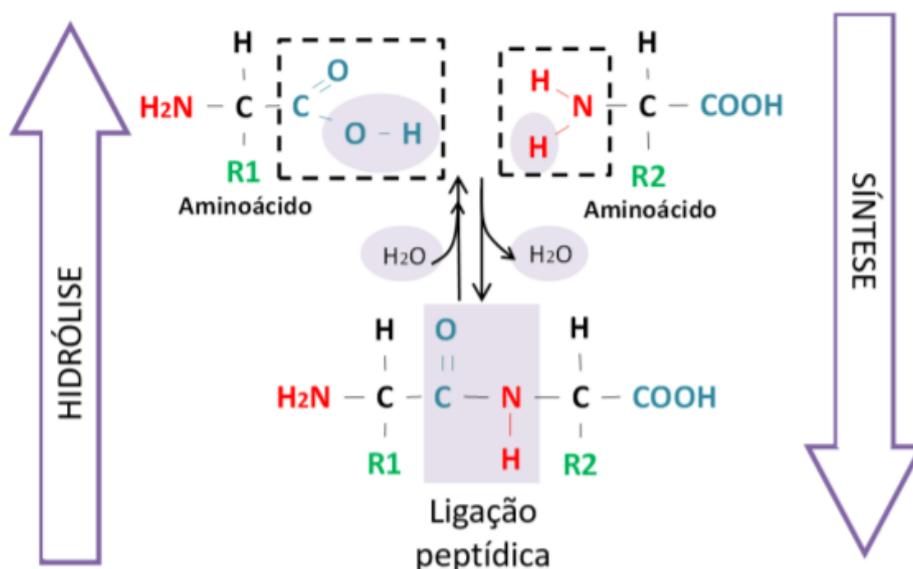
Os concentrados proteicos são produtos obtidos a partir da retirada parcial de substâncias não proteicas de uma matéria prima, como carboidratos, sais minerais, entre outros (FONTANA et al, 2009). A sua obtenção pode se dar por via enzimática ou química. Na enzimática, são utilizadas enzimas para facilitar o processo de extração proteica (TANG et al., 2003). Por via química, o processo consiste na solubilização das proteínas em pH alcalino ou ácido, com posterior precipitação destas no seu ponto isoelétrico, esse método é conhecido como *pH-shifting* (NOLSØE; UNDELAND, 2009). A partir dessa metodologia, há relatos da obtenção de concentrados com propriedades funcionais e tecnológicas com grande afinidade para aplicação em produtos de panificação, lácteos e embutidos cárneos (FIGUEIREDO, 2015).

De acordo com Glória e Regitano-d'Arce (2000), a quantidade mínima de proteína nos concentrados e isolados proteicos é 68% e 88% em base seca, respectivamente, sendo os concentrados e isolados de soja os únicos classificados na Resolução CNNPA nº 14, de 28 de junho de 1978. Quando utilizados para substituírem as proteínas convencionais em alimentos, os concentrados devem manter ou melhorar a sua qualidade nutricional e aceitabilidade (HUA et al., 2005).

### **3.5. Hidrolisado proteico**

Os hidrolisados proteicos são definidos como proteínas com a ligação peptídica clivada por ação enzimática, química ou por fermentação, que resultam em peptídeos de tamanhos diferentes e alguns aminoácidos livres (ADLER-NISSEN, 1986). Em síntese, uma reação de hidrólise é aquela em que uma molécula de água efetua uma dupla troca com outro composto estabilizando-o, conforme ilustrado na Figura 4. Os hidrolisados proteicos apresentam elevado potencial tecnológico devido sua elevada funcionalidade e propriedades nutricionais, reduzindo o potencial alergênico da proteína, além de conter peptídeos bioativos (MOURE; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 2006; MARTINS, 2009). A hidrólise proteica por aplicação de enzimas é um método reconhecido por não prejudicar o valor nutricional da proteína, ao mesmo tempo em que melhora ou modifica suas propriedades nativas, além disso, hidrolisados produzidos por via enzimática não apresentam resíduos de solventes orgânicos, nem produtos tóxicos secundários, sendo o tempo de processo relativamente menor quando comparado ao processo fermentativo (DE OLIVEIRA et al., 2015; SALEM et al., 2017). A liberação de peptídeos bioativos por ação enzimática a partir da proteína intacta possibilita a escolha de substrato, enzimas específicas e condições de reação, promovendo uma otimização do rendimento dessas biomoléculas (NASCIMENTO, 2015).

**Figura 4.** Ilustração esquemática da reação de hidrólise e síntese proteica



Fonte: Miguel (2004)

As proteases são enzimas que catalisam a quebra de ligações peptídicas nas proteínas o que afeta o tamanho, quantidade, a composição de aminoácidos livres, peptídeos e a sequência de aminoácidos que o compõem (WU; CHEN; SHIAU, 2003). Estudos para obtenção de hidrolisados proteicos utilizam diferentes enzimas proteolíticas para promover a quebra das ligações, sendo as mais usuais: Alcalase, Pepsina, Flavourzyme e Neutrase.

Diferentes pesquisas provaram que a enzima Alcalase (Alcalase® 2.4L FG) é a que apresenta melhores resultados tanto em grau de hidrólise, como em bioatividade dos peptídeos gerados a partir de diferentes proteínas alimentares (ZHANG et al., 2010; EVANGELHO et al., 2015; SEGURA-CAMPOS et al., 2013). A Alcalase é uma enzima microbiana produzida por *Bacillus licheniformis* e tem como seu principal componente a subtilisina, uma endoprotease com ampla especificidade e capacidade de hidrolisar a maioria das ligações peptídicas de uma molécula proteica em diferentes substratos (IUBMB, 2016). Segundo Hedstrom (2002), o sítio ativo dessa enzima é formado por três aminoácidos, serina, histidina e ácido aspártico, sendo que cada um exerce uma atividade específica na hidrólise. A serina possui o grupamento -OH atuando como nucleófilo que ataca o grupamento carboxila, participante da ligação peptídica; a histidina tem um par de elétrons proveniente do nitrogênio que aceita o hidrogênio do grupo -OH da serina, formando um intermediário tetraédrico seguido da quebra da ligação peptídica; por fim, o grupo carboxílico do ácido aspártico interage com a histidina

por ligações de hidrogênio possibilitando que o átomo de nitrogênio citado se torne mais eletronegativo (HEDSTROM, 2002).

### **3.6. Peptídeos bioativos**

Uma substância é considerada bioativa quando tem a capacidade de afetar os processos biológicos e, com isso, impactar nas funções e condições do organismo, trazendo benefícios à saúde (MÖLLER et al., 2008). Os peptídeos não apresentam atividade biológica enquanto estão incluídos na cadeia primária de proteínas de variadas fontes e podem ser liberados a partir de diferentes processos como a fermentação e a hidrólise enzimática – *in vivo* ou *in vitro*. Suas propriedades são influenciadas por fatores como o tipo de enzima usada para a hidrólise, as condições de hidrólise (tempo, grau de hidrólise e razão enzima/substrato), o peso molecular dos peptídeos resultantes e os pré-tratamentos sofridos pela proteína antes da hidrólise (QUIRÓS et al., 2007; HARTMANN; MEISEL, 2007; INOUE et al., 2009; UDENIGWE; ALUKO, 2012).

Os peptídeos liberados de proteínas alimentares cada vez mais despertam interesses da comunidade científica devido a sua influência em diversas respostas fisiológicas no organismo (SMACCHI & GOBBETTI, 2000). Esses compostos podem ser produzidos comercialmente e utilizados nos alimentos provendo benefícios à manutenção da saúde, como a prevenção e o tratamento de enfermidades (SMACCHI & GOBBETTI, 2000; DIAS, 2010).

Corrêa et al. (2014) utilizaram soro de queijo de ovelha como fonte de peptídeos e conseguiram comprovar sua bioatividade como agente antioxidante e atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina. Costa et al. (2019) constataram em seu trabalho utilizando peptídeos produzidos por *Bacillus* sp. P34 a atividade antimicrobiana contra diferentes espécies formadoras de biofilmes. Choksawangkarn et al. (2018) comprovaram a atividade antioxidante de peptídeos obtidos por hidrólise de proteínas extraídas do resíduo da produção de molho de peixe. Montane et al. (2018) em seu estudo com subprodutos de couve-flor observaram a atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina e atividade antioxidante nos peptídeos derivados do processamento dessa matéria-prima.

### **3.7. Atividade antioxidante**

As substâncias antioxidantes são objetos de estudos frequentes devido, principalmente, a sua ação no controle da deterioração dos alimentos. A oxidação pode afetar diferentes nutrientes que compõe o alimento – proteína, lipídios e carboidratos –

no entanto, é a oxidação lipídica o principal fator causador de diminuição da vida útil de muitos produtos alimentícios (PHILANTO, 2006).

Além da problemática relacionada à conservação dos alimentos, o estresse oxidativo acarreta a formação fisiológica de radicais livres que em excesso acarretam danos celulares precursores de doenças como artrite, diabetes, entre outras (VALKO et al., 2007). E é justamente com a intenção de amenizar problemas causados pela oxidação e formação de radicais livres que é relevante identificar e aplicar compostos capazes de amenizar esses processos oxidativos no metabolismo humano e em alimentos.

Os compostos que apresentam atividade antioxidante podem ser sintéticos ou naturais, sendo que podem estar naturalmente nos alimentos ou serem adicionados durante o processamento desses. Dentre os antioxidantes naturais mais usuais, destacam-se o ácido ascórbico, o  $\alpha$ -tocoferol e o  $\beta$ -caroteno; já entre os sintéticos os mais importantes são o hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) (JE et al., 2009; DI BERNARDINI et al., 2011). Porém, o uso de antioxidantes sintéticos é restrito em muitos países devido aos potenciais riscos à saúde vinculados neles e, por isso, tem se dado cada vez mais espaço aos antioxidantes naturais. Os peptídeos bioativos estão entre as fontes de antioxidantes naturais pesquisadas atualmente, especialmente aqueles obtidos a partir de hidrolisados proteicos pelo seu apelo à saúde, já que podem substituir os aditivos artificiais (GRAMZA-MICHALOWSKA; KMIECIK, 2016; ZHANG et al. 2014).

O mecanismo exato da atividade antioxidante de peptídeos ainda não é totalmente esclarecido. Alguns estudos comprovam que há peptídeos com propriedades inibitórias da peroxidação lipídica, outros sequestradores de radicais livres e quelantes de íons metálicos (RAJAPAKSE et al., 2005; MOURE; DOMINGUÉZ; PARAJÓ, 2006). Ainda existem relatos de peptídeos antioxidantes que mantêm células protegidas dos danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) (ERDMANN; CHEUNG; SCHÖDER, 2008). O mecanismo de ação dos peptídeos com atividade antioxidante é determinado pela sua massa molecular, sequência e composição de aminoácidos, dentre outras propriedades estruturais (INOUYE et al., 2009; UDENIGWE; ALUKO, 2012; FRANCO-MIRANDA et al., 2017).

A determinação da atividade antioxidante pode ser feita por diversas metodologias que identificam diferentes mecanismos de ação. Goufo e Trindade (2014) dividiram alguns métodos em cinco grupos, baseados em:

- 1) Evitar a iniciação: sequestro do radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiozoline-6-sulfonic acid)), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), atividade quelante do íon ferroso ( $Fe^{2+}$ );

- 2) Inibir a formação de peróxido: inibição da auto-oxidação do ácido linoleico;
- 3) Prevenir a continuação da abstração do hidrogênio: inibição da formação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- 4) Capacidade de redução: poder redutor, capacidade de redução do molibdato, FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power), sequestro do radical livre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydazyl);
- 5) Capacidade de sequestro do radical oxigênio: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ), ânion superóxido ( $O_2^\bullet$ ), oxigênio singlete, terc-butil peróxido.

Estudos anteriores relataram o potencial antioxidante de peptídeos obtidos por hidrólise enzimática de diversas fontes vegetais como feijão preto (EVANGELHO et al., 2016), milho (JIN et al., 2016) e soja (OLIVEIRA et al., 2014) e devido aos resultados promissores, cada vez mais pesquisadores vem baseando seus trabalhos na utilização desses vegetais e seus subprodutos como forma de *upcycling*.

### **3.8. Propriedades funcionais das proteínas e seus peptídeos**

Na literatura se faz uso do termo “funcional” para designar os ingredientes que apresentam qualquer propriedade que não seja atributo nutricional e que evidencie ou melhore características benéficas dentro de uma formulação (DAMODARAN, 1997). As proteínas, devido à sua composição química formada por sequências de aminoácidos únicas, são nutrientes com grande protagonismo na indústria de alimentos em razão da sua elevada capacidade de estabilizar gotículas de óleo e bolhas de ar, formar gel e aumentar a viscosidade do meio em matrizes alimentares (BEVERUNG; RADKE; BLANCH, 1999; O’CONNELL; FLYNN, 2007).

Recentemente, diversos estudos visam explorar a funcionalidade das proteínas vegetais e modificá-las visando melhorar suas características funcionais para atender a esses requisitos (FERREIRA et al., 2018; KARAMI & AKBARI-ADERGANI, 2019; GRASSO et al., 2019; PHONGTHAI et al., 2020). Dentre as propriedades estudadas se destacam algumas como a capacidade e estabilidade de formação de espuma e emulsão que são atributos necessários para sua viabilidade em pães, massas, embutidos cárneos e outros alimentos, sendo influenciados por fatores como a composição de aminoácidos, estrutura e conformação da proteína (BOYE et al., 2010; WANI et al., 2015)

#### **3.8.1. Formação de espuma**

A formação de espuma por uma proteína é a capacidade da rápida migração proteica para a interface ar-água, desdobrando-se e reorganizando-se nessa interface. Essa incorporação de ar pode ser por batimento, agitação ou aeração (SGARBIERI, 1996; KLOMPONG et al., 2007). A estabilidade da espuma está relacionada à natureza do filme e reflete a extensão da interação proteína-proteína dentro da matriz (MUTILANGI et al. 1996).

Essa propriedade funcional é influenciada por fatores a natureza da proteína, solubilidade, desnaturação proteica e da presença de sais e outros interferentes. O pH do meio de dispersão também tem impacto na formação de espuma e especialmente na sua estabilidade. Klompong et al. (2007) relataram a diminuição da estabilidade da espuma em pH muito ácido ou alcalino relacionando esse fenômeno à repulsão de peptídeos por forças iônicas.

Estudos anteriores mostram que a formação de espuma com proteínas segue três estágios: difusão da proteína solúvel para a interface onde se concentra (reduzindo a tensão superficial); desdobramento da cadeia polipeptídica na interface com reorientações (polar-água, apolar-ar); e interação entre essas cadeias para formar filmes contínuos (SGARBIERI, 1996; SORGENTINI & WAGNER, 2002; KARAMI & AKBARI-ADERGANI, 2018).

### **3.8.2. Formação de emulsão**

Segundo Sgarbieri (1996), uma emulsão é a mistura de dois líquidos imiscíveis onde um deles é disperso em glóbulos no outro líquido, sendo que são conhecidos dois tipos de emulsão que se diferem na composição das fases: emulsão óleo em água (a água é a fase contínua e o óleo a fase descontínua ou interna); e a emulsão água em óleo (quando a água é a fase interna e o óleo a fase externa). O mecanismo para formar um sistema de emulsão é atribuído à adsorção de peptídeos na superfície de gotículas de óleo recém-formadas durante a homogeneização e a formação de uma membrana protetora que evita a coalescência da gota de óleo (KLOMPONG et al., 2007).

A estabilidade de uma emulsão está ligada a presença de um agente emulsificante atuando na diminuição da tensão superficial que existe entre as duas fases possibilitando um nível mais baixo de energia para a formação da emulsão. Esse agente emulsificante deve possuir em sua estrutura porções hidrofóbicas e hidrofílicas o que permite que os glóbulos internos não coalesçam resultando na quebra da emulsão (SGARBIERI, 1996).

As proteínas são ótimos emulsificantes e, por isso, amplamente utilizados para esse fim. São dois aspectos os que mais interessam em uma emulsão: a capacidade de

emulsificação, ou seja, quanto de óleo as proteínas conseguem emulsionar; e a estabilidade da emulsão, que mensura a capacidade das proteínas em manter a mistura quando submetido a uma fonte de calor ou ação mecânica (SGARBIERI, 1996; KLOMPONG et al., 2007; KARAMI & AKBARI-ADERGANI, 2019).

#### **4. ARTIGO**

Nesta seção será apresentado o artigo escrito a partir dos resultados experimentais do presente trabalho que será submetido em uma revista a ser definida.

## **Avaliação das propriedades funcionais e atividade antioxidante de proteínas e peptídeos bioativos obtidos de bagaço de malte**

Matheus Cardoso Vieira<sup>1</sup>, Roberta Cruz Silveira Thys<sup>2</sup>, Adriano Brandelli<sup>2</sup>

### **RESUMO**

A produção de cerveja gera uma grande quantidade de resíduos sólidos, chamado bagaço de malte (BM). Esse subproduto é destinado em sua maior parte à ração animal, mas apresenta uma potencialidade nutricional devido à sua composição química, principalmente como fonte de proteínas. As proteínas são formadas por cadeias de peptídeos que podem sofrer modificações por hidrólise e serem liberados com diferentes bioatividades e funcionalidades, como atividade antioxidante. O objetivo desse estudo foi produzir um hidrolisado proteico a partir do concentrado proteico obtido do bagaço de malte residual da produção de cerveja Pilsen, avaliando suas propriedades funcionais e atividade antioxidante. O concentrado proteico do bagaço de malte foi por variação do pH no ponto isoelétrico, estabelecido em 3,5. A aplicação de calor e desengorduramento do bagaço de malte, como pré-tratamentos à extração proteica, não tiveram efeitos significativos no processo de extração, e por isso foram descartados. A hidrólise do concentrado proteico foi feita com a enzima Alcalase, após definição da relação de enzima:substrato (2:100) e do tempo de hidrólise (4h). O hidrolisado obtido foi liofilizado e armazenado até o uso. Para a atividade antioxidante foram testados diferentes mecanismos de ação, sendo que o hidrolisado obteve um melhor resultado que o concentrado proteico em todos os mecanismos: captura do radical ABTS, captura do radical livre DPPH e atividade quelante do íon ferro. Foi avaliada também a capacidade de formação de espuma e sua estabilidade, onde a hidrólise não influenciou essa propriedade ( $p < 0,05$ ) se mantendo em torno de 45% para a formação de espuma e 60% para estabilidade da espuma. A formação de emulsão foi melhorada pelo processo de hidrólise, assim como a sua estabilidade.

**Palavras-chave:** Resíduos agroindustriais; *Upcycling*; Concentrado proteico; Hidrolisado proteico.

## **Evaluation of the functional properties and antioxidant activity of bioactive peptides obtained from brewers' spent grain**

Matheus Cardoso Vieira<sup>1</sup>, Roberta Cruz Silveira Thys<sup>2</sup>, Adriano Brandelli<sup>2</sup>

### **ABSTRACT**

Beer production generates a large amount of solid waste, called brewers' spent grain (BSG). This by-product is mostly destined for animal feed, but it has a nutritional potential due to its chemical composition, mainly as a source of protein. Proteins are formed by peptide chains that can undergo modifications by hydrolysis and be released with different bioactivities and characteristics, such as antioxidant activity. The aim of this study was to produce a protein hydrolysate from a concentrate derived from the residual BSG from beer production and to evaluate its antioxidant potential as an influence on different functional properties. The BSG concentrate was obtained after the application of some pre-treatments that did not include a significant effect on protein extraction, by changing the pH at the isoelectric point established at 3.5. Then, hydrolysis was performed with the enzyme Alcalase, defining the condition of hydrolysis after evaluating different ratios of enzyme: substrate and hydrolysis time, where a ratio of 2:100 (E:S) and 4 h of hydrolysis was fixed. The hydrolysates were lyophilized until use. For the antioxidant activity, different mechanisms of action were tested, and the hydrolysate obtained a better result than the protein concentrate in all mechanisms: ABTS radical capture, DPPH free radical capture and iron ion chelating activity. It was also evaluated the foaming capacity and its stability, where the hydrolysis did not influence this property ( $p < 0.05$ ), remaining around 45% for foaming and 60% for foam stability. Emulsion formation was improved by the hydrolysis process as well as its stability.

**Keywords:** Agro-industrial waste; Upcycling; Protein concentrate; Protein hydrolysate.

## INTRODUÇÃO

A indústria cervejeira do Brasil é uma das maiores do mundo, estando atrás apenas dos EUA e China em volume de produção. Segundo a CERVBRAZIL (2019) o país produz 14,1 bilhões de litros de cerveja a cada ano e para isso utiliza uma vasta quantidade de malte, um dos ingredientes essenciais para a fabricação da bebida (malte, água e lúpulo). Esse processo tem duas etapas distintas, na primeira etapa de fabricação, denominada brassagem, obtêm-se duas frações: uma líquida (mosto) e uma sólida (bagaço de malte), a qual se caracteriza como resíduo. Com essa grande produção, acaba-se por gerar uma quantidade relevante de matéria orgânica descartada: a cada 100 L de cerveja, são produzidos 20 kg do resíduo úmido, representando 85% do total de resíduo sólido do processo cervejeiro (MUSSATTO, DRAGONE E ROBERTO, 2006). De acordo com Roth et al. (2019), estima-se que a produção mundial anual de bagaço de malte (BM) é de aproximadamente 390 milhões de toneladas.

O BM é um subproduto com alto teor proteico em sua composição (18-30% m/m), sendo essa variação dependente da matéria-prima, adjuntos e o processo de produção de cerveja utilizado (QIN, JOHANSEN E MUSSATTO, 2018). O teor proteico do BM é bem superior quando comparado ao de outros materiais lignocelulósicos e agroindustriais (MUSSATTO, DRAGONE E ROBERTO, 2006).

Apesar da grande disponibilidade do bagaço de malte, as pesquisas com esse subproduto ainda são muito limitadas. O aumento do conhecimento de suas características, bem como das propriedades funcionais e tecnológicas das proteínas que o compõem aumentaria muito sua aplicabilidade industrial e, portanto, é um objeto de pesquisa que requer maior investigação.

As proteínas são indispensáveis à saúde por serem fontes de aminoácidos essenciais ao organismo humano, além de possuírem uma extensa variedade de propriedades estruturais e funcionais, onde desempenham um papel de grande importância sobre o aspecto sensorial de produtos alimentícios (YADA, 2004). Essas propriedades são relacionadas à sua estrutura tridimensional, podendo sofrer alterações através de processos físico-químicos ou enzimáticos.

Em sua forma nativa, as proteínas apresentam peptídeos inativos que podem ser liberados a partir da hidrólise, apresentando assim, propriedades diferentes daquelas que a proteína original possuía. A obtenção de peptídeos bioativos a partir de diversas fontes, tem sido objeto de diferentes estudos que visam explorar esse potencial para diferentes fins.

A atividade antioxidante é uma das propriedades de peptídeos obtidos a partir do BM que apresentam resultados promissores. Conolly et al. (2019) verificaram que

hidrolisados produzidos a partir da aplicação de diferentes enzimas comerciais (Shearzyme, Ultraflo, Alcalase e Flavourzyme) em concentrado proteico de BM continham peptídeos com potencial antioxidante acima de 85% frente aos diferentes métodos testados, ORAC, FRAP e ABTS. Outros trabalhos corroboram os resultados encontrados e despertam maiores expectativas para a utilização desse resíduo como fonte de compostos bioativos (CERMEÑO et al., 2019; VIEIRA et al., 2017; DELCOUR, BRIJS & CELUS, 2007).

Diante do exposto, esse estudo teve como objetivo produzir um hidrolisado proteico a partir de um concentrado derivado do bagaço de malte residual da produção de cerveja e avaliar seu potencial antioxidante tal como a influência em diferentes propriedades funcionais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material**

O bagaço de malte utilizado neste estudo foi doado por uma microcervejaria de Porto Alegre (RS, Brasil), proveniente da fabricação de cerveja tipo *Pilsen*. O BM foi coletado no dia de produção da cerveja e foi mantido sob congelamento, em recipiente vedado, até a realização das análises. A enzima Alcalase foi cedida pela LNF Latino Americana (Bento Gonçalves, RS, Brasil).

### **Métodos**

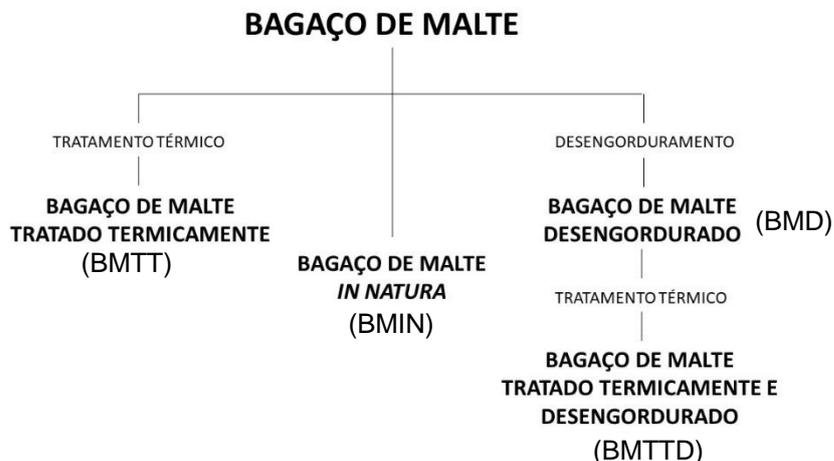
#### ***Avaliação dos pré-tratamentos e rendimento da extração proteica***

Para se alcançar o maior rendimento de extração das proteínas, foram testados alguns procedimentos, conforme apresentado no fluxograma da Figura 1. Aplicaram-se dois tratamentos de forma individual (tratamento térmico (BMTT) e extração de lipídios com solvente (BMD)) e um tratamento combinado (tratamento térmico com posterior extração de lipídios com solvente (BMTTD)). Esses tratamentos foram comparados com a extração direta, sem nenhum pré-tratamento (BMIN).

O tratamento térmico foi realizado em estufa a 100 °C por 2 horas, onde o BM foi espalhado em uma bandeja formando uma camada fina de 5 mm de altura. A amostra foi resfriada em temperatura ambiente, moída em moinho de facas e peneirada, sendo utilizado para análise o conteúdo retido na peneira com *tyler* 20. O BM desengordurado foi obtido a partir do tratamento com solvente, conforme Wang et al. (1999), utilizando hexano na proporção 1:3 (BM:hexano), sob agitação em *shaker* (50 °C / 30 minutos); a fase orgânica foi removida por filtração em papel filtro qualitativo e o BM desengordurado foi mantido em temperatura ambiente para evaporação do solvente residual por 8 horas. Após este tratamento, o material foi dividido em duas frações: a

primeira foi congelada e a segunda foi submetida ao mesmo tratamento térmico que o BMTT.

**Figura 1.** Fluxograma dos pré-tratamentos aplicados no bagaço de malte



A extração proteica seguiu o mesmo procedimento para as quatro amostras avaliadas (BMIN, BMTT, BMD e BMTTD). Para isso, a partir de 50 g de amostra, utilizou-se uma solução alcalina de NaOH 0,05 M em uma proporção (1:5), conforme Modesti (2006). Essa mistura foi homogeneizada em *blender* por dois minutos e quantidade de proteína extraída em cada amostra foi quantificada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Para o rendimento da extração, relacionou-se o teor de proteína do BM e a quantidade de proteína extraída em cada um dos tratamentos, conforme a Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Proteína BM (mg/g)}}{\text{Proteína extraída (mg/g)}} \times 100 \quad (1)$$

#### **Determinação do ponto isoelétrico (pI)**

Conforme proposto por Mastroeni & Gern (2008), o ponto isoelétrico (pI) foi definido como o pH onde ocorreu a maior precipitação de proteínas na suspensão proteica preparada com o BM e NaOH 0,05 M (1:3). Analisou-se a faixa de pH 2,0 – 6,0, sendo o ajuste realizado através da adição de HCl 1,0 M. As amostras foram centrifugadas (12000 x g/ 20 min), sendo a quantificação proteica realizada no sobrenadante e no precipitado, através do método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

#### **Obtenção do concentrado proteico de BM**

As proteínas foram extraídas e concentradas conforme Vieira et al. (2017) com modificações. Para isso, utilizou-se o BM adicionado da solução extratora (NaOH 0,05 M) na proporção 1:3 (BM:NaOH). Essa mistura foi mantida sob agitação por 2 h/ 40 °C. Após, centrifugou-se (12000 x g/ 18 min/ 4 °C) e separou-se o sobrenadante do filtrado. No sobrenadante iniciou-se o processo de precipitação das proteínas pelo método de variação de pH proposto por Nolsøe e Undeland (2009). Para isso, fez-se a adição de HCl 1,0 M até o pH pré-estabelecido como ponto isoelétrico. Durante essa etapa, a solução foi mantida sob agitação em temperatura ambiente e, após atingir o pH desejado, manteve-se o sistema nessas condições por 30 minutos. Após, centrifugou-se novamente para separação do precipitado (o qual corresponde ao concentrado proteico) que foi posteriormente ultracongelado (-86 °C) e liofilizado, resultando no concentrado proteico liofilizado (CPBM). O produto obtido foi acondicionado em recipiente vedado, armazenado em temperatura de congelamento e o teor de proteínas determinado pelo método de Lowry.

#### ***Composição centesimal do bagaço de malte e do concentrado proteico***

O BM e o concentrado proteico foram caracterizados conforme os métodos da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2000), sendo determinado os teores de umidade (AOAC 925.45b), proteínas (AOAC 960.52), lipídios (AOAC 920.39) e cinzas (AOAC 923.03); o conteúdo de carboidratos totais foi estimado por diferença.

#### ***Produção do hidrolisado proteico de bagaço de malte***

Foi preparada uma solução de CPBM com Tris-HCl 20 mmol, pH 8,0 numa concentração de 10 mg/mL, sendo essa solução o substrato para a reação enzimática. Seguiu-se a metodologia proposta por Vieira et al. (2017) com adaptações, onde foram testadas três relações enzima:substrato, sendo elas: 2:100; 10:100 e 20:100; além de diferentes tempos de hidrólise: 30 min; 1 h; 2 h; 3 h e 4 h. A hidrólise foi realizada em estufa com agitação e temperatura regulada em 50°C, conforme a temperatura ideal para reação da enzima Alcalase (Conolly et al., 2019; Vieira et al., 2017).

Em cada um dos intervalos de tempo, retirou-se uma alíquota dos hidrolisados (2:100; 10:100 e 20:100) que foram submetidos à inativação enzimática por aquecimento a 100 °C por 5 minutos. Em seguida, centrifugou-se (12000 xg; 10 min; 4 °C) e as amostras foram passadas por um filtro de 0,45 µm. A definição da condição de hidrólise, tempo e relação E:S, foi obtida a partir da determinação da capacidade de sequestro do radical ABTS. O sobrenadante foi liofilizado e definido como HPBM.

#### ***Ultrafiltração do HPBM***

A ultrafiltração foi realizada utilizando discos de membranas com corte de peso molecular de 3 kDa gerando duas frações: < 3 kDa e > 3kDa. A atividade antioxidante foi determinada em ambas as frações e no HPBM sem ultrafiltração (VIEIRA et al., 2017).

### ***Avaliação da atividade antioxidante do HPBM e do CPBM***

#### ***Captura do radical ABTS<sup>•+</sup>***

Para medir a capacidade de captura do radical ABTS, preparou-se uma solução de ABTS (7 mM) de onde foi retirado 5 mL e homogeneizado com 88 µL de persulfato de potássio (2,45 mM). Essa solução foi mantida em repouso por 12 a 16 h no escuro, formando o radical ABTS<sup>•+</sup>. Após esse período, foi feita a diluição do radical com tampão fosfato salino (50 mM) (PBS; pH 7,4) até uma absorbância de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm. Adicionou-se em tubos 1 mL da solução do radical preparado e 10 µL da amostra. Após 6 minutos de reação, fez-se a leitura em espectrofotômetro, conforme descrito por Re et al. (1999), com adaptações de Zheng et al. (2016).

#### ***Captura do radical livre DPPH***

A capacidade de captura do radical livre DPPH foi mensurada a partir da adição de 3,9 mL de uma solução de DPPH (0,06 mM) em 100 µL de amostra de CPBM e HPBM que foram homogeneizadas e mantidas em repouso em um ambiente escuro por 45 minutos. Em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro a 515 nm, conforme descrito por Brand-Williams et al. (1995).

#### ***Atividade quelante de Ferro***

Conforme o método proposto por Chang et al. (2007), adicionou-se 1 mL da amostra a 3,7 mL de água destilada em um tubo de ensaio. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de sulfato ferroso (2 mM) e 0,2 mL de solução de ferrozina (5 mM). A mistura foi mantida a temperatura ambiente e após 10 minutos de reação, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 562 nm.

### ***Estudo das propriedades funcionais do HPBM e CPBM***

#### ***Capacidade de formação de espuma e emulsão***

As propriedades funcionais de formação de espuma e formação de emulsão tal como suas estabilidades, seguiram a metodologia de Phongthai & Rawdkuen (2019). Para tanto, preparou-se 20 mL de solução das amostras de CPBM e HBMP (1% p/v) com água destilada para a determinação de formação de espuma, em seguida homogeneizou-se em ultraturrax (10000 x g; 1 min) e os volumes antes e após

homogeneização foram utilizados na Equação 2. A estabilidade da espuma foi determinada a partir do volume após 30 minutos em repouso, conforme a Equação 3.

$$\text{Formação de espuma (\%)} = \frac{\text{Volume espuma (mL)}}{\text{Volume inicial (mL)}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Estabilidade da espuma (\%)} = \frac{\text{Volume espuma (mL)}}{\text{Volume espuma } t = 30 \text{ min (mL)}} \times 100 \quad (3)$$

Para a formação de emulsão, foram preparadas soluções com óleo de soja (20 mL; 5% m/v), homogeneizadas em ultraturrax (10000 x g; 1 min) e em seguida centrifugadas a 1500 x g por 5 min. A estabilidade da emulsão foi mensurada após aquecimento das amostras a 80 °C por 30 min e centrifugação (1500 x g; 5 min). As equações abaixo foram utilizadas.

$$\text{Formação de emulsão (\%)} = \frac{\text{Volume emulsão (mL)}}{\text{Volume total (mL)}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Estabilidade da emulsão (\%)} = \frac{\text{Volume emulsão após } 80^{\circ}\text{C (mL)}}{\text{Volume total (mL)}} \times 100 \quad (4)$$

### **Análise estatística**

As análises foram feitas em triplicata e os resultados submetidos à ANOVA e teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando o Software SAS.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Avaliação dos pré-tratamentos e rendimento da extração proteica**

O rendimento da extração proteica com os diferentes pré-tratamentos, comparados à amostra *in natura* estão apresentados na Tabela 1, sendo que esses resultados refletem a melhor condição para extração de proteínas do BM. Foi observado que a maior quantidade de proteínas foi extraída na amostra tratada termicamente (BMTT) e na amostra sem tratamento (BMIN), sendo que não houve diferença significativa entre essas duas amostras.

Qin, Johansen e Mussatto (2018) estudaram diferentes estratégias de pré-tratamento para extração de proteínas de BM incluindo tratamento alcalino, ácido, enzimático e hidrotérmico, e suas combinações. Os autores concluíram que o tratamento hidrotérmico é uma opção interessante de pré-tratamento devido a

seletividade do processo de extração e rendimento de aproximadamente 60%. Porém, apesar de ser um processo brando, com temperatura de 60 °C, é um tratamento de maior custo energético e maior intervalo de tempo entre a coleta e extração das proteínas do BM, o que pode causar alterações químicas e físicas no bagaço, como reações de oxidação lipídica. Outros estudos com diferentes subprodutos agroindustriais, aplicaram pré-tratamentos de maior complexidade, como ultrassom de alta potência e tratamentos enzimáticos obtendo resultados promissores, porém com um custo de operação elevado em comparação com tratamentos térmicos, por exemplo (BYANJU et al., 2019; HAJHA et al., 2014; LIU et al., 2008).

Tabela 1 – Rendimento da extração de proteínas do BM com e sem pré-tratamentos.

<b>Amostra</b>	<b>Quantidade de proteína extraída (mg/g)</b>	<b>Rendimento da extração (%)</b>
BMIN	121,17 <sup>a</sup> ± 1,21	52,02
BMTT	123,07 <sup>a</sup> ± 1,18	52,83
BMD	100,75 <sup>b</sup> ± 1,75	43,26
BMTTD	72,09 <sup>c</sup> ± 0,85	30,94

Média ± desvio padrão de três repetições. Letras iguais na mesma coluna indicam que não existe diferença estatística entre as amostras ( $p < 0,05$ ). BMIN: bagaço de malte in natura; BMTT: bagaço de malte tratado termicamente; BMD: bagaço de malte desengordurado; BMTTD: bagaço de malte tratado termicamente e desengordurado.

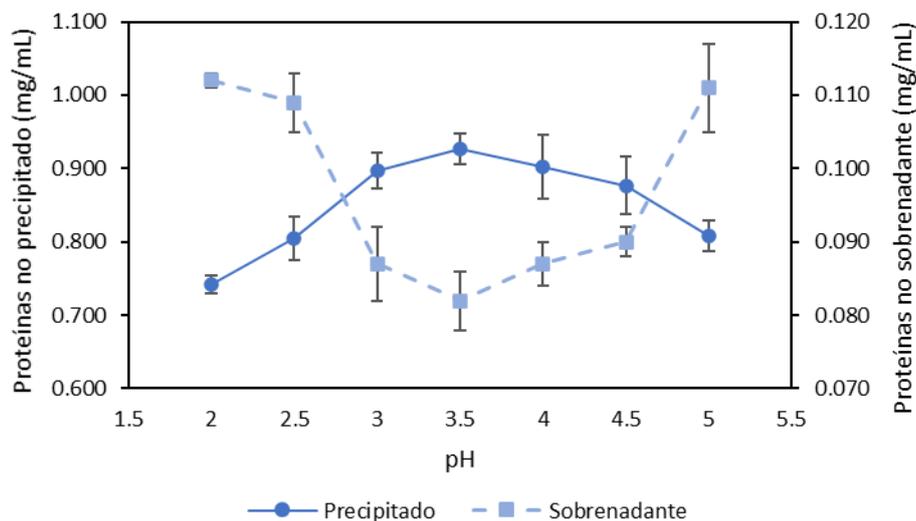
A partir dos resultados, pode-se considerar que a utilização do BM na forma *in natura* é a ideal, dentre os tratamentos testados, por dois principais motivos. Primeiramente, elimina qualquer etapa prévia da extração, diminuindo o tempo necessário para extração e custos com secagem e solvente para desengordurar as amostras. Além disso, o emprego de temperatura acima de 50 °C para secagem do BM seria favorável à ocorrência da Reação de Maillard, vista a presença de aminoácidos e carboidratos em abundância nesse tipo de material. Ainda, nesta condição de temperatura, poderia ocorrer também a desnaturação proteica promovendo a perda de propriedades funcionais e tecnológicas da mesma (HUANG et al., 2019; SHIBAO E BASTOS, 2011).

#### **Determinação do ponto isoelétrico (pI)**

A Figura 2 apresenta o gráfico com as curvas de concentração proteica no precipitado e no sobrenadante sob diferentes valores de pH. Pode-se constatar que a solubilidade proteica é maior nos valores de pH mais extremos e, à medida que se aproxima de 3,5, a solubilidade diminui – menor concentração no sobrenadante e maior no precipitado – sendo este valor considerado o pI para o BM. Vieira et al. (2017), em

estudo para obtenção de um hidrolisado proteico de BM, utilizaram pH 3 como ponto de precipitação proteica. Outros autores utilizaram valores de pH entre 3 e 5 como pl das proteínas do BM (CONOLLY et al., 2019; CERMEÑO et al., 2019).

Figura 2 – Determinação do ponto isoelétrico das proteínas do bagaço de malte



Média de três repetições e desvio padrão.

### Composição centesimal

Os resultados da composição centesimal estão apresentados na Tabela 2. O bagaço de malte utilizado foi coletado *in natura* com umidade de 76,8%, Robertson et al. (2010) avaliaram o teor de umidade em BM provenientes de diferentes cervejarias e encontraram um teor de umidade entre 75 e 80%, comprovando esse como um teor médio de umidade nesse tipo de subproduto. A composição do BM varia de acordo com o tipo de matéria-prima utilizada, mas, de forma geral, é considerado um material lignocelulósico, rico em proteínas e fibras – principalmente arabinosilano, lignina e celulose – além de uma quantidade considerável de sílica e compostos fenólicos do grão de cevada (Roth, Jekle e Becker, 2019; Mussatto, Dragone e Roberto, 2006).

Outros materiais lignocelulósicos como aveia, arroz e trigo contém um teor proteico variando entre 3 e 5%, sendo assim, inferior ao observado no BM (MUSSATTO, DRAGONE E ROBERTO, 2006; THEANDER E AMAN, 1984). A quantidade de proteínas no BM estudado destaca-o como um potencial fonte proteica vegetal, o que é confirmado pelo teor de proteínas do concentrado proteico (65,2%), substancialmente superior ao do bagaço prévio a extração ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição centesimal do bagaço de malte tipo Pilsen e do concentrado proteico, em base seca.

Constituinte	Bagaço de malte (% m/m)	Concentrado proteico (% m/m)
Proteínas	23,3 <sup>b</sup> ± 0,40	65,2 <sup>a</sup> ± 0,85
Lipídios	15,7 <sup>a</sup> ± 2,90	7,9 <sup>b</sup> ± 1,22
Cinzas	4,2 <sup>a</sup> ± 0,19	1,9 <sup>b</sup> ± 0,12
Carboidratos*	56,7	25,0

Média ± desvio padrão de três repetições. \*Estimado por diferença (100%). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

O teor de carboidratos elevado do BM era esperado, já que se trata de um subproduto obtido a partir de cereais com elevado teor de fibras e outros carboidratos não fibrosos (CNF) como a cevada que, conforme estudo realizado por Mayer et al. (2007), tem em média 60,4% de CNF e 22,1% de fibra total. Pode-se também observar que o conteúdo de lipídios e cinzas diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) no concentrado, o que pode ser explicado pelo método de extração, onde na primeira etapa de solubilização alcalina ocorre a separação da maior parte das proteínas insolúveis e lipídios por centrifugação e, na segunda etapa, a precipitação da proteína em pH ácido, que resulta num aumento superior a 100% no teor proteico do concentrado em relação ao BM (IJAROTIMI et al., 2018).

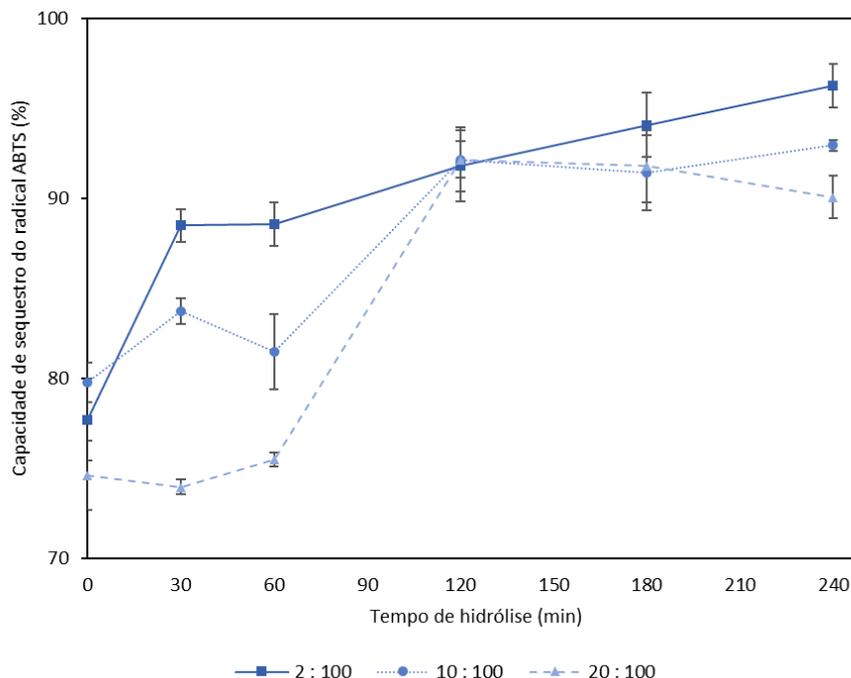
#### **Efeito da relação E:S e tempo de hidrólise da capacidade de sequestro do radical ABTS pelo HPBM**

A capacidade de sequestro do radical ABTS foi utilizada como parâmetro para definir condição de hidrólise do CPBM. Para isso, foi avaliado a influência da concentração de enzima em relação ao substrato e o tempo de hidrólise. Conforme o gráfico apresentado na Figura 2, é possível observar que a maior concentração de Alcalase no  $t=0$  apresenta a menor atividade antioxidante, porém, ao longo da hidrólise ocorre uma elevação nessa atividade até convergir com as concentrações mais elevadas, atingindo uma atividade superior (>90%) no tempo máximo de hidrólise avaliada.

Diferentes concentrações já foram testadas para a hidrólise de CPBM pela enzima Alcalase. Vieira et al. (2017) utilizaram uma relação 10:100 por 4 h em seu estudo comparando a efetividade da hidrólise da Alcalase em relação à Neutrase e encontraram resultados que indicavam uma atividade hidrolítica superior da Alcalase nas condições avaliadas. Celus, Brijs & Delcour (2007) utilizaram uma relação E:S de 2,5% para a hidrólise de CPBM e observaram uma maior efetividade em 120 minutos de hidrólise. A

partir do resultado observado, pode se definir a condição de hidrólise de acordo com o parâmetro definido – capacidade de sequestro do radical ABTS – estabelecendo-se uma relação 2:100 (E:S) e 240 minutos de hidrólise.

Figura 2 – Influência da relação E:S e do tempo de hidrólise na capacidade de sequestro do radical ABTS

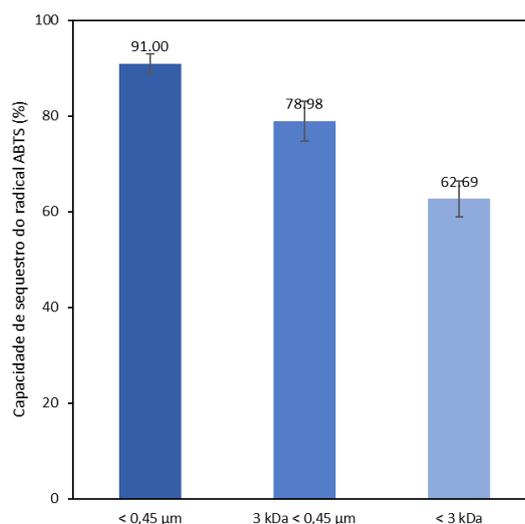


Média de três repetições e desvio padrão.

### Efeito da ultrafiltração do HPBM na capacidade do sequestro do radical ABTS

Peptídeos com baixo peso molecular geralmente apresentam maior atividade antioxidante do que aqueles com maior massa molecular. Porém, esse fato pode variar de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos à amostra (ZHOU; SUN; CANNING, 2012; COELHO; SALAS-MELLADO, 2014). Conforme observa-se na Figura 3, a ultrafiltração teve um efeito negativo na capacidade de sequestro do radical ABTS, demonstrando que essa bioatividade está concentrada na fração original do hidrolisado – filtração inicial por membrana de 0,45 um para eliminação de interferentes – e esse efeito pode estar relacionado às interações sinérgicas de peptídeos com diferentes tamanhos moleculares, conforme observado, também, por outros autores (LAPSONGPHON; YONGSAWATDIGUL, 2013; COELHO; SALAS-MELLADO, 2018). A partir do observado, deu-se sequência no estudo sem que fosse realizada a ultrafiltração do hidrolisado obtido.

Figura 3 – Atividade obtida nas diferentes frações de peso molecular do HPBM.



Média de três repetições e desvio padrão.

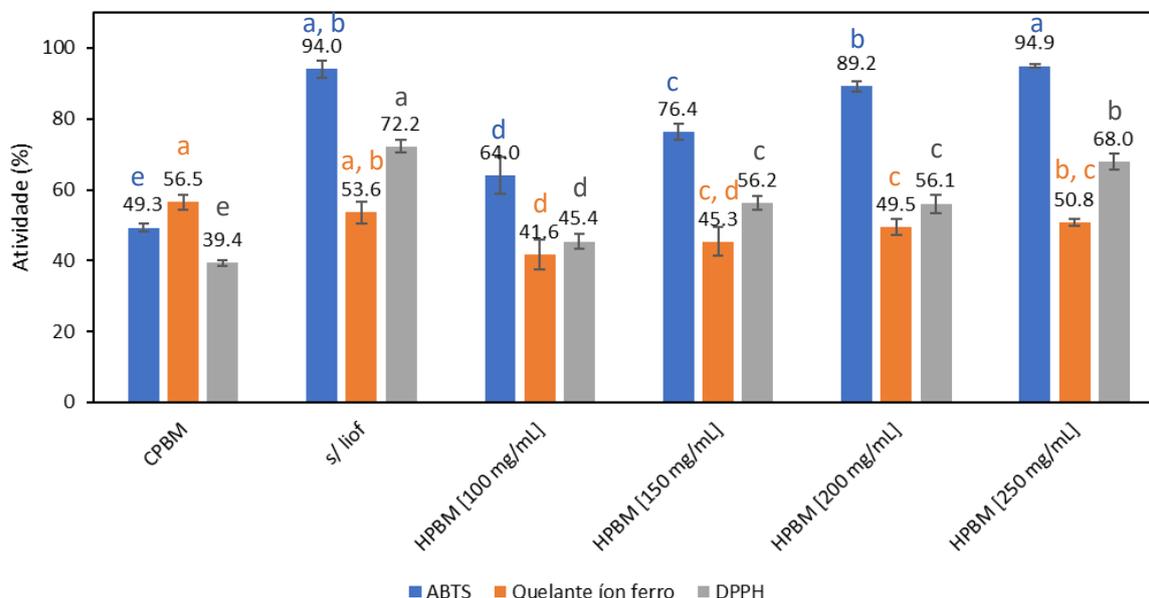
### **Avaliação da atividade antioxidante do HPBM e do CPBM**

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada através de diferentes mecanismos, onde foram avaliadas diferentes concentrações do CPBM e HPBM após liofilização – comparando-se com o não liofilizado. Segundo Chen, Bertin & Froidi (2013), esses resultados podem ser utilizados para expressar a efetiva capacidade antioxidante da amostra quando se tem efeito antioxidante a 50% (EC50).

Conforme o gráfico da Figura 4, o CPBM já apresentava uma atividade antioxidante relevante, porém é interessante observar que a hidrólise contribuiu para o aumento da atividade, com destaque para o sequestro do radical ABTS, onde houve um aumento de mais de 50% em relação ao CPBM. Através dos resultados obtidos para atividade quelante de íon ferro, é possível observar uma menor influência da hidrólise em relação ao concentrado original, mantendo-se em torno de 50% no HPBM sem liofilização e nas diferentes concentrações da solução com HPBM pós-liofilização, isso pode ter ocorrido devido à especificidade da Alcalase que pode promover a liberação de peptídeos que não apresentam a bioatividade em questão (RAJAPAKSE et al., 2005; UDENIGWE & ALUKO, 2012).

Quando se observa a captura do radical ABTS, pode-se afirmar que a liofilização não gerou impacto negativo significativo no hidrolisado ressuspendido à 250 mg/mL, o que não ocorreu quando o mesmo foi ressuspendido nas demais concentrações. Quando se analisa o radical DPPH, pode se concluir que, apesar de apresentar uma diferença estatística, esse impacto é mínimo perante as vantagens de conservação que a liofilização possibilita.

Figura 4 – Determinação da atividade quelante de ferro e capacidade de sequestro do radical ABTS e DPPH pelo CPBM e HPBM



Média de três repetições e desvio padrão. Letras iguais e com a mesma cor indicam que não há diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ). CPBM: concentrado proteico de bagaço de malte; s/ liof: hidrolisado proteico sem liofilização; HPBM [100 mg/mL]: hidrolisado proteico liofilizado e ressuspendido a 100 mg/mL; HPBM [150 mg/mL]: hidrolisado proteico liofilizado e ressuspendido a 150 mg/mL; HPBM [200 mg/mL]: hidrolisado proteico liofilizado e ressuspendido a 200 mg/mL; HPBM [250 mg/mL]: hidrolisado proteico liofilizado e ressuspendido a 250 mg/mL;

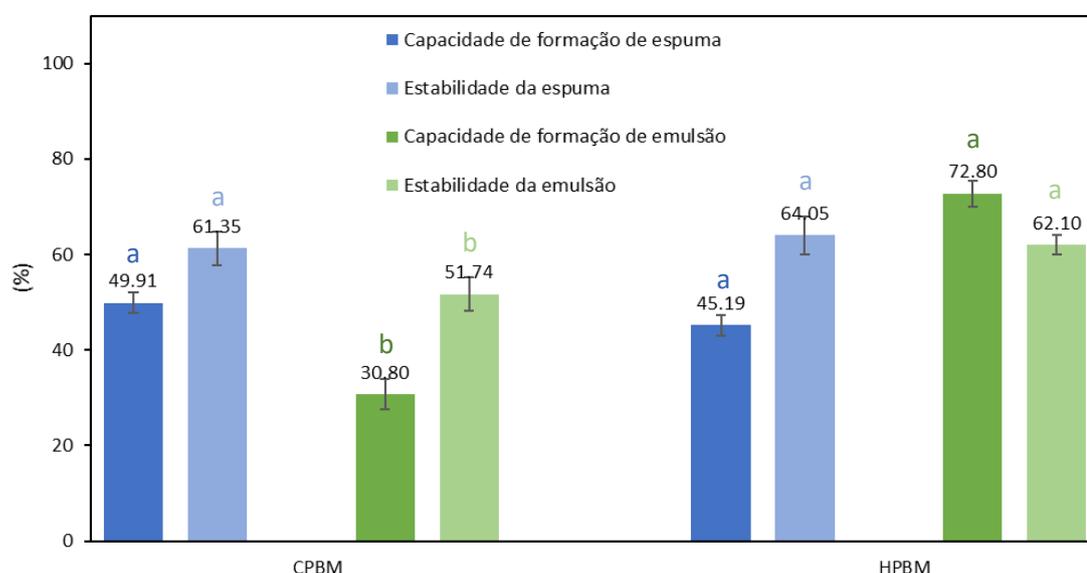
Connolly et al. (2019) utilizaram o BM para obter peptídeos e avaliar sua atividade antioxidante por diferentes mecanismos, dentre eles a captura do radical ABTS, onde concluiu que a hidrólise do concentrado obtido promoveu um aumento dessa atividade, chegando a 78%, da mesma forma que observado no presente trabalho. Vieira et al. (2017), apesar de utilizar outros mecanismos para avaliar a atividade dos hidrolisados obtidos de BM, também atestou a efetiva bioatividade dos peptídeos gerados pela hidrólise com Alcalase, confirmando que é a enzima com maior potencial para obter peptídeos com atividade antioxidante, quando comparada à outras, como a Flavourzyme, por exemplo.

### Estudo das propriedades funcionais do HPBM e CPBM

A capacidade de formação de espuma e a estabilidade da espuma (Figura 5) não foram afetadas pelo processo de hidrólise ( $p < 0,05$ ). Makri e Doxastakis (2006) visualizaram que o pH tem influência na estrutura proteica, levando a diferenças na capacidade de formação de espuma, além de que peptídeos maiores efetivamente

formam películas flexíveis em torno das bolhas de ar, proporcionando maior estabilidade. Por outro lado, notou-se uma influência positiva na formação e estabilidade da emulsão após a hidrólise do concentrado. Celus et al. (2006) avaliaram propriedades funcionais de hidrolisados proteicos de BM com diferentes enzimas e concluíram que aqueles com peptídeos de maior tamanho molecular apresentam melhor capacidade de formação de espuma e formação de emulsão, além de confirmarem a maior eficiência dos hidrolisados produzidos com Alcalase.

Figura 5 – Avaliação das propriedades de formação de espuma e emulsão pelo CPBM e HPBM



Média de três repetições e desvio padrão. Letras iguais e com a mesma cor indicam que não há diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ). CPBM: concentrado proteico de bagaço de malte; HPBM: hidrolisado proteico de bagaço de malte.

## CONCLUSÃO

De encontro com evidências já relatadas, observou-se o potencial do bagaço de malte como fonte proteica. Foi possível observar que a aplicação da enzima Alcalase para hidrólise do concentrado proteico obtido por extração alcalina seguido de precipitação ácida é efetiva na produção de um hidrolisado com peptídeos potencialmente antioxidantes, onde se atingiu uma inibição do radical ABTS superior a 90% e em torno de 70% para DPPH, além disso propriedades importantes para a tecnologia de alimentos também foram afetadas, promovendo um aumento na capacidade de formação (> 40%) e estabilidade da emulsão (> 11%). Estudos complementares são necessários para identificar os peptídeos responsáveis por essas

bioatividades e explorar outras propriedades a partir dessa fonte nutricionalmente rica e subutilizada após a produção de cerveja.

## REFERÊNCIAS

- AOAC. **Official methods of analysis**. Association of Official Analytical Chemists 17<sup>o</sup> ed., Gaithersburg, 2000.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BYANJU, B.; RAHMAN, M.M.; HOJILLA-EVANGELISTA, M.P.; LAMSAL, B. P. Effect of high-power sonication pretreatment on extraction and some physicochemical properties of proteins from chickpea, kidney bean, and soybean. International. **Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 712-721, 2019.
- CELUS, I.; BRIJS, K.; DELCOUR, J. A. The effects of malting and mashing on barley protein extractability, **Journal of Cereal Science**. v. 44, p. 203–211, 2006.
- CERMEÑO, M.; CONNOLLY, A.; O'KEEFFE, M.; FLYNN, C.; ALASHI, A.; ALUKO, R.; FITZGERALD, R. Identification of bioactive peptides from brewers' spent grain and contribution of Leu/Ile to bioactive potency. **Journal of Functional Foods**, v.60, 2019.
- CERVBRASIL - **Associação Brasileira da Indústria da Cerveja**. Dados do setor, 2018. Disponível em: [http://www.cervbrasil.org.br/novo\\_site/dados-do-setor/](http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/). Acesso: 15 de abril de 2021.
- CHANG, C.Y.; WU, K. C.; CHIANG, S. H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1537-1543, 2007.
- COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. M. Chemical characterization of chia (*Salvia hispanica* L.) for use in food products. **Journal of Food and Nutrition Research**. v. 2, p. 263-269, 2014.
- COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. M. How extraction method affects the physicochemical and functional properties of chia proteins. **LWT-Food Science and Technology**, v. 96, p. 26-33, 2018.
- CONNOLLY, A.; CERMEÑO, M.; CROWLEY, D.; O'CALLAGHAN, Y.; O'BRIEN, N.; FITZGERALD, R. Characterisation of the in vitro bioactive properties of alkaline and

- enzyme extracted brewers' spent grain protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 121, p. 524-532, 2019.
- HAIJHA, H. N.; BOUSSETA, N.; LOUKA, N.; MAROUN, R. G.; VORABIEV, E. A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. **Food Research International**, v. 65, p. 462-468, 2014.
- HUANG, G. Q.; WANG, H.O.; WANG, F. W.; DU, Y. L.; XIAO, J. X. Maillard reaction in protein – polysaccharide coacervated microcapsules and its effects on microcapsule properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 155, p. 1194-1201, 2019.
- IJAROTIMI, O. S.; MALOMO, S. A.; FAGBEMI, T. N.; OSUNDAHUNSI, O. F.; ALUKO, R. E. Structural and functional properties of *Buchholzia coriacea* seed flour and protein concentrate at different pH and protein concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 275-288, 2018.
- LAPSONGPHON, N.; YONGSAWATDIGUL, J. Production and purification of antioxidant peptides from a mungbean meal hydrolysate by *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase. **Food Chemistry**, v. 141, p. 992-999, 2013.
- LIU, J.; GUAN, X.; ZHU, D.; SUN, J. Optimization of the enzymatic pretreatment in oat bran protein extraction by particle swarm optimization algorithms for response surface modeling. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1913-1918, 2008.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-27, 1951.
- MAKRI, E. A.; DOXASTAKIS, G. I. Emulsifying and foaming properties of *Phaseolus vulgaris* and *coccineus* proteins. **Food Chemistry**, v. 98, p. 558-568, 2006.
- MASTROENI, M.; GERN, R. M. M. **Bioquímica prática adaptada**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2008.
- MAYER, E. T.; FUKE, G.; NÖRNBERG, J. L.; MINELLA, E. Caracterização nutricional de grãos integrais e descascados de cultivares de cevada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1635-1640, 2007.
- MODESTI, C. F. **Obtenção e caracterização de concentrado proteico de folhas de mandioca submetido a diferentes tratamentos**. Dissertação de mestrado. Lavras: UFLA, 2006.

MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates.

**Process Biochemistry**, v. 41, p. 447-456, 2006.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 1-14, 2006.

NOLSØE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, p. 1–27, 2009.

PHONGTHAI, S.; RAWDKUEN, S. Purification and characterization of antioxidant peptides from rice bran protein hydrolysate stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. **Cereal Chemistry**, v. 97, p. 316–325, 2019.

QIN, F.; JOHANSEN, A. Z.; MUSSATTO, S. I. Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer's spent grains. **Industrial Crops & Products**, v. 125, p. 443-453, 2018.

RAJAPASKE, N.; MENDI, E.; JUNG, W. K.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel and its antioxidant properties. **Food Research International**, v. 38, p. 175-182, 2005.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

ROBERTSON, J. A.; l'ANSON, K. J. A.; TREIMO, J.; FAULDS, C. B.; BROCKLEHURST, T. F.; EIJSINK, V. G. H.; WALDRON, K. W. Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 890-896, 2010.

ROTH, M.; JEKLE, M.; BECKER, T. Opportunities for upcycling cereal byproducts with special focus on Distiller's grains. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 282-293, 2019.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista de Nutrição**, v. 24, p. 895-904, 2011.

THEANDER, O.; AMAN, P. Anatomical and Chemical Characteristics. Straws and Other Fibrous. **Byproducts as Feed**, p. 45-78, 1984.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing and potencial health benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 11-24, 2012.

VIEIRA, E. F.; SILVA, D. D.; CARMO, H.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Protective ability against oxidative stress of brewers' spent grain protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v.228, p.602-609, 2017.

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M.; BURSK, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice brain protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 411-416, 1999.

YADA, R Y. **Proteins in Food processing**. Washington: Cambridge England, 2004.

ZHOU, K.; SUN, S.; CANNING, C. Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. **Food Chemistry**. v. 135, p. 1192-1197, 2012.

## 5. CONCLUSÕES DO TRABALHO

- Foi possível caracterizar a composição centesimal o bagaço de malte, observando seu potencial como fonte de proteínas (23,3%), sendo possível obter um concentrado proteico com teor de proteínas superior a 65%.
- Os pré-tratamentos testados - aplicação de calor e desengorduramento da amostra - não influenciaram na extração proteica.
- A relação enzima:substrato em menor concentração (2:100) foi a que apresentou melhor desempenho na hidrólise no tempo de 4 h, com a enzima Alcalase.
- O hidrolisado obtido apresentou um bom desempenho em todos os mecanismos de ação para atividade antioxidante avaliado, com destaque para a atividade de captura do radical ABTS onde a atividade alcançou valores acima de 90%.
- A capacidade de formação de espuma não foi afetada pela hidrólise do concentrado proteico de bagaço de malte, por outro lado, a formação de emulsão foi melhorada chegando a 70% após a hidrólise, assim como a sua estabilidade.
- São necessários mais estudos explorando outras propriedades tecnológicas e funcionais dos peptídeos obtidos pela hidrólise das proteínas do bagaço de malte a fim de valorizar esse resíduo e promover, efetivamente, seu *upcycling*.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cada vez mais se busca alternativas para evitar o desperdício de alimentos ou seu uso parcial. Diversos estudos buscam valorizar os resíduos agroindustriais e encontrar neles fonte para desenvolver a ciência e tecnologia de alimentos. A exploração da bioatividade de peptídeos é um campo amplo e abre margem para diversos estudos. No caso desse trabalho, é interessante deixar pontuadas algumas ressalvas e indicações para o futuro.

É importante ressaltar que essa dissertação foi desenvolvida quase integralmente durante o período de pandemia da COVID 19, o que limitou parcialmente o seu desenvolvimento experimental. Tratando-se de peptídeos bioativos, é interessante que após a comprovação da atividade, seja feita a identificação dos peptídeos em questão através de análise proteômica, o que não foi possível devido à limitações para envio de amostras à Universidade parceira.

Inicialmente, havia o objetivo de se testar a aplicação do hidrolisado proteico em produtos de panificação e avaliar seu efeito tecnológico nesse tipo de produto e a conservação da atividade antioxidante após o processamento. Portanto, fica registrada uma indicação para futuros trabalhos. Apesar de todos os imprevistos que a situação atual nos impôs, foi possível desenvolver um trabalho coerente e com resultados promissores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. Elsevier Applied Science Publishers, 1986.

AJANAKU, K. O.; DAWODU, F. A.; AJANAKU, C. O.; NWINKYI, O. C. Functional and nutritional properties of spent grain enhanced cookies. **American Journal of Food Technology**, v. 6, p. 763-771, 2011.

AJIBOLA, C. F.; MALOMO, S. A.; FAGBEMI, T. N.; ALUKO, R. E. Polypeptide composition and functional properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) albumin, globulin and protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, v.56, p.189-200, 2016.

ALEXANDRE, H. V.; SILVA, F. L. H. da.; GOMES, J. P.; SILVA, O. S. da.; CARVALHO, J. P. D.; LIMA, E. E. de. Cinética de secagem do resíduo do abacaxi enriquecido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.17, p.640-646, 2013.

AOAC. **Official methods of analysis**. Association of Official Analytical Chemists 17<sup>o</sup> ed., Gaithersburg, 2000.

BEVERUNG, C. J.; RADKE, C. J.; BLANCH, H. W. Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. **Biophysical Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 59-80, 1999.

BIELI, B. C.; MARQUES, D. R.; MARCHI, L. B.; QUELHAS, J. O. F.; CHINELLATO, M. M.; MONTEIRO, C. C. F.; MONTEIRO, A. R. G. Produção de snack extrusado com adição de farinha de bagaço de malte. **Revista Tecnológica**, p. 321-326 2017.

BJCP - Beer Judge Certification Program. 2015. Style Guideline. Disponível em: <[https://www.bjcp.org/docs/2015\\_Guidelines\\_Beer.pdf](https://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf)>. Acesso em: 13 de maio de 2021.

BLANDINO, A.; AL-ASEERI, M.; PANDIELLA, S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Cereal-based fermented foods and beverages, **Food Research International**, v. 36, p. 527–543, 2003.

BLEIER, B. et al. Craft Beer Production. **University of Pennsylvania**. Filadélfia: editor, 2013.

BOONLA, O.; KUKONGVIRIYAPAN, U.; PAKDEECHOTE, P.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; PANNANGPETCH, P.; THAWORNCHINSOMBUT, S. Peptides-derived from thai

rice bran improves endothelial function in 2K-1C renovascular hypertensive rats.

**Nutrients**, v. 7, p. 5783–5799, 2015.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing Yeast and Fermentation**. Blackwell Publishing. p. 46-48, 108-148. 2001.

BOYE, J. I.; AKSAY, S.; ROUFIK, S.; RIBREAU, S.; MONDOR, M.; FARNWORTH, E.; RAJAMOHAMED, S. H. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 537-546, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Decreto n. 6871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**. Brasília, D.F, 5 de junho de 2009.

BRASIL. Decreto n. 9902, de 8 de julho de 2019. Regulamenta a lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**. Brasília, D.F, 8 de julho de 2019.

BYANJU, B.; RAHMAN, M.M.; HOJILLA-EVANGELISTA, M.P.; LAMSAL, B. P. Effect of high-power sonication pretreatment on extraction and some physicochemical properties of proteins from chickpea, kidney bean, and soybean. International. **Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 712-721, 2019.

CELUS, I.; BRIJS, K.; DELCOUR, J. A. The effects of malting and mashing on barley protein extractability, **Journal of Cereal Science**. v. 44, p. 203–211, 2006.

CENTENARO, G. S.; MELLADO, M. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Antioxidant activity of proteins hydrolysates of fish and chicken bones. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, p. 280-288, 2011.

CERMEÑO, M.; CONNOLLY, A.; O'KEEFFE, M.; FLYNN, C.; ALASHI, A.; ALUKO, R.; FITZGERALD, R. Identification of bioactive peptides from brewers' spent grain and contribution of Leu/Ile to bioactive potency. **Journal of Functional Foods**, v.60, 2019.

- CERVBRASIL - **Associação Brasileira da Indústria da Cerveja**. Dados do setor, 2018. Disponível em: [http://www.cervbrasil.org.br/novo\\_site/dados-do-setor/](http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/). Acesso: 15 de abril de 2021.
- CHANG, C.Y.; WU, K. C.; CHIANG, S. H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1537-1543, 2007.
- CHOKSAWANGKARN, W.; PHIPHATTANANUKOON, S.; JARESITTHIKUNCHAI, J.; ROYTRAKUL, S. Antioxidative peptides from fish sauce by-product: Isolation and characterization. **Agriculture and Natural Resources**, v.52, p.460-466 2018.
- COELHO, M. S.; AQUINO, S. A.; LATORRES, J. M.; SALAS-MELLADO, M. M. In vitro and in vivo antioxidant capacity of chia protein hydrolysates and peptides. **Food Hydrocolloids**, v. 91, p. 19-25, 2019.
- COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. M. Chemical characterization of chia (*Salvia hispanica* L.) for use in food products. **Journal of Food and Nutrition Research**. v. 2, p. 263-269, 2014.
- COELHO, M. S.; SALAS-MELLADO, M. M. How extraction method affects the physicochemical and functional properties of chia proteins. **LWT-Food Science and Technology**, v. 96, p. 26-33, 2018.
- CONNOLLY, A.; CERMEÑO, M.; CROWLEY, D.; O'CALLAGHAN, Y.; O'BRIEN, N.; FITZGERALD, R. Characterisation of the in vitro bioactive properties of alkaline and enzyme extracted brewers' spent grain protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 121, p. 524-532, 2019.
- CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D.; FONTOURA, R.; MEIRA, S.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. **Peptides**, v.61, p.48-55, 2014.
- COSTA, G. A.; BRANDELLI, A.; FRAZZON, A. P. G.; MOTTA, A. S. Antibiofilm Activity of the Antimicrobial Peptide P34 against Multispecies Biofilms. **Food Nutrition Journal**, v. 90, p. 73-84, 2019.
- DAMODARAN, D. **Food proteins: an overview**. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. Food Proteins and their Applications. New York: Marcel Dekker, 1997.
- DI BERNARDINI, R.; RAI, D.; BOLTON, D.; KERRY, J.; O'NEILL, E.; MULLEN, A.; HARNEDY-ROTHWELL, P.; HAYES, M. Isolation, purification and characterization of

antioxidant peptidic fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolyzate. **Peptides**, v.32, p.388-400, 2011.

DRAGONE, G.; ALMEIDA E SILVA, J. B. **Cerveja**. In: VENTURINI FILHO, W. G. *Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia*. São Paulo: Edgard Blücher, 2010.

ERDMANN, K.; CHEUNG, B. W. Y.; SCHÖDER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 10, p. 643-654, 2008.

EVANGELHO, J.; VANIER, N.; ZANELLA PINTO, V.; BERRIOS, J.; DIAS, A.; ZAVAREZE, E. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food Chemistry**, v.214, 460-467, 2016.

FERREIRA, C. D.; ZIEGLER, V.; LINDEMANN, I. S.; HOFFMANN, J. F.; VANIER, N. L.; OLIVEIRA, M. Quality of black beans as a function of long-term storage and moldy development: Chemical and functional properties of flour and isolated protein. **Food Chemistry**, v. 246, p. 473-480, 2018.

FIGUEIREDO, V. R. G. **Concentração e hidrólise enzimática das proteínas de okara**. Dissertação de mestrado em ciência dos alimentos. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

FONTANA, A.; CENTENARO, G. S.; PALEZI, S. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Obtenção e Avaliação de Concentrados Proteicos de Corvina (*Micropogonias furnieri*) Processados por Extração Química. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2299–2303, 2009.

FRANCO-MIRANDA, H.; CHEL-GUERRERO, L.; GALLEGOS-TINTORÉ, S.; CASTELLANOS-RUELAS, A.; BETANCUR-ANCONA, D. Physicochemical, rheological, bioactive and consumer acceptance analyses of concha-type Mexican sweet bread containing Lima bean or cowpea hydrolysates, **LWT - Food Science and Technology**, v.80, p.250-257, 2017.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado proteico de torta de Castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, 2000.

GOUFO, P.; TRINDADE, H. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, -oryzanol and phytic acid. **Food Science and Nutrition**, v. 2, p. 75-104, 2014.

GRAMZA-MICHALOWSKA, A.; KMIĘCIK, D. **Functional Aspects of Antioxidants in Traditional Food**, 2016.

GRASSO, S.; OMOARUKHE, E.; WEN, X.; PAPOUTSIS, K.; METHVEN, L. Quality of muffins enriched with upcycled defatted sunflower seed flour. **LWT - Food Science and Technology**, v.119, 2020.

GRASSO, S.; OMOARUKHE, E.; WEN, X.; PAPOUTSIS, K.; METHVEN, L. The use of upcycled defatted sunflower seed flour as a functional ingredient in biscuits. **Foods**, v.8, 2019.

HAJHA, H. N.; BOUSSETA, N.; LOUKA, N.; MAROUN, R. G.; VORABIEV, E. A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. **Food Research International**, v. 65, p. 462-468, 2014.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 163–169, 2007.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4501-4523, 2002.

HUA, Y.; HUANG, Y.; QIU, A.; LIU, X. Properties of soy protein isolate prepared from aqueous alcohol washed soy flakes. **Food Research International**. v. 38, p. 273-279, 2005.

HUANG, G. Q.; WANG, H.O.; WANG, F. W.; DU, Y. L.; XIAO, J. X. Maillard reaction in protein – polysaccharide coacervated microcapsules and its effects on microcapsule properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 155, p. 1194-1201, 2019.

IJAROTIMI, O. S.; MALOMO, S. A.; FAGBEMI, T. N.; OSUNDAHUNSI, O. F.; ALUKO, R. E. Structural and functional properties of *Buchholzia coriacea* seed flour and protein concentrate at different pH and protein concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 275-288, 2018.

INOUYE, K. et al. Effects of thermal treatment on the coagulation of soy proteins induced by subtilisin Carlsberg. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 717–723, 2009.

ISHAK, N. H.; SARBON, N. A Review of Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides Deriving from Wastes Generated by Fish Processing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, p. 2-16, 2018.

- JIN, D.; LIU, X. L.; ZHENG, X. Q.; WANG, X. J.; HE, J. F. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. **Food Chemistry**, v.204, p.427-436, 2016.
- KANNAN, A.; HETTIARACHCHY, N. S.; MAHEDEVAN, M. Peptides derived from rice bran protect cells from obesity and Alzheimer's disease. **International Journal of Biomedical Research**, v. 3, n. 3, p. 131–135, 2012.
- KARAMI, Z.; AKBARI-ADERGANI, B. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p.535-547, 2019.
- KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; SHAHIDI, F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1317-1327, 2007.
- KUIAVSKI, M. P.; BEZERRA, J. R. M. V.; TEIXEIRA, A. M.; RIGO, M. Preparation of breads with the addition of malt bagasse flour. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, 2020.
- LAPSONGPHON, N.; YONGSAWATDIGUL, J. Production and purification of antioxidant peptides from a mungbean meal hydrolysate by *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase. **Food Chemistry**, v. 141, p. 992-999, 2013.
- LIU, J.; GUAN, X.; ZHU, D.; SUN, J. Optimization of the enzymatic pretreatment in oat bran protein extraction by particle swarm optimization algorithms for response surface modeling. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1913-1918, 2008.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-27, 1951.
- LYNCH, K.; STEFFEN, E.; ARENDT, E. Brewers' spent grain: A review with an emphasis on food and health. **Journal of the Institute of Brewing**, v.122, p.553-568, 2016.
- MAKRI, E. A.; DOXASTAKIS, G. I. Emulsifying and foaming properties of *Phaseolus vulgaris* and *coccineus* proteins. **Food Chemistry**, v. 98, p. 558-568, 2006.
- MARTINS, V. G. **Obtenção de um hidrogel proveniente de proteínas da corvina (Micropogonias furnieri) e solubilização das proteínas fibrosas residuais**. Tese de doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos, FURG, Rio Grande, 2009.

- MASTROENI, M.; GERN, R. M. M. **Bioquímica prática adaptada**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2008.
- MAY, N.; GUENTHER, E. Shared benefit by material flow cost accounting in the food supply chain – The case of berry pomace as upcycled by-product of a black currant juice production, **Journal of Cleaner Production**, v. 245, 2020.
- MAYER, E. T.; FUKU, G.; NÖRNBERG, J. L.; MINELLA, E. Caracterização nutricional de grãos integrais e descascados de cultivares de cevada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1635-1640, 2007.
- MODESTI, C. F. **Obtenção e caracterização de concentrado proteico de folhas de mandioca submetido a diferentes tratamentos**. Dissertação de mestrado. Lavras: UFLA, 2006.
- MÖLLER, N. P.; SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 171–182, 2008.
- MORADO, R. Larousse da cerveja. São Paulo: **Larousse do Brasil**, p. 357, 2009.
- MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 447-456, 2006.
- MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 1-14, 2006.
- MUTILANGI, W. A. M.; PANYAM, D.; KILARA, A. Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. **Journal of Food Science**, v.61, p.270-275, 1996.
- NOCENTE, F.; TADDEI, F.; GALASSI, E.; GAZZA, L. Upcycling of brewers' spent grain by production of dry pasta with higher nutritional potential, **LWT - Food Science and Technology**, v. 114, 2019.
- NOLSØE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, p. 1–27, 2009.
- OLIVEIRA, C.F.; COLETTI, D.; CORREA, A.P.F.; DAROIT, D. J.; TONIOLO, R.; OLIVERA, F. C.; BRANDELLI, A. Antioxidant activity and inhibition of meat lipid

oxidation by soy protein hydrolysates produced with a microbial protease.

**International Food Research Journal**, v. 21, p. 775-781, 2014.

ONU, United nations, department of economic and social affairs The United Nations, Population Division, Population Estimates and Projections Section, 2012.

PHILANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1306-1314, 2006.

PHONGTHAI, S.; RAWDKUEN, S. Purification and characterization of antioxidant peptides from rice bran protein hydrolysate stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. **Cereal Chemistry**, v. 97, p. 316–325, 2019.

PIRES, E.; BRANYIK, T. **Biochemistry of beer fermentation**. Springer International Publishing, 2015.

POLASTRI, P.; LUIS, A.; PAULA, A.; VARESCHINI, D.; GIMENES, M. **Potencial da produção de biogás por meio da digestão anaeróbia do bagaço de malte**, 2019.

PRIPP, A. H.; ISAKSSON, T.; STEPANIAK, L.; SORHAUG, T.; ARDÖ, Y. Quantitative structure activity relationship modelling of peptides and proteins as a tool in food science. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 484–494, 2005.

PUCHALSKA, P.; MARINA, M. L.; GARCÍA, M. C. Isolation and identification of antioxidant peptides from commercial soybean-based infant formulas. **Food Chemistry**, v. 148, p. 147–154, 2014.

QIN, F.; JOHANSEN, A. Z.; MUSSATTO, S. I. Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer's spent grains. **Industrial Crops & Products**, v. 125, p. 443-453, 2018.

QUIRÓS, A.; CHICHÓN, R.; RECIO, I.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1734–1739, 2007.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Research International**, v. 38, n. 2, p. 175-182, 2005.

RAJAPASKE, N.; MENDI, E.; JUNG, W. K.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel and its antioxidant properties. **Food Research International**, v. 38, p. 175-182, 2005.

- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.
- RIGO, M.; BEZERRA, J. R. M. V.; RODRIGUES, D. D.; TEIXEIRA, A. M. Avaliação físico-química e sensorial de biscoitos tipo cookie adicionados de farinha de bagaço de malte como fonte de fibra. **Ambiência**, v.13, n. 1, 2017.
- ROBERTSON, J. A.; l'ANSON, K. J. A.; TREIMO, J.; FAULDS, C. B.; BROCKLEHURST, T. F.; EIJSINK, V. G. H.; WALDRON, K. W. Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 890-896, 2010.
- ROTH, M.; JEKLE, M.; BECKER, T. Opportunities for upcycling cereal byproducts with special focus on Distiller's grains. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 282-293, 2019.
- SALEM, R. B. S.; BKHAIRIA, I.; ABDELHEDI, O.; NESRI, M. *Octopus vulgaris* protein hydrolysates - characterization, antioxidant and functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1442-1454, 2017.
- SCHWENZFEIER, A.; LECH, F.; WIERENGA, P. A.; EPPINK, M. H. M.; GRUPPEN, H. Foam properties of algae soluble protein isolate: Effect of pH and ionic strength. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 111–117, 2013.
- SEGURA-CAMPOS, M.; SALAZAR-VEJA, I.; GUERRERO, L.; BETANCUR, D. Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 723-731, 2013.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações e modificações**. São Paulo: Editora-Livraria Varela, 1996.
- SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista de Nutrição**, v. 24, p. 895-904, 2011.
- SMACCHI, E.; GOBBETTI, M. Bioactive peptides in dairy products: Synthesis and interaction proteolytic enzymes. **Food Microbiology**, v. 17, p. 129-141, 2000.
- SOARES, N. Tempo de mudança. **Engarrafador Moderno**, São Caetano do Sul, n.205, p. 14-22, 2011.

SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R. Comparative study of foaming properties of whey and isolate soy bean proteins. **Food Research International**, v. 35, p. 721-729, 2002.

SOUZA, S. S. P.; ALMEIDA, P. L. P.; SANTOS, M. F. S. **Gestão ambiental: um estudo sobre o gerenciamento dos resíduos sólidos de uma indústria de embalagens flexíveis em Campina Grande – PB**. Campina Grande, 2009.

STATISTA. Bierausstoß weltweit in den Jahren 1995 bis 2019 (in Milliarden Hektoliter) Barth-Haas Group. 2019. Disponível em: <<https://de.statista.com/statistik/daten/studie/166861/umfrage/bierausstoss-entwicklung-weltweit-seit-1998/>>. Acesso em: 05 de agosto de 2021.

TANG, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; HORAX, R.; ESWARANANDAM, S. Physicochemical properties and functionality of rice bran protein hydrolyzate prepared from heat-stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 152–157, 2003.

THEANDER, O.; AMAN, P. Anatomical and Chemical Characteristics. Straws and Other Fibrous. **Byproducts as Feed**, p. 45-78, 1984.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing and potencial health benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 11-24, 2012.

VIEIRA, E. F.; SILVA, D. D.; CARMO, H.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Protective ability against oxidative stress of brewers' spent grain protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v.228, p.602-609, 2017.

VILLAMIL, O; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 224, p. 160-171, 2017.

VIOTTI, E. **O mundo da cerveja: A Cerveja Lager**. São Paulo: Folha de São Paulo, 2012.

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M.; BURSK, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice brain protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 411-416, 1999.

WANI, I. A.; SOGI, D. S.; SHIVHARE, U. S.; GILL, B. S. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean protein isolates. **Food Research International**, v.76, p. 11-18, 2015.

WU, H. C.; CHEN, H. M., SHIAU, C. Y. Free amino acid and peptide as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*).

**Food Research International**, v.36, p. 949-957, 2003.

YADA, R Y. **Proteins in Food processing**. Washington: Cambridge England, 2004.

ZHANG, H. J.; WANG, J.; ZHANG, B. H.; ZHANG, H. Antioxidant activities of the fractionated protein hydrolysates from heat stable defatted rice bran. **International**

**Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 1330–1336, 2014.

ZHOU, K.; SUN, S.; CANNING, C. Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration.

**Food Chemistry**. v. 135, p. 1192-1197, 2012.