



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO DO BAGAÇO DE MALTE
ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

MARIANE DE PAULA

Prof. Dr. CARLOS PRENTICE HERNÁNDEZ

Orientador (*In memorian*)

Prof. Dra. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS

Orientadora

Dra. JULIANA MACHADO LATORRES

Co-orientadora

Rio Grande, RS

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO DE CONCENTRADO PROTEICO DO BAGAÇO DE MALTE
ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

MARIANE DE PAULA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Engenharia e Ciência
dos Alimentos

Prof. Dr. CARLOS PRENTICE HERNÁNDEZ
Orientador (*In memorian*)

Prof. Dra. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS
Orientadora

Dra. JULIANA MACHADO LATORRES
Co-orientadora

Rio Grande

2021

Ficha Catalográfica

P324o Paula, Mariane de.

Obtenção de concentrado proteico do bagaço de malte através da extração assistida por ultrassom / Mariane de Paula. – 2021.
76 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2021.

Orientador: Dr. Carlos Prentice Hernández. (*In memoriam*)

Orientadora: Dra. Vilásia Guimarães Martins.

Coorientadora: Dra. Juliana Machado Latorres.

1. Sonicação 2. Resíduo Cervejeiro 3. Concentrado Proteico
4. Propriedades Funcionais I. Hernández, Carlos Prentice II. Martins, Vilásia Guimarães III. Latorres, Juliana Machado IV. Título.

CDU 663.4

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Mariane De Paula, com orientação da Prof.^a. Dr.^o. Vilásia Guimarães Martins, aprovada em 11 de outubro de 2021, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



Prof.^a Dr.^a Vilásia Guimarães Martins - FURG



Prof.^a Dr.^a Andrea Menezes Lopes - FURG



Dr.^a. Sibeles Santos Fernandes – FURG



Prof.^a Dr.^a Giovana Domenechini Mercali - UFRGS

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo amor e apoio em todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter me abençoado e guiado todos os caminhos por onde passei, e sempre ter me dado forças para seguir em frente.

Agradeço a minha família, principalmente aos meus pais, Marcos e Doraci, por terem me apoiado em todas as minhas decisões, sempre me amparando e nunca me deixando faltar nada. Tudo que sou e conquistei até hoje foram graças a vocês, eu os amo de todo meu coração.

Ao meu amor e companheiro de vida, Leonardo, obrigado por ter me acompanhado nessa trajetória, pela força e apoio de sempre, mesmo quando eu achava que não seria possível.

Você foi essencial para chegarmos até aqui. Te amo!

Ao meu eterno orientador, Prof. Dr. Carlos Prentice Hernández, que infelizmente não está aqui para acompanhar a finalização deste trabalho que tanto idealizamos, mas com a certeza que do céu comemora junto comigo. Gratidão pelo período em que tive a honra de ser tua orientada!

Obrigada a minha orientadora Prof. Dra. Vilásia Guimarães Martins, que foi o suporte necessário para a concretização deste trabalho, por toda ajuda técnica e também amizade neste período.

A minha co-orientadora Dra. Juliana Machado Latorres. Ju, muito obrigada pela ajuda de sempre. Tua amizade e apoio foi essencial para que eu chegasse até aqui.

Aos meus amigos, presentes que o Mestrado me deu, Luan, Gisele, Pedro, José, Héctor, Corina, Wesclen, Camila, obrigada por todos os momentos que passamos juntos, por todas risadas, comilanças, desabafos... vocês foram incríveis e fundamentais neste período!

A todos os colegas do LTA, obrigada pela ajuda de sempre. O LTA ficará sempre no meu coração.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de estudos, e ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O bagaço de malte (BM) é um importante subproduto da indústria cervejeira, este é gerado em grandes quantidades ao longo do ano, representando aproximadamente 85% do total de subprodutos obtidos. Devido a sua composição apresentar elevados teores de fibras e proteínas, associado ainda ao seu baixo custo, ampla disponibilidade ao longo do ano e valiosa composição química, o BM torna-se um interessante produto para a aplicação na indústria de alimentos. As proteínas são indispensáveis à saúde humana, e podem ser extraídas por diferentes métodos. Nesse contexto, o ultrassom (US) vêm sendo empregado para a extração de proteínas de matrizes vegetais, com intuito de facilitar a extração através da cavitação gerada na parede celular da matriz pelas ondas ultrassônicas. Desse modo, o objetivo deste estudo foi obter um concentrado proteico do BM através da extração assistida por US seguido com o método de precipitação no ponto isoelétrico, e caracterizar o concentrado quanto à sua composição química, propriedades funcionais, digestibilidade proteica e estabilidade térmica. O ponto isoelétrico das proteínas do BM foi determinado em pH 3. Através de um planejamento experimental DCC 2³, os parâmetros da sonda ultrassônica como pré-tratamento do BM, para maximizar a extração de proteínas, foram padronizados em tempo de extração de 10 min, potência do equipamento de 550 W e razão sólido:solvente (p v^{-1}) em 1:45. Por meio das imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura do BM pós US, observou-se o rompimento de sua estrutura fibrosa. Após a extração assistida por US, as proteínas foram concentradas e liofilizadas. O concentrado proteico obtido apresentou um teor de $48,3 \pm 0,8\%$ de proteínas, com rendimento em massa de 30,5% e rendimento da extração de 62,7%, sendo que a maior fração proteica do concentrado foram as gluteninas. A solubilidade proteica alcançou 90,1 e 86,2% em pH 2 e 10, respectivamente. O índice de emulsificação em pH 10,0 foi de $72,9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. A capacidade de retenção de água ($8,89 \pm 0,27 \text{ g g}^{-1}$) foi maior que a capacidade de retenção de óleo ($6,56 \pm 0,76 \text{ g g}^{-1}$), indicando que o ultrassom causou mudanças conformacionais que pode ter exposto grupos hidrofílicos da proteína. A capacidade de formação de espuma foi de $42,5 \pm 2,3\%$ e a estabilidade da espuma de $98,4 \pm 1,6\%$. A digestibilidade do concentrado proteico apresentou $86,6 \pm 2,3\%$, indicando ser uma ótima fonte de proteína vegetal para alimentação humana, visto que este grupo de proteínas apresentam baixa digestibilidade quando comparada às proteínas lácteas, por exemplo. A entalpia de desnaturação de $49,63 \text{ J g}^{-1}$, indica uma boa estabilidade térmica. O pré-tratamento do BM com ultrassom pode melhorar a extração proteica, diminuindo o tempo de extração e o uso de reagentes. Além disso, o concentrado proteico apresentou boas propriedades funcionais, facilitando a introdução e o uso deste tipo de proteína na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Sonicação. Resíduo cervejeiro. Concentrado proteico. Propriedades funcionais.

ABSTRACT

OBTAINING PROTEIN CONCENTRATE FROM MALT BAGASSE THROUGH ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION

Malt bagasse (BM) is an important by-product of the brewing industry, it is generated in large quantities throughout the year, representing approximately 85% of the total by-products obtained. Due to its composition with high fiber and protein contents, associated with its low cost, wide availability throughout the year and valuable chemical composition, BM becomes an interesting product for application in the food industry. Proteins are essential for human health and can be extracted by different methods. In this context, ultrasound (US) has been used for the extraction of proteins from plant matrices, to facilitate extraction through the cavitation generated in the cell wall of the matrix by ultrasonic waves. Thus, the aim of this study was to obtain a protein concentrate from BM through US-assisted extraction followed with the precipitation method at the isoelectric point, and to characterize the concentrate as to its chemical composition, functional properties, protein digestibility and thermal stability. The isoelectric point of the BM proteins was determined at pH 3. Through an experimental design DCC 2³, the parameters of the ultrasonic probe as a pre-treatment of the BM, to maximize the protein extraction, were standardized in an extraction time of 10 min, equipment power of 550 W and solid:solvent ratio (p v⁻¹) at 1:45. Through the images obtained by scanning electron microscopy of the BM after US, the rupture of its fibrous structure was observed. After US- assisted extraction, proteins were concentrated and lyophilized. The protein concentrate obtained had a protein content of $48.3 \pm 0.8\%$, with a mass yield of 30,5% and extraction yield of 62,7%, with the largest protein fraction of the concentrate being glutenins. Protein solubility reached 90.1 and 86.2% at pH 2 and 10, respectively. The emulsification index at pH 10.0 was $72.9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. The water holding capacity ($8,89 \pm 0,27 \text{ g g}^{-1}$) was greater than the oil holding capacity ($6,56 \pm 0,76 \text{ g g}^{-1}$), indicating that the ultrasound caused conformational changes that might have exposed hydrophilic groups of the protein. The foaming ability was $42,5 \pm 2,3\%$ and the foam stability was $98,4 \pm 1,6\%$. The digestibility of the protein concentrate showed $86,6 \pm 2,3\%$, indicating that it is an excellent source of vegetable protein for human consumption, as this group of proteins has low digestibility when compared to dairy proteins, for example. The denaturation enthalpy of $49,63 \text{ J g}^{-1}$ indicates good thermal stability. Pre-treatment of BM with ultrasound can improve protein extraction, decreasing extraction time and the use of reagents. In addition, the protein concentrate showed good functional properties, facilitating the introduction and use of this type of protein in the food industry.

Keywords: Sonication. Beer residue. Protein concentrate. Functional properties.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz do delineamento experimental, com valores codificados e reais de estudo (tempo, sólido:solvente [S:S] e potência) na obtenção de proteínas do BM.....	39
Tabela 2 – Composição proximal do BM.....	47
Tabela 3 – Resultados do delineamento experimental DCC 2 ³	49
Tabela 4 – Coeficientes de regressão (CR), erro padrão (EP), valores de p e t obtidos no DCC 2 ³ para o teor de proteínas.	50
Tabela 5 – ANOVA fatorial do DCC para o teor de proteína.	50
Tabela 6 – Composição proximal do concentrado proteico do BM e rendimento do processo de extração.....	55
Tabela 7 – Frações proteicas encontradas no concentrado proteico do BM.....	56
Tabela 8 – Propriedades emulsificantes do concentrado proteico do BM.	59
Tabela 9 – Propriedades térmicas do concentrado proteico do BM.	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo do processo cervejeiro.....	26
Figura 2 – Organograma para obtenção e avaliação das proteínas do BM	37
Figura 3 – Fluxograma do processo de obtenção do concentrado proteico do BM.	41
Figura 4 – Determinação do ponto isoelétrico das proteínas do BM em função da solubilidade.	48
Figura 5 – Curva de contorno para extração de proteínas em função do tempo de extração e potência do ultrassom.	51
Figura 6 – Curva de contorno para extração de proteínas em função do tempo de extração e razão sólido:solvente.	52
Figura 7 – Curva de contorno para extração de proteínas em função da potência do ultrassom e razão sólido:solvente.....	52
Figura 8 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do BM antes e após tratamento do ultrassom.....	54
Figura 9 – Solubilidade proteica do concentrado proteico do BM.....	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

BM – Bagaço de malte

CFE – Capacidade de formação de espuma

CRA – Capacidade de retenção de água

CRO – Capacidade de retenção de óleo

DCC – Delineamento composto central

DSC – *Differential Scanning Calorimetry*

EE – Estabilidade da espuma

EIE – Estabilidade do índice de emulsificação

IE – Índice de emulsificação

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

pH – Potencial hidrogeniônico

pI – Ponto isoelétrico

US - Ultrassom

ΔH – variação de entalpia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 BAGAÇO DE MALTE	25
3.1.1 Composição química do BM	26
3.2 MÉTODOS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS VEGETAIS	27
3.2.1 Métodos químicos.....	28
3.2.2 Extração assistida por enzimas.....	29
3.2.3 Métodos físicos	30
3.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS VEGETAIS ASSISTIDA POR ULTRASSOM	31
3.4 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS CONCENTRADOS PROTEICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAL.....	37
4.2 MÉTODOS	37
4.2.1 Desenvolvimento do trabalho.....	37
4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA	38
4.4 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DAS PROTEÍNAS DO BM	38
4.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³	38
4.6 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	39
4.6.1 Microestrutura do BM antes e pós tratamento com ultrassom.....	39
4.7 OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DO BM.....	40
4.7.1 Rendimento do processo de extração	40
4.8 CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DO BM	41
4.8.1 Caracterização química do concentrado proteico	41
4.8.2 Fracionamento das proteínas.....	42
4.8.3 Estudo das propriedades funcionais.....	42
4.8.3.1 Solubilidade proteica	42
4.8.3.2 Propriedades de espuma.....	42
4.8.3.3 Propriedades emulsificantes.....	43
4.8.3.4 Capacidade de absorção de água e óleo	43
4.8.4 Digestibilidade proteica	44
4.8.5 Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	44
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DO BM	47
5.2 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DAS PROTEÍNAS DO BM... ..	47
5.3 MAXIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO BM ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	49
5.4 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE MORFOLÓGICA DO BM ANTES E PÓS TRATAMENTO COM ULTRASSOM	53
5.5 COMPOSIÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO OBTIDO DO BM.....	54
5.5.1 Fracionamento das proteínas do BM	56

5.6 ESTUDO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO CONCENTRADO PROTEICO.....	56
5.6.1 Solubilidade proteica.....	56
5.6.2 Propriedades de espuma.....	57
5.6.3 Propriedades emulsificantes	58
5.6.4 Capacidade de absorção de óleo e água.....	59
5.7 DIGESTIBILIDADE PROTEICA.....	60
5.8 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	61
6 CONCLUSÃO	63
7 RESÍDUOS GERADOS.....	65
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são indispensáveis na dieta humana, e particularmente, as de origem animal constituem uma importante fonte nutricional em muitas partes do mundo. A carne e os produtos à base de carne são considerados produtos alimentícios com alto valor nutricional, visto que são uma excelente fonte de proteínas, minerais, vitaminas e aminoácidos essenciais. Entretanto, nos últimos anos o mercado global de proteínas vegetais tem aumentado, e uma crescente conscientização da população por alimentos saudáveis e sustentáveis está levando a um aumento no interesse em alternativas à carne animal no mundo inteiro (BOHRER, 2019).

Evidências sugerem que os métodos atuais de produção e processamento de proteínas animais não são sustentáveis, especialmente quando se é esperado um aumento populacional de 33% até 2050, e com isso uma demanda ainda maior de alimentos (REES CLAYTON et al., 2019). Em um estudo realizado pelo Instituto de Recursos Mundiais, estima-se que será necessário aumentar em 70% a produção de alimentos para atender a demanda global em 2050, em comparação a 2006. Ainda de acordo com os autores, preencher essa lacuna alimentar exigirá aumento da produtividade e mudança no padrão alimentar, substituindo parte do consumo de proteínas de origem animal por outras fontes de proteína, visto que a produção de proteínas animais envolve substancialmente mais recursos e gera mais impactos ambientais do que as vegetais (REES CLAYTON et al., 2019). Dessa forma, torna-se pertinente a pesquisa de novas fontes proteicas para o desenvolvimento de novos produtos. Além disso, as proteínas vegetais apresentam alta qualidade nutricional, baixa alergenicidade e custos de obtenção industrialmente acessíveis (OMURA et al., 2021).

Uma alternativa aos recursos tradicionais é recuperar proteínas de resíduos agrícolas e subprodutos derivados do processamento de alimentos. Nesse sentido, a recuperação e reutilização dos subprodutos da indústria cervejeira para obtenção de compostos funcionais e desenvolvimento de novos produtos, poderiam direcionar pesquisas de grande interesse, principalmente relacionados ao meio ambiente e gestão de resíduos. Os resíduos de cervejaria são úmidos, volumosos, possuem boas propriedades nutricionais e são usualmente utilizados na produção de ração animal e fertilizantes, ou descartados no meio ambiente (QIN et al., 2018; SARAIVA et al., 2019).

A indústria cervejeira produz milhões de toneladas de resíduos, como o bagaço de malte, extrato de levedura e *trub*, e o acúmulo dessa biomassa no meio ambiente pode levar à degradação ambiental e à perda de material valioso que poderia ser explorado como alimento, combustível e um variedade de aditivos. O bagaço de malte (BM) é um resíduo gerado na

industrialização da cerveja e possui elevado teor nutricional, como proteínas, fibras, vitaminas, minerais e carboidratos em geral (SARAIVA et al., 2019). De acordo com Geron et al. (2008), o teor de proteínas pode variar de 17 a 32 % em base seca. Estudos foram realizados utilizando este resíduo para obter proteínas por diferentes métodos, através de precipitação no ponto isoelétrico (ARAUZO et al., 2019), hidrólise enzimática (KOTLAR; PONCE; ROURA, 2013), separação por fracionamento (HE et al., 2019), ultrafiltração (TANG et al., 2009) e método assistido por ultrassom (TANG et al., 2010).

No entanto, é um desafio extrair proteínas do BM com alto rendimento devido ao fato de que componentes como a lignina e a celulose formam uma rede complexa no material, aprisionando a proteína no interior do grão (LI et al., 2020). Assim, tratamentos físicos (IBBETT et al., 2019), químicos (CONNOLLY; PIGGOTT; FITZGERALD, 2013) e enzimáticos (ROMMI et al., 2018) foram aplicados para recuperar proteínas do BM. Dentre estes, o método enzimático é ambientalmente atraente mas apresenta um alto custo de produção. A extração com álcalis associada a precipitação ácida é um método conveniente na extração de proteínas do BM, mas possui um longo tempo de extração (LI et al., 2020). Dessa forma, métodos físicos combinados com métodos químicos ou enzimáticos são geralmente adotados para superar as desvantagens mencionadas acima.

A extração assistida por ultrassom (US) pode ser um método eficiente, simples e econômico na extração de proteínas do BM. O US gera fluxo acústico dentro de soluções aquosas, resultando em um fenômeno conhecido como cavitação, a rápida formação e colapso de bolhas de gás, podem produzir o cisalhamento e a energia mecânica e, finalmente, perturbar a parede e a membrana celular, resultando em rendimentos maiores de extração. Estudos anteriores relataram o aumento do rendimento e melhora de propriedades físico-químicas de proteínas (FLORES-JIMÉNEZ et al., 2019; TÉLLEZ-MORALES; HERNÁNDEZ-SANTO; RODRÍGUEZ-MIRANDA, 2019).

Nesse contexto, o presente estudo busca obter um concentrado proteico do BM através da extração assistida por US, avaliar a microestrutura do BM antes e após o tratamento com US, bem como estudar as propriedades funcionais e térmicas das proteínas, seguindo uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), da Escola de Química e Alimentos (EQA), da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), para a valoração de recursos agropecuários de forma sustentável.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter concentrado proteico do BM através da extração assistida por US.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a melhor condição de extração de proteínas assistida por US através de um planejamento experimental DCC 2³;
- Investigar os efeitos da sonicação através da avaliação da superfície morfológica do BM antes e pós-tratamento com ultrassom;
- Concentrar o extrato proteico através da melhor condição estudada anteriormente;
- Caracterizar e avaliar as proteínas do concentrado do BM quanto às suas propriedades funcionais e térmicas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BAGAÇO DE MALTE

A produção mundial de cerveja teve um crescente aumento nos últimos anos, principalmente na China, Estados Unidos e Brasil, passando de 130 bilhões de litros em 1998 para 194 bilhões de litros produzidos em 2018, e com isso, há um aumento na geração de resíduos derivados desse processo. No Brasil, a produção de cerveja tem apresentado uma tendência crescente nos últimos 30 anos, e em 2016 atingiu 140 milhões de hectolitros (mi hL), colocando o Brasil em terceiro lugar no ranking mundial, atrás apenas da líder China (460 mi hl) e do EUA (221 mi hL) e à frente da Alemanha (95 mi hL) e da Rússia (78 mi hL) (CONWAY, 2021).

O bagaço de malte (BM) é um subproduto da indústria cervejeira e um dos mais abundantes produtos residuais gerados no processo (GUIDO; MOREIRA, 2017). Com as tecnologias utilizadas atualmente, cerca de 15 a 20 kg de BM são gerados para cada 100 L de cerveja produzida, representando 85% do total de resíduos da indústria cervejeira, o que resulta em uma produção anual de mais de 30 milhões de toneladas de BM em todo o mundo (GUPTA; ABU-GHANNAM; GALLAGHAR, 2010; SARAIVA et al., 2019b).

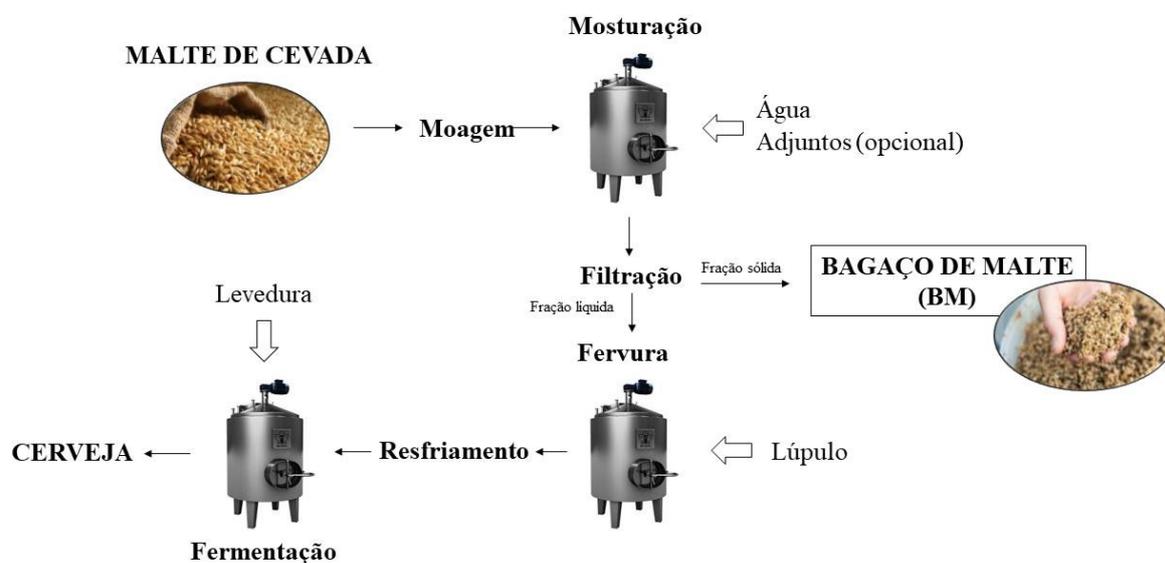
Resumidamente, o processo cervejeiro começa com a produção do mosto, onde o malte de cevada é misturado com água, e a temperatura é lentamente elevada de 37 para 78 °C, para converter o amido dos grãos de malte em açúcares fermentáveis e não fermentáveis. As proteínas do malte também são parcialmente hidrolisadas neste processo em polipeptídios e aminoácidos. Ao final dessa etapa, a parte insolúvel do mosto é filtrada e é composta por BM, e a parte solúvel é levada para o tanque de fermentação, como ilustra a Figura 1 (FALLIS, 2013; MUSSATTO, 2014). Em alguns casos, parte do malte de cevada é substituída por adjuntos que podem ser cereais não maltados como milho, arroz, trigo, aveia, centeio ou sorgo, a fim de produzir cervejas de diferentes qualidades (FALLIS, 2013; MATHIAS; MELLO e SÉRVULO, 2014).

Apesar de ser gerado em grandes quantidades e estar disponível em abundância, o BM é pouco explorado na indústria e muito utilizado na alimentação animal, produção de fertilizantes ou são descartados no meio ambiente. Um desafio para sua reutilização é o seu alto teor de umidade, que acaba dificultando o armazenamento e o transporte, além de estar sujeito à rápida degradação microbológica (IKRAM et al., 2017).

O BM é considerado um material lignocelulósico, rico em celulose, hemicelulose e lignina, e seus principais constituintes incluem altas quantidades de fibra (30-50 % p/p) e

proteína (19-30 % p/p), o que torna este material atraente para recuperação desses compostos para aplicação em alimentos (LYNCH; STEFFEN; ARENDT, 2016; MUSSATTO, 2014). Além disso, outros componentes do BM estão ganhando cada vez mais atenção por serem conhecidos como promotores de saúde, como compostos fenólicos, proteínas hidrolisadas e arabinoxilanos (STEINER; PROCOPIO; BECKER, 2015).

Figura 1 – Esquema ilustrativo do processo cervejeiro



Várias pesquisas avaliaram a sua utilização em alimentos para humanos, como na produção de biscoitos (ÖZTÜRK et al., 2002), massas assadas (KTENIOUDAK et al., 2013), pães ricos em fibras (STOJCESKA; AINSWORTH, 2008), massa de trigo suplementada com BM e bagaço de maçã (KTENIOUDAKI; O'SHEA; GALLAGHER, 2013), e hambúrguer bovino enriquecido com BM (SARAIVA et al., 2019).

3.1.1 Composição química do BM

O BM é composto principalmente de cascas de grãos de cevada juntamente com partes do pericarpo e do tegumento desses grãos, que por sua vez são ricas em celulose, polissacarídeos não celulósicos e lignina. A casca também contém quantidades consideráveis de sílica e compostos poli fenólicos do grão de cevada (MACLEOD, 1967; MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006). O BM possui em sua composição química, açúcares, proteínas

e minerais, podendo sofrer variações significativas devido a uma variedade de fatores, como o tipo de cevada utilizada no processo, as condições de cultivo do grão e as condições utilizadas na mosturação, além da quantidade e tipo de coadjuvantes utilizados no processo (MUSSATTO, 2014; SANTOS et al., 2003).

Apesar das variações que podem ocorrer nos componentes do BM, ele é composto por 15 a 30 % de proteína e cerca de 70 % de fibra, que pode ser dividido em três frações: celulose (entre 12 % e 25 %), hemicelulose (20 % a 25 %) e lignina (aproximadamente 12 % a 28 %) (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006; MATHIAS; MELLO; SÉRVULO, 2014). Além disso, pode ter entre 3,9 % e 10 % de lipídios, 2,5 % a 4,5 % de cinzas, vitaminas, aminoácidos e compostos fenólicos (HEREDIA-SANDOVAL et al., 2019).

As proteínas representam um constituinte importante neste material, as mais abundantes encontradas no BM são hordeínas, gluteninas, globulinas e albuminas (CELUS; BRIJS; DELCOUR, 2006). Para que um subproduto seja considerado uma fonte proteica de qualidade, ele deve ter uma composição balanceada de aminoácidos essenciais. Os aminoácidos essenciais representam aproximadamente 30% do conteúdo total de proteínas, com a leucina sendo a mais abundante (6,1–8 %), seguida por lisina (4,4–14,3 %), fenilalanina (4,3-5,8 %), isoleucina (3,0–4,4 %), treonina (0,7–3,8 %) e triptofano. Os aminoácidos não essenciais representam cerca de 70 % da proteína total de BM (IBBETT et al., 2019; QIN; JOHANSEN; MUSSATTO, 2018; WATERS et al., 2012). O conteúdo de lisina no BM é significativo, uma vez que os cereais são regularmente deficientes neste aminoácido essencial (BLANDINO et al., 2003).

Dependendo das matérias-primas utilizadas no processo (grãos não maltados, milho, trigo, cevada, arroz), a composição da proteína pode variar significativamente, modificando assim o perfil de aminoácidos no BM (LYNCH; STEFFEN; ARENDT, 2016). Além da boa composição de aminoácidos, as suas proteínas têm potencial para serem utilizadas como fonte alimentar de proteína humana e animal, se puderem ser extraídas de forma a minimizar o risco de alteração ou deterioração de suas propriedades tecno-funcionais (NIEMI et al., 2013).

3.2 MÉTODOS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS VEGETAIS

Dentre as técnicas de extração de proteínas vegetais se encontram as convencionais (à base de água, sal, solvente, detergente, álcali) e as não convencionais (enzimas, micro-ondas, alta pressão, sonicação, entre outros). Os métodos convencionais referem-se às técnicas comumente usadas que podem às vezes resultar em rendimentos de extração mais baixos devido à degradação da proteína. Este declínio no rendimento de proteína é conduzido por uma série

de fatores, incluindo tempo de extração, solventes, pH e temperatura (POJI; MI; TIWARI, 2018).

Portanto, os pesquisadores estão hoje mais focados em tecnologias verdes não térmicas para aumentar a eficiência de extração e reduzir a degradação de proteínas durante a extração. Esses métodos não apresentam qualquer efeito prejudicial ao meio ambiente e as proteínas obtidas também são seguras para consumo devido ao uso mínimo de produtos químicos e solventes nocivos. Explorar técnicas inovadoras de extração de proteínas pode aumentar o rendimento proteico e as propriedades nutricionais e tecno-funcionais. Estudos sugerem que o uso simultâneo de métodos convencionais e não convencionais de extração de proteínas oferece rendimentos mais elevados (GÖRGÜÇ; BIRCAN; YILMAZ, 2019; KUMAR et al., 2021).

3.2.1 Métodos químicos

Os métodos químicos são classificados com base em diferentes solventes de extração usados como água, álcali, solventes orgânicos e ácidos. Métodos químicos também são usados em combinação com outros métodos para melhorar a recuperação de proteínas. Geralmente, a extração é realizada em três etapas, desengorduramento da amostra, extração e precipitação da proteína. No desengorduramento, solventes como éter de petróleo, n-hexano e n-pentano são usados para remover os compostos que interferem na extração de proteínas. Na sequência, as proteínas são extraídas usando sais (NaCl), álcalis (NaOH), detergentes iônicos (SDS) e detergentes não iônicos (NP-40 e Triton X100) em extração aquosa à base de água quente ou fria. Álcoois (etanol, metanol), tampões/desnaturantes fortes (por exemplo ureia ou Tris-HCl, fenol) são usados na extração à base de solvente orgânico. Uma série de técnicas modernas como micro-ondas, ultrassom e enzimas podem auxiliar ainda mais na melhoria da eficiência de extração de proteínas. Por fim, a proteína isolada é concentrada/precipitada por meio de produtos químicos ou solventes como sulfato de amônio, etanol, metanol, acetona, ácido cítrico, ácido tricloroacético, ácido clorídrico e precipitação de ponto isoelétrico (pI). O precipitado contém proteínas que podem ser recuperadas por centrifugação. Além da proteína, um grande número de compostos não proteicos/impurezas também estão presentes no precipitado de proteína (KUMAR et al., 2021; POJI; MI; TIWARI, 2018).

Zhang, Sanders e Bruins (2014) relataram que condições como razão amostra/solvente, concentração de álcali, intervalo de tempo e temperatura podem ser otimizadas para atingir o rendimento máximo de proteína a um baixo custo. Salgado et al. (2012) utilizaram o método de extração alcalina para extrair proteínas do farelo de girassol com as condições otimizadas de 67

g L⁻¹ de relação farelo de girassol para água, tempo de extração de 1 h e pH 9, seguido por uma segunda extração usando precipitação de ponto isoelétrico e alcançou uma recuperação de proteína de 70,4 % com base no peso seco de amostra.

Arauzo et al. (2019) também utilizaram o método de extração alcalina para extrair proteínas do BM, onde os autores solubilizaram o BM com NaOH 0,1 M por 2 h a 40 °C. O sobrenadante rico em proteína foi recolhido e o pH ajustado a 3,0 com ácido tricloroacético 1,0 M, as proteínas precipitadas foram coletadas após centrifugação e então liofilizadas. O teor de proteína encontrado foi de 60,1 %, e os aminoácidos foram analisados. Destes, 35,7 % eram aminoácidos essenciais, destacando-se a leucina (7,78 %) e a fenilalanina (6,55 %). Connolly, Piggott e Fitzgerald (2013) também obtiveram um isolado de proteína do BM (a partir dos processos de cerveja clara e escura) pelo método de extração com álcali combinado com o de precipitação de ponto isoelétrico, onde as proteínas foram precipitadas em pH 3,8. O extrato proteico obtido ao final apresentou um teor de proteína de 46 % para o BM claro e 19,42 % para o BM escuro.

3.2.2 Extração assistida por enzimas

A parede celular rígida de matrizes vegetais é um obstáculo para a extração de proteínas celulares. A extração assistida por enzimas tem por objetivo danificar a parede celular por meio da degradação enzimática dos seus componentes (hemicelulose, celulose e pectina) (CELUS; BRIJS; DELCOUR, 2007). Atividades específicas de pectinases e carboidrases na desintegração da parede celular auxiliam na liberação organizada de proteínas celulares de sementes de leguminosas, sementes oleaginosas e cereais (SLIZYTE et al., 2016). As proteases aumentam o rendimento proteico ao desvincular as proteínas da matriz polissacarídica. A degradação da parede celular facilita a liberação de proteínas celulares. Após a liberação dessas proteínas, as proteases fracionam as proteínas de alta massa molar em porções menores e mais solúveis, proporcionando assim condições de extração favoráveis (KUMAR et al., 2021).

Houde et al. (2018) avaliaram dois tipos de tratamentos enzimáticos na farinha de cevada desengordurada. No primeiro tratamento utilizaram duas enzimas, α -amilase e amiloglucosidase, e no segundo utilizaram três enzimas, a α -amilase, amiloglucosidase e β -1,3,4-glucanase. A abordagem com duas enzimas rendeu um concentrado com 49,0 % de proteínas, enquanto o tratamento com as três enzimas antes da precipitação isoelétrica rendeu 78,3 % de proteínas.

A hidrólise química e enzimática pode ser aplicada para obter proteínas do BM, sendo um substrato valioso para a produção de hidrolisados com boas propriedades funcionais e tecnológicas (QIN; JOHANSEN; MUSSATTO, 2018). Kotlar, Ponce e Roura (2013) obtiveram e avaliaram hidrolisados das proteínas do BM. A hidrólise foi realizada com peptidase extracelular do *Bacillus cereus* sp. Nos hidrolisados obtidos, foram avaliadas diferentes propriedades funcionais e tecnológicas, como solubilidade de proteínas, propriedades emulsificantes, capacidade de gelificação, capacidade de formação de espuma, capacidade de retenção de água e óleo e propriedades térmicas e reológicas. Dentre estas, as propriedades emulsificantes e espumantes foram melhoradas em relação ao controle, mas não foi obtida a formação de gel. Os autores afirmam que os hidrolisados apresentam boas propriedades reológicas, o que os torna bons ingredientes para serem adicionados em formulações de alimentos.

O tratamento inicial do BM moído com um coquetel de carboidrase aumentou significativamente a subsequente solubilização de proteínas da biomassa residual, conforme o estudo realizado por Niemi et al. (2013). Após o pré-tratamento com a carboidrase, o BM foi submetido a tratamentos com proteases. Quando tratado com uma protease alcalina, 76 % da proteína do BM foi solubilizada, enquanto os rendimentos foram significativamente menores com proteases neutras ou ácidas. Em condições alcalinas, uma quantidade significativa de proteína (53 %) foi solubilizada mesmo sem qualquer adição de protease. A solubilização não enzimática da proteína foi, no entanto, observada apenas quando o BM foi inicialmente tratado com a carboidrase, sugerindo que a proteína é circundada por polissacarídeos da parede celular, restringindo sua liberação inicial.

As proteínas extraídas por esses métodos bioquímicos (usando uma ou várias enzimas) exibem alta estabilidade térmica, baixa viscosidade e menor resistência a danos oxidativos. Esta estratégia de extração pode ser adaptada para obter produtos proteicos com propriedades funcionais melhoradas (formação de espuma, solubilidade, atividade de emulsificação e estabilidade). Portanto, a extração de proteínas mediada por enzimas pode ser adequada para a produção em grande escala de proteínas que podem ser usadas para desenvolver uma variedade de alimentos funcionais (KUMAR et al., 2021).

3.2.3 Métodos físicos

A utilização de novas tecnologias para extração de proteínas pode aumentar o rendimento da extração de proteínas, e suas propriedades tecno funcionais. Além disso, estes

são classificados como alternativas acessíveis, seguras, eficazes e ecologicamente corretas, permitindo o status de rótulo limpo. Apesar das inúmeras vantagens, a aplicação de novas tecnologias em nível industrial ainda é limitada (POJI; MI; TIWARI, 2018). A seleção do tipo de processo de extração de proteínas depende da finalidade pretendida do produto resultante, dos recursos disponíveis e das capacidades técnicas (CONTRERAS et al., 2019).

Dentre os métodos físicos que podem ser utilizados para a extração de proteínas, encontram-se as técnicas de ultrassom, campos elétricos pulsados, micro-ondas e aplicações de alta pressão (KUMAR et al., 2021).

3.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS VEGETAIS ASSISTIDA POR ULTRASSOM

O uso de ultrassom tem atraído atenção considerável para o desenvolvimento de novos processos para melhorar a qualidade e a segurança de alimentos. Além disso, a tecnologia oferece potencial para melhorar os processos existentes, principalmente os de extração de proteínas. O ultrassom (US) é uma técnica promissora em tecnologia de alimentos com baixo impacto no meio ambiente, sendo que nos Estados Unidos já é conhecida como tecnologia verde (HIGUERA-BARRAZA et al., 2016).

O US representa um método de processamento não térmico que usa ondas sonoras com frequência acima do limiar do ouvido humano (~20 kHz). Seu mecanismo funcional é baseado na passagem de ondas que criam regiões de alta e baixa pressão, e esta variação na pressão acústica é diretamente proporcional à quantidade de energia aplicada ao sistema. O US pode ser classificado em duas categorias: baixa intensidade (1 W cm^{-2}) com frequência de 5-10 MHz e alta intensidade ($10\text{-}1000 \text{ W cm}^{-2}$) com frequência de 20-100 kHz (HIGUERA-BARRAZA et al., 2016). Atualmente, há um grande interesse pelo ultrassom de alta intensidade, pois sua propagação em material biológico induz a compressão e descompressão de partículas que altera as propriedades físico-químicas do material e melhora a qualidade de vários sistemas. Uma das áreas mais estudadas é a extração assistida para recuperar proteínas e a melhora das propriedades funcionais (GHARIBZAHEDI; SMITH, 2020).

O US de alta intensidade é usado em aplicações para induzir mudanças físicas e químicas em matrizes vegetais devido a efeitos mecânicos e cavitacionais. O uso desta técnica resulta em um rendimento de extração maior causado pela rápida formação e colapso das bolhas de gás geradas pelas ondas ultrassônicas na superfície celular da amostra, formação de micro-jatos, micro-turbulência que exercem alto cisalhamento e força mecânica, causando ruptura da membrana e da parede celular. Dessa forma, o solvente circundante pode então penetrar

efetivamente nas células através das fendas causadas pelo ultrassom e liberar as proteínas intracelulares no solvente (KUMAR et al., 2021).

No entanto, o tratamento com US de alta intensidade para tempos de tratamentos mais longos pode gerar condições de alta temperatura e pressão que podem alterar o estado nativo da proteína. Portanto, a frequência, potência, intervalo de tempo, temperatura, pH, razão e intensidade do ultrassom são fatores essenciais para o seu uso, sendo necessário otimizar as condições de tratamento para aplicações específicas de US para obter bons resultados (KADAM et al., 2015).

A técnica de ultrassom é relativamente de baixo custo e simples. Adicionalmente, existem pesquisas que apoiam a eficácia da sonicação na melhoria das propriedades físicas e tecnológicas de proteínas (TÉLLEZ-MORALES; HERNÁNDEZ-SANTO; RODRÍGUEZ- MIRANDA, 2019). Em um estudo realizado por Flores-Jímenez et al. (2019), o tratamento com ultrassom (40 kHz durante 15 e 30 min) aumentou a solubilidade das proteínas, a capacidade de absorção de óleo e propriedades emulsificantes, de gelificação e formação de espuma do isolado proteico obtido da canola.

Lafarga et al. (2018) investigaram diferentes métodos de extração de proteínas de feijão (*Phaseolous vulgaris* L. vari. Ganxet) e avaliaram as propriedades funcionais dessas proteínas. O processamento com ultrassom (40 kHz, 250 W) resultou em um aumento de proteínas recuperadas. A maior porcentagem de proteína recuperada foi obtida após a extração usando NaOH 0,4 M seguida de processamento por ultrassom por 60 min, e foi calculada em 78,7 %.

O pré-tratamento do farelo de arroz desengordurado com ultrassom a uma razão de 1:10 (farelo:água), potência de 300 W e tempo de 30 min aumentou o rendimento da extração proteica de 53,1 % a 72,8 %, comparada com o controle (sem ultrassom) (ZHANG et al., 2019). A aplicação de ultrassom para auxiliar na extração alcalina de proteínas da farinha de amendoim foi realizada por Ochoa-Rivas et al. (2017), onde obtiveram aumento de 136 % na extração das proteínas (86 % de pureza) (amplitude de 100 % em 24 kHz e 15 min), e relataram que o auxílio do ultrassom no tratamento alcalino proporcionou diminuição do índice de solubilidade em água, índice de solubilidade de nitrogênio, estabilidade da espuma, atividade emulsificante e digestibilidade *in vitro*, enquanto o índice de absorção de água e atividade de espuma foram melhores em comparação com a extração de controle sem o uso de tratamento de ultrassom.

A otimização de extração de proteínas do BM com uso de ultrassom também foi avaliada por Tang et al. (2010). Três variáveis foram estudadas através de um planejamento experimental (DCCR), como tempo de extração (26,4 a 93,6 min), potência do ultrassom (46,4 a 113,6 W/100 mL) e proporção sólido:líquido (1,32 a 4,68 g/100 mL). A melhor condição encontrada para

atingir o rendimento máximo de extração proteica (104,2 mg g⁻¹ BM) foi de 81,4 min, potência do ultrassom em 88,2 W/100 mL e razão sólido:líquido de 2,0 g/100 mL.

Li et al. (2020) avaliaram as modificações na estrutura e propriedades funcionais das proteínas do BM com o uso do ultrassom. O ultrassom foi aplicado para aumentar o rendimento da extração proteica, e os resultados demonstraram que, em solução de NaOH 110 mM, a uma potência de 250 W por 20 min, podem melhorar significativamente o rendimento de proteína para 86,16 % em comparação com a extração tradicional sem ultrassom (45,71 %). Além disso, a capacidade de absorção de óleo, propriedades emulsificantes e de formação de espuma das proteínas do BM tratadas com ultrassom foram melhoradas. Portanto, o uso do ultrassom para auxiliar o processo de obtenção de proteínas de matrizes vegetais é promissor.

3.4 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS CONCENTRADOS PROTEICOS

As proteínas são ingredientes utilizados em uma variedade de formulações devido ao seu valor nutricional e a sua funcionalidade. O termo “funcionalidade” aplicado aos ingredientes alimentares descreve qualquer propriedade que não seja atributos nutricionais que contribuam para os aspectos benéficos de um ingrediente dentro de uma formulação (O’SULLIVAN et al., 2014). Em sistemas alimentares, as proteínas são moléculas altamente funcionais, capazes de estabilizar gotículas de óleo e bolhas de ar, de formar estruturas de gel e aumento e de aumentar a viscosidade do meio (O’CONNELL; FLYNN, 2007).

A solubilidade de uma proteína é um dos atributos funcionais críticos para sua utilização em alimentos, pois esta influencia em outras propriedades, como a emulsificante, a gelificante e a formação de espuma. Essas propriedades são características físico-químicas intrínsecas, que afetam o comportamento das proteínas no sistema alimentar durante o processamento (KINSELLA, 1979). De acordo com Damodaram, Parkin e Fennema (2010), a solubilidade de uma proteína é uma manifestação termodinâmica do equilíbrio entre interações proteína-proteína e proteína-solvente. Uma boa solubilidade conduz a aplicação da proteína para a produção de bebidas, molhos, sopas desidratadas, purês, entre outros.

A solubilidade de uma proteína poderá ser modificada pela influência de alguns fatores como pH, força iônica, constante dielétrica do solvente e temperatura (SGARBIERI, 1996). A solubilidade é determinada como a primeira propriedade funcional de uma proteína, uma vez que o grau de insolubilidade é, provavelmente, a medida mais prática da desnaturação. Os valores de solubilidade estabelecem: as condições ótimas de extração e também as informações gerais sobre possíveis aplicações de proteínas em sistemas líquidos (WILDING, 1984).

Além da solubilidade, a determinação da capacidade de retenção de água e óleo em alimentos proteicos é importante para a indústria de alimentos. Os consumidores tendem a evitar produtos que mostram a exsudação de água no interior da embalagem e, além disso, formulações que resultam em baixas capacidades de ligar água e óleo trazem perdas de líquidos durante o processamento (BARBUT, 1996). As propriedades de hidratação das proteínas estão diretamente relacionadas a sua composição aminoacídica e sua conformação. As proteínas interagem com a água mediante ligações de hidrogênio, ligações dipolo-dipolo ou cadeias laterais dos aminoácidos. Dessa forma, quando há uma proporção maior de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas, menor a capacidade de hidratação do que quando é composta por aminoácidos com cadeias laterais hidrofílicas. A conformação das proteínas também influi na capacidade de hidratação, bem como a organização tridimensional dessas cadeias ordenadas (ORDÓÑEZ, 2005).

Os teores de capacidade de ligação de água descrevem a quantidade máxima de água que uma proteína pode absorver, devido às pontes de hidrogênio que existem entre as moléculas de água e os grupos polares das cadeias proteicas. Já a absorção de óleo varia em função do número de grupos hidrofóbicos expostos da molécula de proteína (LIN; ZAYAS, 1987).

As proteínas também podem apresentar excelentes propriedades emulsificantes, podendo atuar na formação e estabilidade das emulsões em alimentos. O que torna uma emulsão estável é a presença de um agente emulsificante, o qual diminui a tensão superficial existente entre duas fases e permite a formação da emulsão. A principal característica de um agente emulsificante é a de possuir na mesma molécula partes hidrofílicas e hidrofóbicas, permitindo a formação de uma camada entre as duas fases, separando-as e impedindo que os glóbulos da fase interna coalesçam. Dois aspectos são importantes avaliar nas proteínas com propriedades emulsificantes: (1) a capacidade de emulsificação, que é a quantidade de lipídios que as proteínas são capazes de emulsionar, (2) a estabilidade da emulsão, que mede a capacidade que as proteínas possuem de manter a mistura em uma força homogênea, quando submetidas a ação de uma força ou calor (SGARBIERI, 1996).

A capacidade de uma proteína em formar espuma refere-se a expansão de volume da dispersão proteica com a incorporação de ar por batimento, agitação ou aeração. É uma propriedade funcional de interfase que depende da natureza da proteína, da sua solubilidade, da presença de sais e de outros aditivos utilizados no processamento de alimentos. Normalmente, o que se mede é a expansão de volume da suspensão de proteína, logo após o batimento ou aeração, que é representado pelo volume de espuma formado. A estabilidade de espuma indica

a retenção do volume máximo da espuma em um período de tempo de repouso (SGARBIERI, 1996).

Embora muitos estudos ressaltem a importância de uma alta solubilidade proteica, é aceito que as partículas proteicas insolúveis possam ter um papel benéfico na estabilidade da espuma. Geralmente, as espumas são mais estáveis na região do ponto isoelétrico das proteínas devido a sua repulsão eletrostática mínima, promovendo uma interação mais favorável entre proteína-proteína, formando um filme viscoso na interface (DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

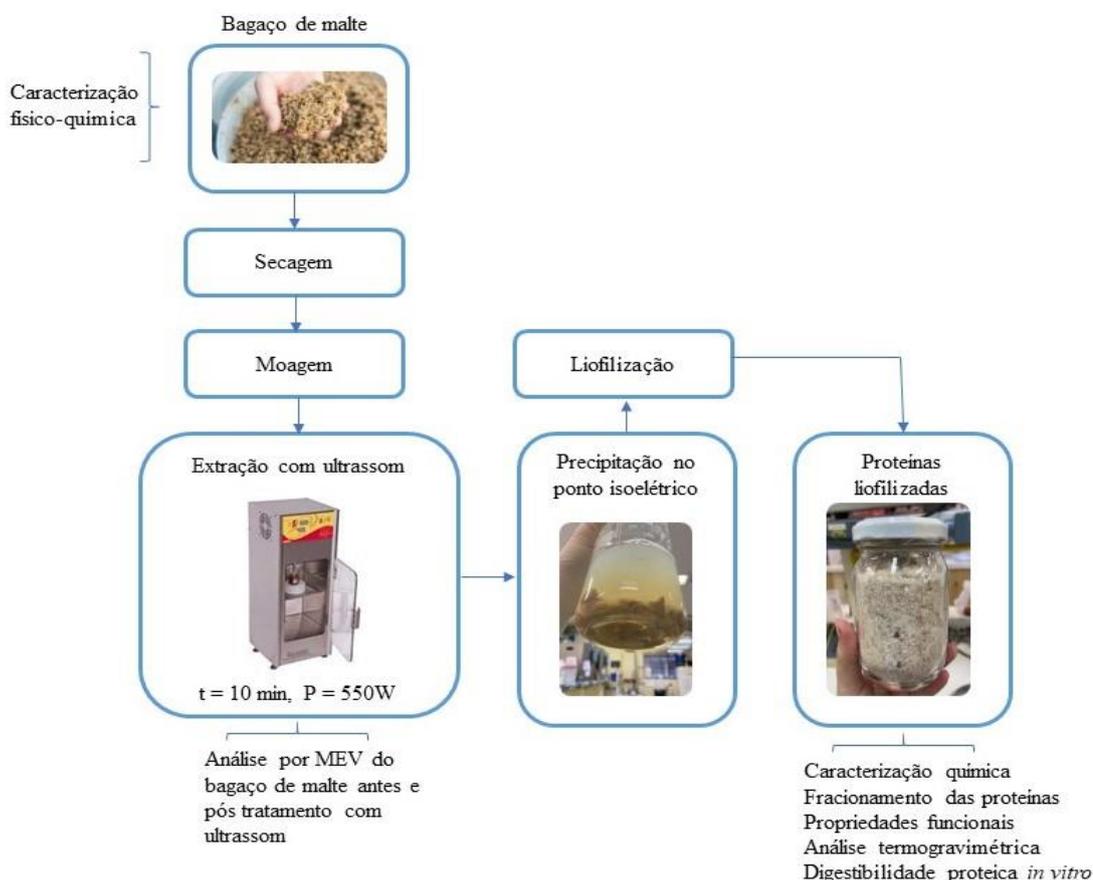
4.1 MATERIAL

O bagaço de malte (BM) utilizado neste estudo foi fornecido pela micro cervejaria Garden Grill Cervejaria Artesanal, localizada em Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. A matéria-prima foi transportada ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Escola de Química e Alimentos (EQA), e foi mantida sob congelamento (-18 °C) em recipiente devidamente vedado até o seu uso. O processamento teve início com a secagem do BM em estufa (G.Paniz FTE 150, Caxias do Sul, Brasil) por 24 h a 60 °C. Após a secagem, o mesmo foi triturado em moinho de facas (TECNAL, TE-633, Brasil), e armazenado em recipientes vedados de plástico sob congelamento até o seu uso. Todos os reagentes que foram utilizados neste trabalho foram de grau analítico (P.A).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Desenvolvimento do trabalho

Figura 2 – Organograma para obtenção e avaliação das proteínas do BM.



A Figura 2 apresenta o esquema geral de desenvolvimento do trabalho desde a preparação da matéria-prima até a avaliação e caracterização do concentrado proteico. Todas as análises e procedimentos experimentais foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da EQA, com exceção da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que foi efetuada no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME - Sul), todos na Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS.

4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA

O conteúdo de umidade (método n° 935.29), cinzas (método n° 923.03), lipídeos (método n° 920.85) e proteínas (método de micro-Kjeldahl, n° 920.87) foram determinados de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists International* – AOAC (2000). O conteúdo de carboidratos foi determinado por diferença.

4.4 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DAS PROTEÍNAS DO BM

A determinação do ponto isoelétrico das proteínas do BM foi realizada avaliando-se o pH em que ocorreu a maior precipitação proteica conforme proposto por Nolsoe e Undeland (2009) com modificações. O extrato proteico foi preparado com 1,1 g do BM e 50 mL de água destilada e com o auxílio de um pHmetro digital (Even, PHS-3E), utilizou-se HCl 1,0 M para ajuste de pH 2,0-6,0. O teor de proteínas solúveis no sobrenadante foi determinado pelo método de Bradford (1976).

4.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2³

Para avaliar e otimizar a melhor condição para obter um máximo rendimento de extração de proteínas do BM com assistência do ultrassom (Disruptor ultrassônico, Ecosonics, QR750, 60 Hz, 20 kHz, 750 W, Brasil), foi realizado um delineamento composto central 2³ (DCC), com 4 pontos centrais. As variáveis estudadas foram o tempo de aplicação do ultrassom (t), potência (P) e a razão sólido:solvente (S:S). Os valores das variáveis foram escolhidos a fim de minimizar ao máximo o uso de solvente, custo e tempo. A variável resposta foi a concentração de proteína solúvel no meio (mg g⁻¹), e foi avaliada através do método colorimétrico de Bradford (1976). A matriz do delineamento com os níveis reais e codificados está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Matriz do delineamento experimental, com valores codificados e reais de estudo (tempo, sólido:solvente [S:S] e potência) na obtenção de proteínas do BM.

Ensaio	Valores codificados			Tempo (min)	S:S (p v ⁻¹)	Potência (W)
1	-1	-1	-1	10	15	250
2	+1	-1	-1	30	15	250
3	-1	+1	-1	10	45	250
4	+1	+1	-1	30	45	250
5	-1	-1	+1	10	15	550
6	+1	-1	+1	30	15	550
7	-1	+1	+1	10	45	550
8	+1	+1	+1	30	45	550
9	0	0	0	20	30	400
10	0	0	0	20	30	400
11	0	0	0	20	30	400
12	0	0	0	20	30	400

4.5.1 Extração assistida por ultrassom

Primeiramente homogeneizou-se 4,44 g de BM com NaOH 1 M na proporção 1:45 (BM:solução (p/v)) durante 10 min sob constante agitação em agitador magnético (Fisatom 752A, São Paulo, Brasil). Após, transferiu-se a amostra para um reator de vidro encamisado (Uniglás, 190.901), conectado a um banho ultra termostático (Quimis, Q214M2), que estava acoplado ao ultrassom, a fim de que a temperatura não ultrapassasse 25 °C, a uma potência de 550 W por 10 min. O extrato foi centrifugado (Biosystems, MPW 350) a 14.308 x g por 20 min a temperatura ambiente, filtrado com papel filtro e o sobrenadante (extrato em rico proteínas) foi separado para posterior precipitação das proteínas. O resíduo insolúvel proveniente da centrifugação foi seco em estufa à 80 °C por 8 h, e armazenado em recipientes fechados até análise de sua microestrutura por MEV.

4.5.1.1 Microestrutura do BM antes e após o tratamento com ultrassom

A morfologia das superfícies das amostras do BM antes e após o tratamento com ultrassom (na melhor condição determinada) foi avaliada utilizando um microscópio eletrônico

de varredura (MEV) (Jeol, JSM – 6610LV, Thermo Scientific, Ultra Dry, USA). As amostras foram depositadas diretamente em *stubs* de alumínio usando uma fita adesiva de carbono dupla face e revestidas com uma fina camada de ouro, sendo utilizado um potencial de aceleração de 15 kV.

4.6 OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DO BM

A obtenção do concentrado proteico ocorreu de acordo com o procedimento descrito por Nolsoe e Undeland (2009) com modificações, e está demonstrada na Figura 3. O extrato rico em proteínas foi obtido conforme citado no Item 4.5.1. O extrato foi colocado sob agitação magnética, acoplado a um pHmetro, para precipitação das proteínas no ponto isoelétrico pré-estabelecido (pH 3,0). Para atingir o pH desejado foi realizada a adição de HCl 1 M e NaOH 1 M quando necessário. O meio foi mantido nessa condição por 30 min, e após centrifugado a $14.308 \times g$ por 20 min. Após separadas, as proteínas foram neutralizadas com NaOH 1 M, e submetidas ao congelamento em ultra freezer (Indrel, IULT 90-D) a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h e seca em liofilizador (Liotop, L108) a $-55 \text{ }^\circ\text{C}$ e $50 \text{ } \mu\text{Hg}$ durante 48 h.

De modo a aumentar o rendimento do processo, a fração insolúvel proveniente da primeira centrifugação foi ressuspensa e submetida a solubilização alcalina por mais uma vez.

4.6.1 Rendimento do processo de extração

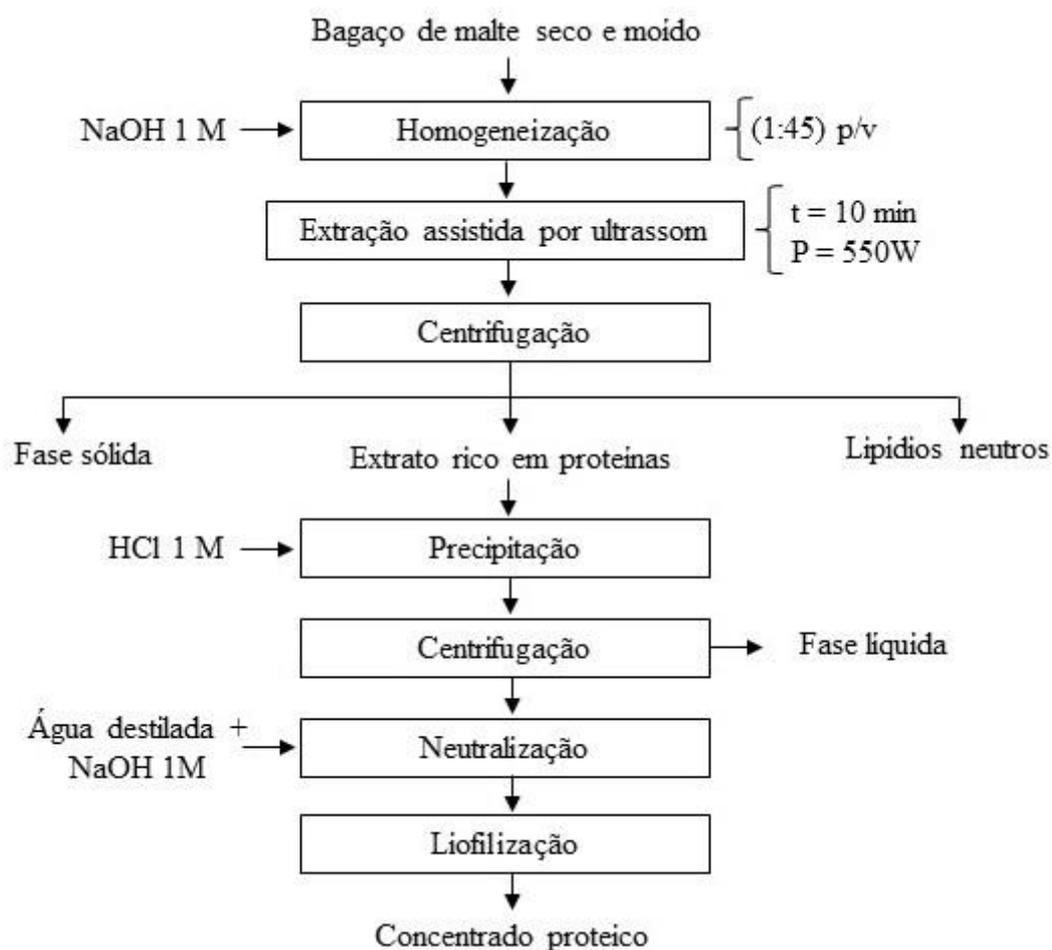
O rendimento em massa do processo (η) foi calculado considerando a massa inicial de bagaço de malte e a massa do concentrado proteico ao final do processo, conforme Equação 1. O rendimento da extração proteica (R_{ep}) foi calculado considerando o teor de proteínas inicial e final obtidos, como mostra a Equação 2.

$$\eta (\%) = \frac{m_{\text{concentrado proteico}}}{m_{\text{bagaço de malte}}} \quad (1)$$

$$R_{ep} (\%) = \frac{m_{\text{concentrado proteico}} \times P_{\text{concentrado proteico}}}{m_{\text{bagaço de malte}} \times P_{\text{bagaço de malte}}} \quad (2)$$

Em que: $m_{\text{concentrado proteico}}$ = massa final do extrato proteico obtido (g), $m_{\text{bagaço de malte}}$ = massa inicial do bagaço de malte (g), $P_{\text{concentrado proteico}}$ = concentração de proteínas final obtido (%) e $P_{\text{bagaço de malte}}$ = concentração inicial de proteínas no bagaço de malte (%).

Figura 3 – Fluxograma do processo de obtenção do concentrado proteico do BM.



4.7 CARACTERIZAÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DO BM

4.7.1 Caracterização química do concentrado proteico

O conteúdo de umidade (método n° 935.29), cinzas (método n° 923.03), lipídeos (método n° 920.85) e proteínas (método de micro-Kjeldahl, n° 920.87) foi determinado de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists International* – AOAC (2000). O conteúdo de carboidratos foi determinado por diferença.

4.7.2 Fracionamento das proteínas

A extração sequencial das albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas foram realizadas de acordo com Naozuka e Oliveira (2007), com algumas modificações. Para essa determinação, 10 mL de uma solução metanol:clorofórmio (1:2 v v⁻¹) foram adicionados em 5 g de amostras, agitados a 200 rpm por 15 min. Este procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração. As soluções extratoras utilizadas foram: (1) água destilada, (2) NaCl 0,5 M, (3) etanol 70 % (v v⁻¹) e (4) NaOH 0,5 M. Em cada etapa, adicionou-se as amostras 10 mL de cada solução e manteve-se sob agitação mecânica por 30 min a 200 rpm. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 8667 x g e os sobrenadantes, de cada uma das frações, recuperados, avolumados para 10 mL, e a proteína determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando a curva padrão de albumina.

4.7.3 Estudo das propriedades funcionais

4.7.3.1 Solubilidade proteica

A solubilidade do concentrado proteico foi determinada para os pH 2, 4, 7 e 10, segundo metodologia descrita por Liu et al. (2014) com adaptações. Resumidamente, amostras de 800 mg foram dissolvidas em 80 mL de água destilada e o pH foi ajustado utilizando NaOH 1 M e HCl 1 M, quando necessário. A solução foi agitada durante 1 h a temperatura ambiente (25 °C ± 1), e em seguida centrifugou-se a 8667 x g por 10 min. Após a centrifugação, a solução foi filtrada para a separação da fração solúvel. A concentração de proteína solúvel foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976).

4.7.3.2 Propriedades de espuma

A capacidade de formação de espuma (CFE) e estabilidade da espuma (EE) foram avaliadas seguindo o método de Miller e Groninger (1976), onde soluções preparadas com 2 % (p v⁻¹) de amostra em água destilada em proveta graduada foram agitadas com ultraturrax por 1 min a 9000 rpm. A estabilidade da espuma foi avaliada à temperatura ambiente através do acompanhamento do volume total após intervalos de 5, 10, 15, 30 e 60 min de repouso das amostras. Para o cálculo da capacidade de formação de espuma e estabilidade da espuma foram utilizadas as Equações 3 e 4, respectivamente.

$$\text{CFE (\%)} = \frac{\text{VE}}{\text{V}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{VE}_{\text{tempo t}}}{\text{VE}} \times 100 \quad (4)$$

Em que: VE = volume da espuma (mL); $\text{V}_{\text{inicial}}$ = volume da solução antes da agitação (mL); $\text{VE}_{\text{tempo t}}$ = volume de espuma remanescente após intervalo de tempo t (mL).

4.7.3.3 Propriedades emulsificantes

As propriedades emulsificantes do concentrado proteico do BM de índice de emulsificação (IE) e estabilidade do índice de emulsificação (EIE) foram determinadas segundo método turbidimérico de Pearce e Kinsella (1978) com algumas modificações. Um volume de 120 mL, na concentração de 2 mg mL⁻¹, foi homogeneizado com 40 mL de óleo de soja, em homogeneizador ultraturrax (T25, IKA WERKE) a 10000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente (25 °C ± 1). Após agitação o pH da solução foi ajustado para os pH 2,0; 4,0; 7,0 e 10 com o auxílio de HCl 1 M e NaOH 1 M. Uma alíquota de 50 µL de solução foi diluída em 5 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) à 0,1 % (p v⁻¹). A absorbância da emulsão diluída foi mensurada a 500 nm, nos tempos de reação de 0 e 10 min. O índice de emulsificação (IE) e estabilidade de emulsificação (EIE) foram determinados de acordo com as Equações 5 e 6.

$$\text{IE (m}^2 \text{ g}^{-1}\text{)} = \frac{2 \times 2,303 \times 100 \times A}{c \times 0,25 \times 10000} \quad (5)$$

$$\text{EIE (\%)} = \frac{A_{10}}{A_0} \times 100 \quad (6)$$

Onde A é a absorbância a 500 nm, c é a concentração de proteína (g mL⁻¹), A₀ e A₁₀ são as absorbâncias das emulsões diluídas a 0 e 10 min.

4.7.3.4 Capacidade de retenção de água e óleo

As capacidades de retenção de água (CRA) e óleo (CRO) foram determinadas de acordo com o método de Beuchat (1977). As amostras (equivalente de proteína 0,5 g) foram misturadas

durante 30 min com 5 mL de água destilada ou 5 mL de óleo de soja. A suspensão foi centrifugada a 866 x g por 10 min, e a água/óleo não retida foi decantada e pesada. O sobrenadante foi recuperado, e sua massa medida. Os valores de retenção de água e óleo foram calculados conforme a Equação (7) e expresso em massa (g) de água ou óleo por unidade de massa (g) de proteína.

$$\text{Capacidade de retenção de água e óleo (g/g)} = \frac{R}{m} \quad (7)$$

Em que: “R” corresponde a quantidade de água ou óleo retido (g) e “m” a massa de amostra (g).

4.7.4 Digestibilidade proteica

A análise de digestibilidade das proteínas foi realizada conforme método descrito por Akesson e Stahmann (1964), foram colocados nos tubos de digestão 1 g da amostra e 10 mL de pepsina. Os tubos foram incubados em *shaker* por 3 h a 37 °C. O pH foi ajustado com NaOH 0,1 M. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 8667 x g durante 15 min e as amostras foram filtradas com papel filtro. O sobrenadante foi mantido sob refrigeração para posterior quantificação. No precipitado foi adicionado 10 mL de pancreatina e os tubos foram incubados em *shaker* por 24 h a 37 °C. Adicionou-se 10 mL de ácido tricloroacético 30 % para parar a reação e o volume foi completado para 50 mL com TCA 5 %. Centrifugou-se a 8667 x g por 15 min e filtrou-se. A quantificação foi realizada por Bradford (1976), tendo tirosina como padrão.

4.7.5 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Para avaliação da estabilidade térmica das proteínas foi utilizado o calorímetro diferencial de varredura (DSC-Q20, TA Instruments, New Castle, USA), utilizando o método descrito por Piotrowicz e Salas-Mellado (2017). As amostras foram pesadas (3 mg) em cápsulas de alumínio, seladas e aquecidas a uma taxa de 10 °C min⁻¹ em uma faixa de temperatura de 20 a 200 °C, usando uma cápsula vazia como referência. As temperaturas de início (T_o), de desnaturação (T_d), final (T_f) e a entalpia de desnaturação (ΔH) foram analisadas a partir das curvas obtidas utilizando o software do instrumento.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, exceto análise térmica e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância, utilizando o programa *Statistica 5.0* (Statsoft, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DO BM

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos da composição proximal do bagaço de malte (BM). O BM é rico em nutrientes, e sua composição final pode variar devido a diversos fatores, como o tipo de malte e processo utilizados. Pode-se observar que as proteínas são o segundo maior grupo constituinte do BM, o teor de proteínas encontrado apresentou um valor de 21,5%, próximo ao encontrado por Saraiva et al. (2019) e Kanauchi et al. (2001), onde encontraram 23,5 % e 24 % de proteínas no BM, respectivamente. O teor de carboidratos e lipídeos foram próximos (73,8 % e 4,4 %) aos valores encontrados por Jacometti et al. (2015).

Tabela 2 – Composição proximal do BM.

Determinação	Bagaço de malte (%)
Umidade	78,3 ± 0,4
Proteínas*	21,5 ± 0,8
Lipídios*	4,2 ± 0,3
Cinzas*	3,3 ± 0,7
Carboidratos*	71,0

*Resultados expressos em base seca. Todos os resultados são expressos como média ± desvio padrão das triplicatas. Carboidratos obtidos por diferença.

Para cinzas, Mussato e Roberto (2005) obtiveram valores maiores que esse estudo (4,6%), e Kanauchi et al. (2001) encontraram um menor teor (2,4 %). A quantidade relativamente alta da fração proteica evidencia a possibilidade da reutilização do BM para obtenção de proteínas e futura aplicação em produtos alimentícios.

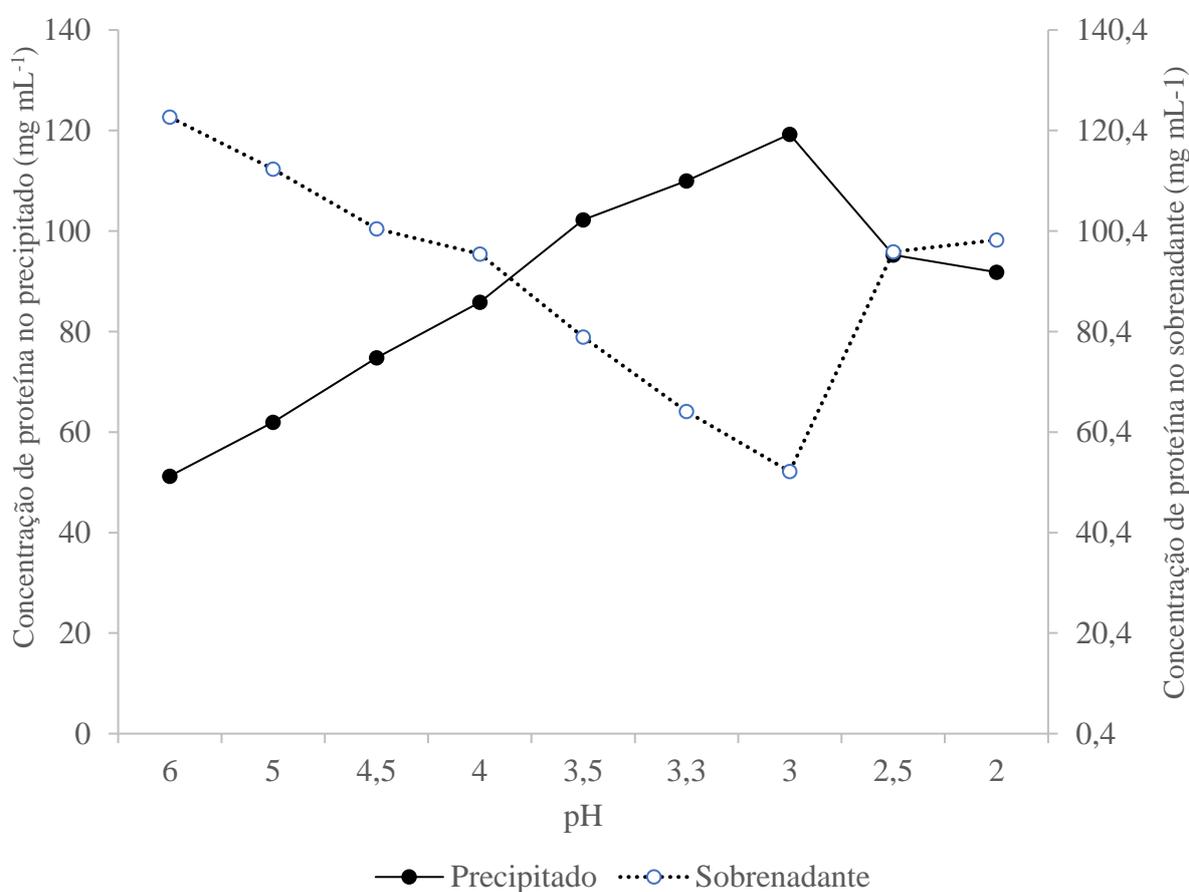
5.2 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DAS PROTEÍNAS DO BM

O ponto isoelétrico (pI) é influenciado pela presença de todos os aminoácidos constituintes das proteínas, sendo este função do pK dos seus grupos carboxílicos e amino terminais ionizáveis e das cadeias laterais desses aminoácidos constituintes (BECKER, 2007). A cevada, principal constituinte do BM, apresenta elevada quantidade de aminoácidos ácidos como ácido glutâmico (26,9 %), ácido aspártico (6,8 %), em relação aos aminoácidos totais

(HOUDE et al., 2018). Esses aminoácidos são classificados como ácidos pois ficam carregados negativamente em pH acima de 3 (ponto isoelétrico) (BECKER, 2007).

Na Figura 4, a menor concentração proteica observada no sobrenadante no pH 3, e a maior concentração no precipitado é no mesmo pH, indicando o ponto isoelétrico das proteínas obtidas do BM. O mesmo pI (3,0) foi encontrado por Arauzo et al. (2019), que também estudaram a obtenção de proteínas do BM com o método do *pH-shifting*. Ervin et al. (1989) estudaram a obtenção de concentrados proteicos do BM e precipitaram as proteínas com etanol 95% no pH 2,0. Connolly, Piggot e Fitzgerald (2013) também avaliaram o pI do bagaço de malte claro e escuro (utilizados para processamento de cervejas claras e escuras), e relataram o pH de 3,8 como sendo o pI destes materiais. Diferentes comportamentos de solubilidade podem ser encontrados devido a diversos fatores como variações na composição dos grãos e formas de cultivo, o que podem resultar em alterações na composição de aminoácidos presentes no BM, e assim modificando o pI das proteínas.

Figura 4 – Determinação do ponto isoelétrico das proteínas do BM em função da solubilidade.



5.3 MAXIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO BM ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Após caracterização química da matéria-prima, secagem e moagem do material, foi realizado um delineamento composto central. No presente estudo, o DCC 2³ foi utilizado para maximizar a extração das proteínas do BM com o uso de ultrassom. A Tabela 3 apresenta os valores codificados e reais para o DCC 2³ e o teor de proteína solúvel determinado ao final da extração.

Tabela 3 – Resultados do delineamento experimental DCC 2³.

Ensaio	X ₁ (min)	X ₂ (p v ⁻¹)	X ₃ (W)	P (mg g ⁻¹)	P _P (mg g ⁻¹)	DR (%)
1	10 (-1)	15 (-1)	250 (-1)	70,59	67,52	4,35
2	30 (+1)	15 (-1)	250 (-1)	94,35	95,48	-1,19
3	10 (-1)	45 (+1)	250 (-1)	84,68	87,50	-3,33
4	30 (+1)	45 (+1)	250 (-1)	116,84	115,46	1,18
5	10 (-1)	15 (-1)	550 (+1)	90,18	94,24	-4,50
6	30 (+1)	15 (-1)	550 (+1)	107,60	104,98	2,44
7	10 (-1)	45 (+1)	550 (+1)	118,54	114,23	3,64
8	30 (+1)	45 (+1)	550 (+1)	122,60	124,97	-1,93
9	20 (0)	30 (0)	400 (0)	101,65	100,55	1,08
10	20 (0)	30 (0)	400 (0)	98,90	100,55	-1,67
11	20 (0)	30 (0)	400 (0)	101,02	100,55	0,47
12	20 (0)	30 (0)	400 (0)	99,61	100,55	-0,94

Legenda: X₁: Tempo; X₂: Sólido:Solvente; X₃: Potência; P: Teor de proteína; P_P: Teor de proteína predita; DR: desvio relativo.

Conforme exposto na Tabela 3, os teores de proteína variaram de 70,59 (ensaio 1) a 122,60 mg g⁻¹ (ensaio 8) em função das condições de extração estudadas. O maior teor de proteína obtido foi alcançado no ensaio 8 (122,60 mg g⁻¹). O baixo coeficiente de variação (1,09 %) no ponto central (ensaios 9-12, 100,30 ± 1,09 mg g⁻¹) sugere uma boa reprodutibilidade dos ensaios.

As variáveis significativas codificadas e a variável resposta do DCC foram utilizadas para calcular os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de *p* e *t*, como mostra a Tabela

4. A interação entre o tempo e relação sólido:solvente, e a interação entre a potência e relação sólido:solvente foram os únicos fatores não significativos ($p > 0,05$).

A Tabela 5 mostra os resultados dos parâmetros da ANOVA. Pode-se observar que o teste F para regressão foi significativo ($p < 0,05$), uma vez que o valor de F_{cal} (21,09) é maior que o F_{tab} (6,09), indicando assim que o modelo é preditivo e pode explicar o efeito do tempo de extração, proporção de solvente utilizado e potência do ultrassom na extração de proteínas. O coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,97 indicou que apenas 3% da variação total da resposta não pode ser explicado pelo modelo.

Tabela 4 – Coeficientes de regressão (CR), erro padrão (EP), valores de p e t obtidos no DCC 2^3 para o teor de proteínas.

Fator	CR	EP	t (4)	p*
Média	100,29	1,99	50,15	<0,05
X ₁	9,67	1,41	6,84	<0,05
X ₂	9,99	1,41	7,07	<0,05
X ₃	9,06	1,41	6,40	<0,05
X ₁ x X ₂	-0,62	1,41	-0,44	0,68
X ₁ x X ₃	-4,31	1,41	-3,04	<0,05
X ₂ x X ₃	0,85	1,41	0,59	0,58

*Nível de significância de 0,05; Legenda: X₁: Tempo; X₂: Sólido:Solvente; X₃: Potência

Tabela 5 – ANOVA fatorial do DCC para o teor de proteína.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	R ²
Regressão	2361,35	7	337,33	21,09	6,09	0,97
Resíduo	63,99	4	15,99			
Total	2425,34	11				

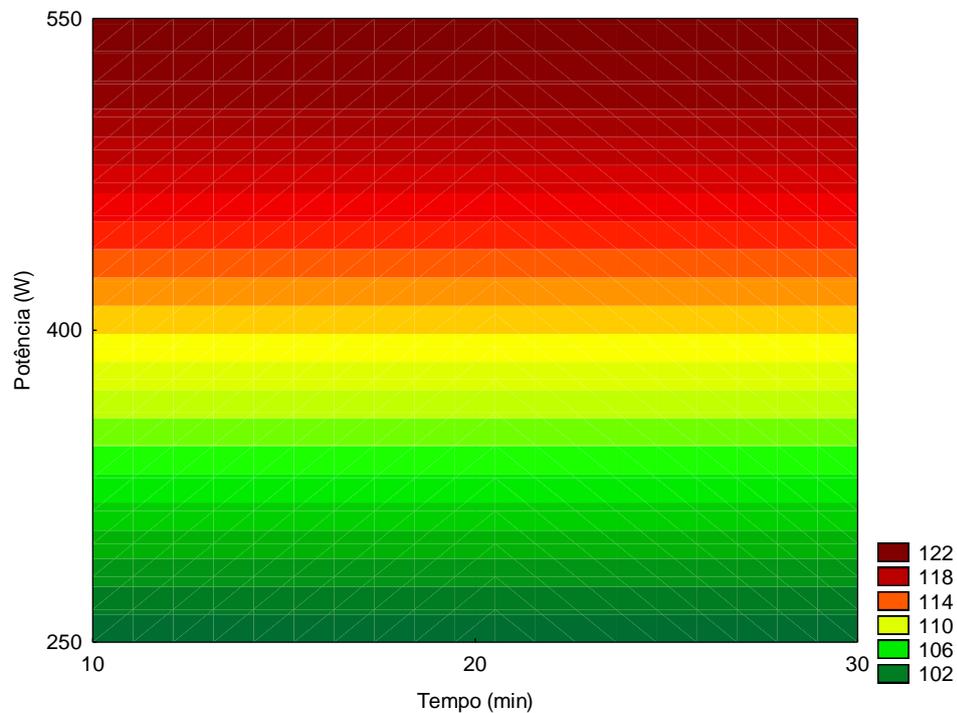
Legenda: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Média dos quadrados

A partir dos resultados da ANOVA fatorial e dos coeficientes de regressão, um modelo de primeira ordem (Equação 8) foi estabelecido a partir das variáveis codificadas, a fim de descrever o comportamento da extração de proteínas no ultrassom em função do tempo, razão sólido:solvente e potência do equipamento, como segue:

$$\text{Teor de proteínas (mg g}^{-1}\text{)} = 100,29 + (9,67 \times X_1) + (9,99 \times X_2) + (9,06 \times X_3) - (4,31 \times X_1 \times X_3) \quad (8)$$

Onde X_1 , X_2 e X_3 são os valores codificados que representam o tempo de extração, a razão sólido:solvente e a potência do ultrassom, respectivamente. Entre os três fatores avaliados, a razão sólido:solvente exerceu o maior impacto na extração das proteínas, uma vez que apresentou o maior valor absoluto de coeficiente de regressão (9,99), seguido do tempo de extração (9,67), conforme mostrado na Tabela 4. A partir do modelo preditivo descrito na Equação 8, as curvas de contorno foram construídas (Figuras 5, 6 e 7).

Figura 5 – Curva de contorno para extração de proteínas em função do tempo de extração e potência do ultrassom.



As superfícies de contorno são construídas com o intuito de compreender as interações entre as variáveis independentes e determinar seus valores para atingir a otimização e melhoria de processos. A Figura 5 ilustra graficamente o efeito da interação da variação do tempo de extração com a potência da sonda ultrassônica na extração das proteínas do BM. Esta sugere que a melhor extração proteica independe do tempo analisado na maior potência do ultrassom (550 W), então é possível obter a mais alta concentração de proteínas, no menor tempo de extração (10 min). O mesmo efeito ocorre na Figura 6, onde a superfície de contorno mostra a interação do tempo de extração com a razão sólido:solvente. A máxima concentração de proteína é alcançada com o aumento da proporção de solvente (1:45, p/v) e a sua interação com

o tempo não é significativa ($p > 0,05$), novamente o tempo não influenciou na extração da proteína, portanto após esta análise o tempo de extração foi fixado em 10 min.

Figura 6 – Curva de contorno para extração de proteínas em função do tempo de extração e razão sólido:solvente.

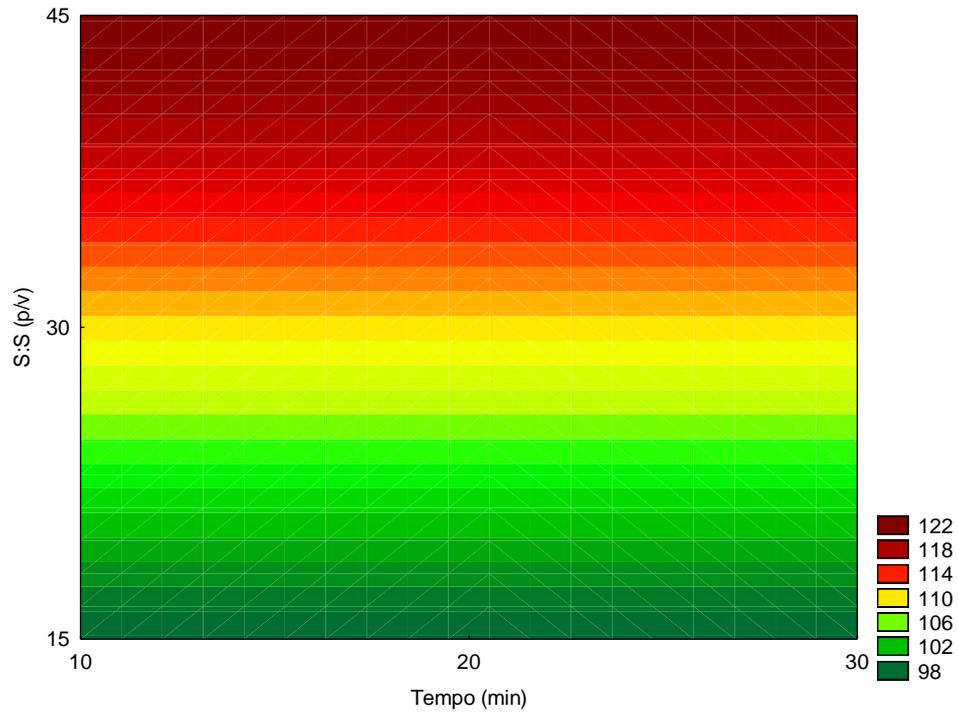
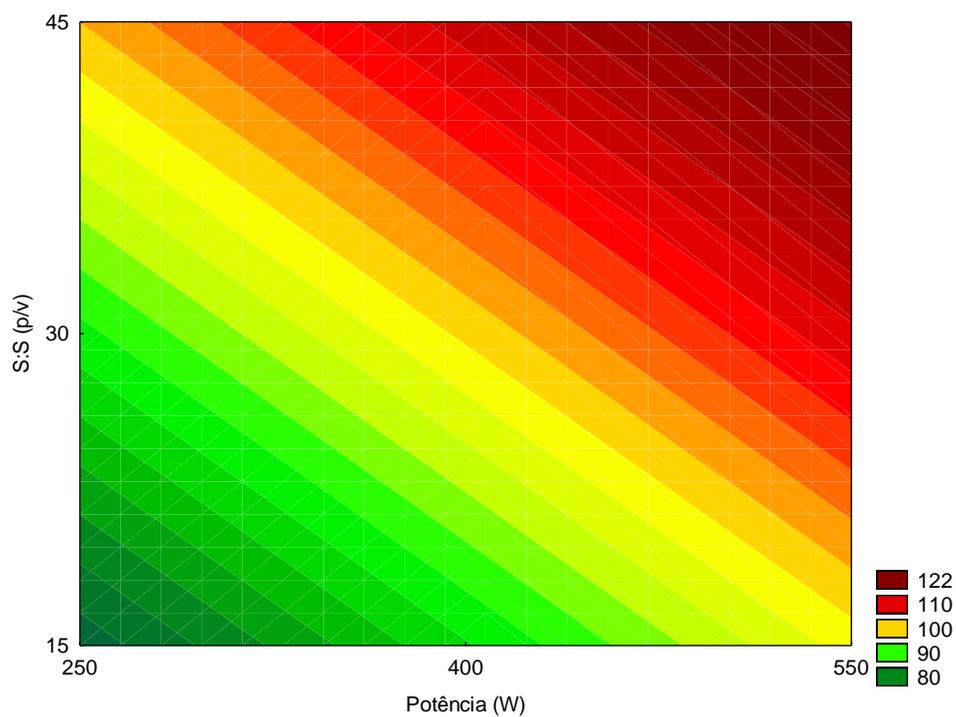


Figura 7 – Curva de contorno para extração de proteínas em função da potência do ultrassom e razão sólido:solvente.



A Figura 7 mostra o gráfico de contorno que ilustra a interação da potência do equipamento com a razão sólido:solvente. Neste caso, é possível observar que a máxima concentração de proteína obtida foi alcançada na maior potência estudada (550 W) e na maior proporção de solvente (1:45, p/v).

Portanto, após a análise das respostas do delineamento composto central realizado, foi determinada as condições de extração das proteínas no ultrassom em $t = 10$ min, razão sólido:solvente = 1:45 (p/v) e $P = 550$ W (ensaio 7).

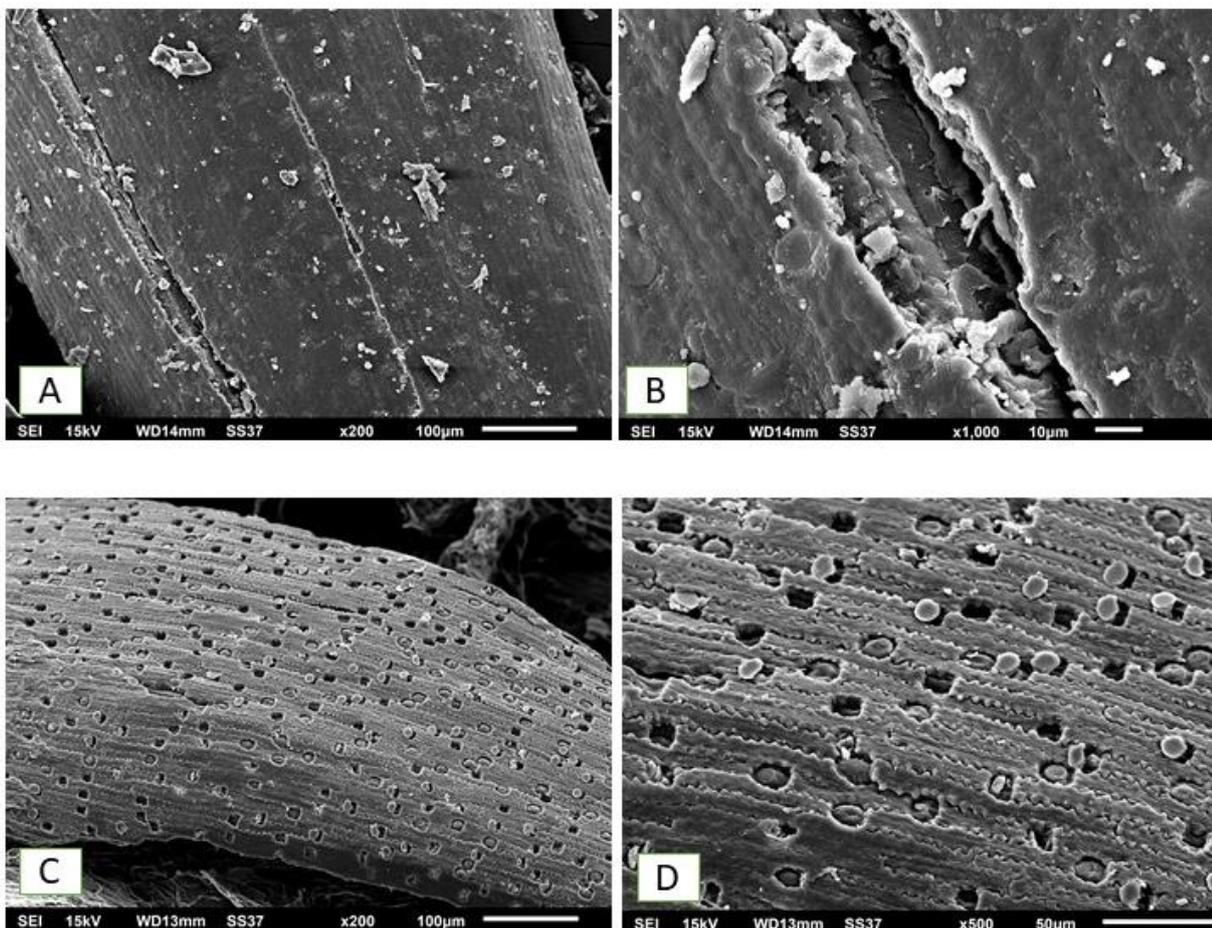
5.4 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE MORFOLÓGICA DO BM ANTES E APÓS TRATAMENTO COM ULTRASSOM

As imagens de MEV foram obtidas para analisar a superfície morfológica do BM antes e após o tratamento com ultrassom, a fim de verificar as mudanças em suas estruturas que corroborassem com o aumento da extração de proteínas. A extração de proteínas assistida por ultrassom em matrizes vegetais vem sendo estudada com o intuito de aumentar o rendimento da extração proteica.

Os efeitos do ultrassom de alta intensidade são atribuídos à sua capacidade de induzir a cavitação. Durante a sonicação, pequenas bolhas de gás são formadas dentro do fluido que colapsam violentamente, levando a uma intensa cavitação, turbulência e tensões de cisalhamento. Além disso, o ultrassom é considerado uma técnica de processamento “verde” como uma alternativa aos procedimentos convencionais de processamento, preservação e extração (FLORES-JIMÉNEZ et al., 2019).

A Figura 8 mostra as imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura do BM. Pode-se observar que nas Figuras 8A e 8B, o BM sem aplicação do ultrassom, apresenta superfícies mais lisas e sem porosidade. Já a Figura 8C e 8D apresenta as superfícies do BM pós tratamento com ultrassom, e nota-se claramente a presença de micro furos em sua estrutura, o que indica que a potência ultrassônica de 550 W contribuiu para a ruptura celular e aumentou a permeabilidade das paredes celulares. Dessa forma, o solvente entra mais facilmente na parte interna do material e pode extrair e solubilizar a proteína com mais facilidade (LI et al., 2020). No entanto, até o momento não foi encontrado nenhum estudo que analisou a superfície do bagaço de malte após o tratamento com ultrassom para fins de comparação e discussão.

Figura 8 – Imagens da microscopia eletrônica de varredura do BM antes e após tratamento com ultrassom.



A – Ampliação de 200x, amostra sem aplicação do ultrassom; B – Ampliação de 1000x, amostra sem aplicação do ultrassom; C – Ampliação de 200x, amostra com aplicação do ultrassom; D – Ampliação de 500x, amostra com aplicação do ultrassom.

A partir das imagens obtidas por MEV e da concentração de proteína obtida após o tratamento com ultrassom neste estudo e após revisão da literatura, pode-se inferir que o tratamento do bagaço de malte com o ultrassom aumentou a extração de proteínas, através da modificação estrutural provocada pelo efeito da cavitação na superfície do BM, o que aumentou a porosidade e assim facilitou a solubilização das proteínas pelo solvente aplicado.

5.5 COMPOSIÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO OBTIDO DO BM

O concentrado proteico do BM obtido através da extração assistida por ultrassom ($P = 550 \text{ W}$, $t = 10 \text{ min}$ e razão sólido:solvente (1:45)) e precipitação no pI apresentou 48,3 % de

proteínas. O rendimento em massa de extrato proteico foi de 30,5 % e o rendimento da extração proteica de 62,7 %. Este resultado é duas vezes maior ao obtido por Connolly, Piggott e Fitzgerald (2013), que obtiveram 23,1 e 26,9 % no concentrado proteico do BM claro e escuro, respectivamente.

Tabela 6 – Composição proximal do concentrado proteico do BM e rendimento do processo de extração.

Determinação	Quantidade (%)
Proteínas	48,3 ± 0,8
Lipídios	18,2 ± 0,4
Cinzas	5,8 ± 0,5
Carboidratos	27,7
Rendimento em massa de extrato proteico (η %)	30,5
Rendimento da Extração Proteica (REP %)	62,7

Todos os resultados são expressos em base seca, e como média \pm desvio padrão das triplicatas.

Já a extração de proteínas assistida por ultrassom do BM realizada por Li et al. (2020), que foi fixada em 250 W por 20 min, na proporção 1:15 (p/v), resultou em rendimento de extração final de 86,16 %, e aumentou 0,88 vezes em comparação com a extração de proteínas convencional sem ultrassom (45,71 %). Yu et al. (2020) desenvolveram um processo enzimático assistido por ultrassom para separar a proteína do BM com uma potência de 500 W e amplitude de 40 % por 10 min. Os resultados mostraram que a eficiência de separação de proteínas aumentou para 69,8 % e a carga enzimática reduzida em 73 %. Tang et al. (2010) também relataram que sob potência ultrassônica de 88,2 W/100 mL por 81,4 min, a obtenção de proteína atingiu $96,4 \pm 3,5 \text{ mg g}^{-1}$ de amostras do BM. Neste estudo, como já foi demonstrado no Item 5.3, o máximo teor de proteína obtido (ensaio 7: $118,54 \text{ mg g}^{-1}$) foi atingido em apenas 10 min. Portanto, o uso de ultrassom pode ser um método simples e eficiente para a recuperação de proteínas do BM.

O teor de lipídios (18,2 %) e carboidratos (27,7 %) encontrados, sugerem que o ultrassom pode ter facilitado o arraste destes compostos para o extrato proteico. Além disso, isso pode ser atribuído à co-solubilização destes materiais, que também são solúveis em álcali (ROMMI et al., 2018). As cinzas apresentaram 5,8 %, sendo que estas podem estar presentes nos concentrados em função da presença de sal que se forma pela adição do hidróxido de sódio

e ácido clorídrico durante os processos de solubilização e precipitação das proteínas (OMURA et al., 2021).

5.5.1 Fracionamento das proteínas do BM

As glutelinas representaram a maior fração de proteínas (73,1 %) no concentrado proteico obtido neste estudo, conforme demonstrado na Tabela 7. Em outro estudo, as prolaminas foram mais abundantes (LI et al., 2020), mais especificamente as hordeínas, de acordo com as bandas eletroforéticas encontradas na faixa de 17, 34 e 72 kDa.

Tabela 7 – Frações proteicas encontradas no concentrado proteico do BM.

Fração proteica	% do total
Albuminas	10,6 ± 1,2
Globulinas	7,3 ± 0,9
Glutelinas	73,1 ± 0,4
Prolaminas	8,0 ± 0,8

O solvente de extração utilizado neste trabalho (NaOH) produziu hidrólise alcalina que tinha como alvo apenas uma fração proteica específica produzido no BM, como globulinas e glutelinas. De acordo com Arauzo et al. (2019) as proteínas dos grãos podem ser classificadas em quatro classes principais de acordo com suas extrações sequenciais: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em sal), hordeínas (solúveis em álcool) e glutelinas (ácido/alcalino-solúveis). As principais proteínas do BM são as glutelinas e hordeínas e, portanto, as hordeínas não se solubilizaram durante o processo descrito neste estudo. As soluções alcalinas são os solventes *Generally Recognized As Safe* (GRAS) mais eficazes para a extração de proteínas de plantas e cereais (CONNOLLY; PIGGOTT; FITZGERALD, 2013), e portanto, o NaOH foi escolhido como solvente de extração.

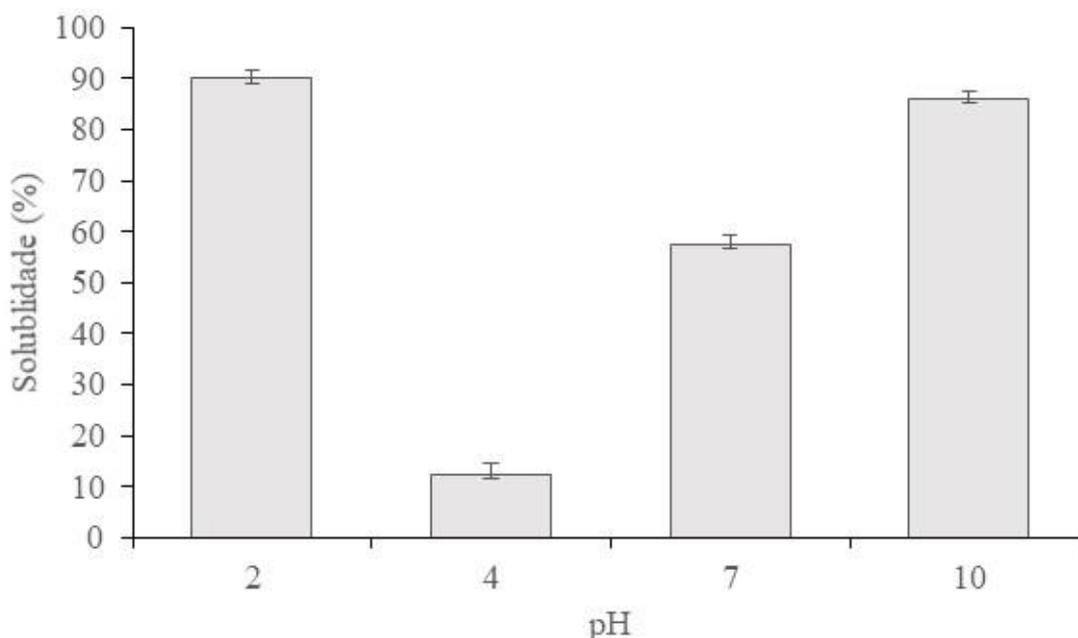
5.6 ESTUDO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO CONCENTRADO PROTEICO

5.6.1 Solubilidade proteica

A Figura 9 apresenta a solubilidade proteica (%) do concentrado proteico do BM. Os valores mínimos de solubilidade foram apresentados no pH 4,0 e valores máximos no pH 2 e 10,0, alcançando 90,1 e 86,2 %, respectivamente. A menor solubilidade encontrada foi no pH

4,0, isto é, perto do ponto isoelétrico das proteínas do BM (3,0), enquanto que a solubilidade aumentou tanto em valores de pH maiores e menores. Acima ou abaixo do ponto isoelétrico as proteínas incham e ligam-se mais facilmente a água, em razão do aumento das cargas líquidas e das forças repulsivas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Figura 9 – Solubilidade proteica do concentrado proteico do BM.



Este resultado foi maior que o alcançado para hidrolisados proteicos do BM obtidos por extração enzimática assistida por ultrassom por Yu et al. (2020), onde a solubilidade encontrada em pH 3, foi de 85,6%. Outro estudo relatou o aumento da solubilidade da proteína do BM após a hidrólise enzimática. Celus; Brijs e Delcour (2007) mostraram que a hidrólise enzimática do BM resultou no aumento da solubilidade da proteína, especialmente em uma faixa de pH baixo (2,0 - 4,0).

No caso deste estudo, o aumento da solubilidade no pH 2 e 10,0 também pode ser atribuído a mudanças conformacionais na estrutura da proteína do BM, como o desdobramento de cadeias polipeptídicas e a liberação de agregados solúveis, ocasionados pela sonicação (HIGUERA-BARRAZA et al., 2016).

5.6.2 Propriedades de espuma

As propriedades de formação de espuma são importantes na indústria de alimentos e na formulação de medicamentos. Geralmente, a capacidade de formação de espuma (CFE)

depende da solubilidade e hidrofobicidade da proteína, enquanto a estabilidade da espuma (EE) depende da concentração de proteína, hidratação e interações moleculares (SHENG et al., 2018). A capacidade de formar e estabilizar espumas é uma propriedade funcional importante, principalmente para produtos de confeitaria e panificação como bolos, massas e pães (KUMAR et al., 2014). A CFE do concentrado proteico obtido do BM foi de $42,5 \pm 2,3$ %, e a EE foi de $98,4 \pm 1,6$ %.

Li et al. (2020) estudaram as propriedades funcionais das proteínas do BM após extração assistida por ultrassom. Os autores relataram que sob ciclo de trabalho contínuo do ultrassom, a CFE e EE foram afetadas negativamente, quando comparada a ciclos intervalados. Sob o ciclo de trabalho a 100% ($P = 250$ W e $t = 20$ min), a CFE atingiu $127,28 \pm 3,7$ %, e a EE $99,49 \pm 1,4$ %, e sob o ciclo de trabalho a 80 %, a CFE e EE atingiram $136,4 \pm 1$ % e $118,63 \pm 1,9$ %, respectivamente.

O ultrassom vem sendo implementado e usado como uma nova alternativa para a realização de estudos sobre as propriedades funcionais de proteínas. De acordo com Higuera-Barraza et al. (2016), a aplicação de pulsos ultrassônicos melhora as propriedades de formação de espuma das proteínas devido ao aumento da estabilidade, melhor volume e diminuição do tamanho das partículas. Além disso, diversos fatores podem influenciar as propriedades espumantes das proteínas, como fonte proteica, método de preparação, extração, composição, solubilidade, concentração, pH, temperatura, presença de sais, lipídeos, entre outros. O sinergismo desses fatores pode fazer com que cada proteína atue de uma forma, o que dificulta a generalização e comparação com outros resultados obtidos.

5.6.3 Propriedades emulsificantes

O índice de emulsificação (IE) mede a capacidade da proteína de formar emulsões, enquanto o índice de estabilidade da emulsão (IEE) mede a capacidade da proteína de formar uma emulsão estável dentro de um período de tempo. A Tabela 8 apresenta as propriedades emulsificantes do concentrado proteico para IE e EIE. Pode-se observar que o maior valor de emulsificação foi encontrado no pH 10.

O IE em pH 10 ($72,9 \pm 0,09$ m² g⁻¹) foi maior ao encontrado por Li et al. (2020), que sob condições de 60% de ciclo de trabalho no ultrassom, a uma potência de 250 W e 25 min de tratamento, encontraram $40,44 \pm 1,68$ m² g⁻¹, e EIE em $84,44 \pm 0,88$ %. De acordo com Sullivan, Park e Beevers (2016), o tratamento de ultrassom pode causar uma redução parcial no tamanho da proteína, resultando na exposição de grupos hidrofóbicos e assim permitindo uma absorção

mais rápida da proteína para a interface óleo-água, aumentando as propriedades emulsificantes. Além disso, o pH alcalino promove um aumento nas propriedades emulsionantes devido aos desdobramentos dos polipeptídeos devido às cargas negativas nessa faixa de pH. Como consequência dessa alteração, a repulsão permite uma maior orientação na interface e exposição de resíduos peptídicos hidrofílicos e hidrofóbicos que promovem interações importantes nas propriedades da emulsão.

Tabela 8 – Propriedades emulsificantes do concentrado proteico do BM.

pH	Índice de emulsificação (m² g⁻¹)	Índice de estabilidade da emulsão (%)
2,0	40,2 ± 0,08 ^c	91,2 ± 0,07 ^b
4,0	36,9 ± 1,2 ^d	64,7 ± 0,8 ^d
7,0	62,6 ± 1,1 ^b	91,8 ± 0,9 ^a
10,0	72,9 ± 0,09 ^a	73,8 ± 0,05 ^c

Valores médios ± desvio padrão; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa.

Segundo Latorres et al. (2018), o pH afeta as propriedades emulsionantes, alterando a hidrofobicidade da superfície da proteína e a camada protetora que envolve os glóbulos lipídicos. Os menores valores de emulsificação foram encontrados no pH 4,0, provavelmente porque este pH está próximo ao ponto isoelétrico das proteínas do BM, onde algumas moléculas são precipitadas ou apresentam cargas reduzidas.

5.6.4 Capacidade de retenção de óleo e água

A CRA é uma propriedade funcional importante das proteínas em alimentos viscosos (sopas, assados e produtos de massa); já que esses alimentos podem se ligar à água sem dissolução de proteínas, o que prolonga o espessamento e a viscosidade. Já a CRO é um parâmetro significativo de retenção de sabor em alimentos e também é importante em produtos de panificação, atuando como agentes extensores.

A CRA obtida do concentrado proteico do BM foi ligeiramente maior do que a CRO, sendo $8,89 \pm 0,27$ e $6,56 \pm 0,76$ g g⁻¹, respectivamente. Dabbour (2018) obteve isolado proteico da farinha de girassol através da extração assistida por ultrassom (P = 220 W, t = 15 min) e estudou suas propriedades funcionais. A CRA obtida para o isolado foi de 0,98 g g⁻¹, e a CRO foi 2,06 g g⁻¹. Os resultados encontrados para o concentrado proteico do BM podem ser

explicados por Li et al (2020), pois provavelmente o tratamento com o ultrassom ocasionou a desnaturação parcial e dissociação das proteínas, expondo grupos hidrofílicos que resultou em uma maior interação com as moléculas de água.

5.7 DIGESTIBILIDADE PROTEICA

A digestibilidade proteica do concentrado proteico do BM apresentou um resultado de $86,6 \pm 2,3$ %, indicando ser uma proteína muito interessante para ser aplicada no setor alimentício. A separação das proteínas dos demais componentes do BM facilita a ação de enzimas digestivas, aumentando a sua digestibilidade.

Segundo Vanga; Wang e Raghavan (2020), proteínas vegetais geralmente possuem baixa digestibilidade comparada a proteínas lácteas. Dessa forma, alguns métodos vem sendo empregados com intuito de melhorar essa característica, sendo um deles o ultrassom. No mesmo estudo, eles estudaram o efeito do ultrassom (400 W, 1-16 min) no leite de soja, e avaliaram a digestibilidade proteica e a atividade dos inibidores de tripsina. Os resultados revelaram que a sonicação reduziu significativamente a atividade do inibidor de tripsina em até 52 % e aumentou a digestibilidade das proteínas para do leite de soja para 84%. Alguns estudos relataram que a estrutura secundária das proteínas, incluindo α -hélice e β -folha estão fortemente associadas a digestibilidade proteica. Após o tratamento do ultrassom (16 min), os autores observaram as modificações estruturais das proteínas do leite de soja, e observaram que as estruturas α -hélice foram reduzidas, enquanto que as β -folha aumentaram. O mesmo foi observado por Ochoa-Rivas et al. (2017), que após o tratamento com ultrassom, houve um aumento na digestibilidade da proteína de amendoim, e perdas conformacionais nas estruturas α -hélice, e um aumento nas β -folha.

Um estudo anterior também avaliou as mudanças na estrutura secundária no isolado de proteína de soja devido à ultrassonicação. Eles mostraram que na ultrassonicação de baixa potência (200 W), há uma redução nas α -hélices enquanto as conformações das β -folha aumentam. No entanto, quando a potência foi aumentada para 600 W, há uma reversão resultando em aumento de hélices- α e uma perda rápida nas β -folhas (HU et al., 2013). No entanto, pesquisas adicionais são necessárias para avaliar se o mesmo acontece com as proteínas do BM.

5.8 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A funcionalidade das proteínas é altamente influenciada por suas propriedades térmicas. Portanto, informações sobre mudanças estruturais dessas proteínas durante e após a sonicação podem ser úteis na concepção de sistemas de processamento de alimentos (GHARIBZAHEDI; SMITH, 2020). Para verificar a estabilidade térmica do concentrado proteico do BM foi realizada a análise de DSC, cujos valores estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Propriedades térmicas do concentrado proteico do BM.

Parâmetros	Concentrado proteico do BM
T_i (°C)	121,85
T_p (°C)	130,22
T_e (°C)	143,57
ΔH (J g ⁻¹)	49,63

T_i : Temperatura inicial; T_p : Temperatura de pico; T_e : Temperatura final de desnaturação, ΔH : entalpia de desnaturação.

A entalpia de desnaturação do concentrado proteico do BM apresentou uma entalpia de 49,63 J g⁻¹. O resultado foi próximo ao encontrado por Piotrowicz & Salas-Mellado (2017) para o concentrado proteico do farelo de arroz desengordurado obtido da indústria, que foi de 49,25 J g⁻¹, que por ter passado por um processo com uso de pressão e altas temperaturas para remoção do óleo, ocasionou uma maior quantidade de proteínas desnaturadas, aumentando a estabilidade térmica em comparação ao concentrado proteico obtido do farelo de arroz desengordurado em laboratório (39,26 J g⁻¹), utilizando um processo mais brando. O mesmo pode ter acontecido ao concentrado proteico do BM, que ao ter passado pela sonicação, que produziu efeito de cavitação e forças de cisalhamento, pode ter desnaturado algumas proteínas.

A desnaturação está associada com o rompimento de ligações intramoleculares, causado pela absorção de energia (processo endotérmico). Mudanças nas entalpias de desnaturação podem estar associadas com mudanças nas forças de ligação entre as moléculas. O estado conformacional em que as proteínas possuem forças de ligação mais fracas, requerem menos energia para se desdobrar, e como consequência uma redução na entalpia pode ser observada (FRYDENBERG et al., 2016). O valor da T_d permite que se estabeleça a temperatura final do processo térmico (cozimento), todavia, as mudanças entálpicas (ΔH) são conhecidas e

utilizadas nos cálculos de transferência de calor do produto durante o processamento térmico na indústria alimentícia (ARNTFIELD; MURRAY, 1981; JOHNSON, 2013).

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi realizada a obtenção do concentrado proteico do BM através da extração assistida por ultrassom, seguido do método de precipitação no ponto isoelétrico, e para isso o ponto isoelétrico foi determinado em pH 3,0.

A melhor condição de extração proteica assistida por ultrassom foi determinada através de um planejamento experimental DCC 2³, sendo estes, tempo de 10 min, potência de 550 W e razão sólido:solvente de 1:45 (p/v). A hipótese que o ultrassom facilitaria a extração de proteínas pelo rompimento da estrutura fibrosa do BM corrobora com as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

Além de ter facilitado a extração de proteínas do BM, o ultrassom melhorou algumas propriedades funcionais do concentrado proteico, alcançando 90,1 % e 86,2 % de solubilidade em pH 2 e 10, respectivamente. Além disso, obteve-se um índice de emulsificação em pH 10 de 72,9 m² g⁻¹. O CRA foi maior que o CRO, indicando que a sonicação pode ter ocasionado uma desnaturação parcial de proteínas, o que facilitou uma maior interação com moléculas da água do que do óleo. Já as propriedades espumantes foram influenciadas negativamente pela aplicação da sonicação. As propriedades funcionais obtidas indicam que o concentrado proteico do BM é uma ótima opção para ser usado em produtos alimentícios.

A digestibilidade proteica apresentou 86,6%, indicando ser uma ótima fonte de proteína vegetal para alimentação humana, devido ao seu elevado valor encontrado. Também apresentou uma entalpia de 49,63 J g⁻¹.

Este estudo forneceu informações de como o pré-tratamento do BM com ultrassom pode melhorar a extração proteica, em um curto período de tempo, além de melhorar as propriedades funcionais do concentrado proteico, oferecendo uma fonte alternativa de proteína vegetal à indústria de alimentos.

7 RESÍDUOS GERADOS

Todos os resíduos gerados foram descartados de acordo com as normas ambientais da Universidade.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Analisar a composição de aminoácidos do concentrado proteico.

Aplicar o concentrado em produtos alimentícios, para avaliação das suas propriedades funcionais nos alimentos, bem como a análise sensorial desses produtos.

Estudar o resíduo insolúvel e fibroso remanescente da extração das proteínas do BM, como fonte de material lignocelulósico, podendo ser utilizado em processos fermentativos e também como material adsorvente de contaminantes.

Estudar a viabilidade de aplicar o processo da extração assistida por ultrassom em escala industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. **Official methods of analysis**, 17 ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2000.
- AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A. Pepsin Pancreatin Digest Index of Protein Quality Evaluation. **The Journal of Nutrition**. [S. l.], v. 83, n. 64, p. 257-261, 1964.
- ARAUZO, P. J.; DU, L.; OLSZEWSKI, M. P.; ZAVALA, M. F. M.; ALHNIDI, M. J.; KRUSE, A. Effect of protein during hydrothermal carbonization of brewer's spent grain. **Bioresource Technology**. Stuttgart, v. 293, julho, 2019.
- ARNTFIELD, S. D.; MURRAY, E. D. The influence of processing parameters on food protein functionality I. Differential Scanning Calorimetry as an Indicator of Protein Denaturation. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 289–294. 1981.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, [S.l., v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007.
- BARBUT, S. Determining water and fat holding. **Methods of Testing Protein Functionality**. [S.l.], London: Chapman & Hall, 1996, p. 265.
- BEUCHAT, L. R. Functional and eletrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S. l.], v.25, n. 2, p. 258-261, 1977.
- BLANDINO, A.; AL-ASEERI, M. E.; PANDIELLA, S. S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research International**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 527–543, 2003.
- BOHRER, B. M. An investigation of the formulation and nutritional composition of modern meat analogue products. **Food Science and Human Wellness**, v. 8, n. 4, p. 320-329, 2019.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. [S.l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CELUS, I.; BRIJS, K.; DELCOUR, J. A. Enzymatic hydrolysis of Brewer's spent grain proteins and technofunctional properties of the resulting hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 55, n. 21, p. 8703–8710, 2007.
- CONNOLLY, A.; PIGGOTT, C. O.; FITZGERALD, R. J. Characterisation of protein-rich isolates and antioxidative phenolic extracts from pale and black brewers' spent grain. **International Journal of Food Science and Technology**, Irlanda, v. 48, n. 8, p. 1670–1681, 2013.
- CONTRERAS, M. M.; LAMA-MUÑOZ, A.; GUTIÉRREZ-PÉREZ, M. J.; ESPÍNOLA, F.; MOYA, M.; CASTRO, E. Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 280, p. 459–477, 2019.

- CONWAY, J. **Beer production worldwide from 1998 to 2019 (in billion hectoliters)**. [S. l.], v. 2019, n. 212, p. 1–2, 2021. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>
- DABBOUR, M. Optimization of ultrasound assisted extraction of protein from sunflower meal and its physicochemical and functional properties. **Journal of Food Process Engineering**, [S. l.], v. 41, n. 9, p. 1–11, 2018.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. São Paulo: Editora Artmed, 2010.
- ERVIN, V.; ALII, I.; SMITH, J. P.; LI, Z. Extraction and Precipitation of Proteins From Brewer's Spent Grain. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, Canadá, v. 22, n. 1979, p. 216–221, 198
- FALLIS, A. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**. [S. l.]: Springer. v. 53, n. 9, 2009.
- FLORES-JIMÉNEZ, N. T.; ULLOA, J. A.; SILVAS, J. E. U.; RAMÍREZ, J. C. R.; ULLOA, P. R.; ROSALES, P. U. B.; CARRILLO, Y. S.; LEYVA, R. G. Effect of high-intensity ultrasound on the compositional, physicochemical, biochemical, functional and structural properties of canola (*Brassica napus* L.) protein isolate. **Food Research International**, [S. l.], v. 121, p. 947–956, 2019.
- FRYDENBERG, R. P.; HAMMERSHØJ, M.; ANDERSEN, U.; GREVE, M. T.; WIKING, L. Protein denaturation of whey protein isolates (WPIs) induced by high intensity ultrasound during heat gelation. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 192, p. 415–423, 2016.
- GERON, L.J.V.; ZEOULA, L.M.; ERKEL, J.A.; PRADO, I. N.; JONKER, R. C.; GUIMARÃES, K. C. Coeficiente de digestibilidade e características ruminais de bovinos alimentados com rações contendo resíduo de cervejaria fermentado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S. l.], v.37, n.9, p.1685-1695, 2008.
- GHARIBZAHEDI, S. M. T.; SMITH, B. The functional modification of legume proteins by ultrasonication: A review. **Trends in Food Science and Technology**. [S. l.], v. 98, p. 107–116, 2020.
- GÖRGÜÇ, A.; BIRCAN, C.; YILMAZ, F. M. Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound- assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. **Food Chemistry**. [S. l.], v. 283, p. 637-645, 2019.
- GUIDO, L. F.; MOREIRA, M. M. Techniques for Extraction of Brewer's Spent Grain Polyphenols: a Review. **Food and Bioprocess Technology**, Portugal, v. 10, n. 7, p. 1192–1209, 2017.
- GUPTA, M.; ABU-GHANNAM, N.; GALLAGHAR, E. Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 318–328, 2010.

HE, Y.; KUHN, D. D.; OGEJO, J. A.; O'KEEFE, S. F.; FRAGUAS, C. F.; WIERSEMA, B. D.; JIN, Q.; YU, D.; HUANG, H. Wet fractionation process to produce high protein and high fiber products from brewer's spent grain. **Food and Bioproducts Processing**, Blacksburg, v. 117, p. 266–274, 2019.

HEREDIA-SANDOVAL, N. G.; GRANADOS-NEVÁREZ, M. D. C.; CALDERÓN DE LA BARCA, A. M.; VÁSQUEZ-LARA, F.; MALUNGA, L. N.; APEA-BAH, F. B.; BETA, T.; ISLAS-RUBIO, A. R. Phenolic Acids, Antioxidant Capacity, and Estimated Glycemic Index of Cookies Added with Brewer's Spent Grain. **Plant Foods for Human Nutrition**, [S. l.], v. 75, p. 41-47, 2019.

HIGUERA-BARRAZA, O. A.; DEL TORO-SANCHEZ, C. L.; RUIZ-CRUZ, S.; MÁRQUEZ-RÍOS, E. Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 31, p. 558–562, 2016.

HOUDE, M.; KHODAEI, N.; BENKERROUM, N.; KARBOUNE, S. Barley protein concentrates: extraction, structural and functional properties. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 254, p. 367-376, 2018.

HUANG, Y. W.; JIAN, Z. H.; CHANG, H. C.; NFOR, O. N.; KO, P. C., LUNG; C. C., LIAW. Vegan diet and blood lipid profiles: A cross-sectional study of pre- and post-menopausal women. **BMC Women's Health**, [S. l.], v. 14, p. 55-62, 2014.

HU, F. B. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: And overview. **American Journal of Clinical Nutrition**. [S. l.], v. 78, p. 544S-551, 2003.

HU, H.; WU, J.; LI-CHAN, E. C. Y.; ZHU, L. ZHANG, F.; XU, X.; FAN, G.; WANG, L.; HUANG, X.; PAN, S. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. **Food Hydrocolloids**. [S. l.], v. 30, n. 2, p. 647–655, 2013.

IBBETT, R.; WHITE, R.; TUCKER, G.; FOSTER, T.. Hydro-mechanical processing of brewer's spent grain as a novel route for separation of protein products with differentiated techno-functional properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Reino Unido, v. 56, p. 102184, junho, 2019.

IKRAM, S.; HUANG, L. Y.; ZHANG, H.; WANG, J.; YIN, M.. Composition and Nutrient Value Proposition of Brewer's Spent Grain. **Journal of Food Science**, China, v. 82, n. 10, p. 2232–2242, 2017.

JACOMETTI, G. A.; MELLO, L. R. P. F.; NASCIMENTO, P. H. A.; SUEIRO, A. S., YAMASHITA, F.; MALI, S. The physicochemical properties of fibrous residues from the agro Industry. **LWT—Food Science and Technology**, [S. l.], v. 62, p. 138-143, 2015.

JOHNSON, C. M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 531, n. 1-2, p. 100–109, 2013.

KADAM, S. U.; TIWARI, B. K.; ÁLVAREZ, C.; O'DONNELL, C. P. Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. **Trends in Food Science and Technology**. [S. l.], v. 46, n. 1, p. 60–67, 2015.

KANAUCHI, O.; MITSUYAMA, K.; ARAKI, Y. Development of a functional germinated barley foodstuff from brewer's spent grain for the treatment of ulcerative colitis. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, [S. l.], v. 59, p. 59-62, 2001.

KINSELLA, A. J. E. Functional Properties of Soy Proteins. **Journal of the American Oil Chemist's Society**. v. 56, 1979.

KOTLAR, C. E.; PONCE, A. G.; ROURA, S. I. Improvement of functional and antimicrobial properties of brewery byproduct hydrolysed enzymatically. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 378–385, 2013.

KTENIOUDAKI, A.; CROFTON, E.; SCANNELL, A. G. M.; HANNON, J. A.; KILCAWLEY, K. N.; GALLAGHER, E. Sensory properties and aromatic composition of baked snacks containing brewer's spent grain. **Journal of Cereal Science**, [S. l.], v. 57, n. 3, p. 384-390, 2013.

KTENIOUDAKI, A.; O'SHEA, N.; & GALLAGHER, E. Rheological properties of wheat dough supplemented with functional by-products of food processing: Brewer's spent grain and apple pomace. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 116, n. 2, p. 362–368, 2013.

KUMAR, M.; TOMAR, M.; POTKULE, J.; VERMA, R.; PUNIA, S.; MAHAPATRA, A.; BELWAL, T.; DAHUJA, A.; JOSHI, S.; BERWAL, M. K.; SATANKAR, V.; BHOITE, A. G.; AMAROWICZ, R.; KAUR, C.; KENNEDY, J. F. Advances in the plant protein extraction : Mechanism and recommendations. **Food Hydrocolloids**. [S. l.], v. 115, p. 106595, 2021.

LAFARGA, T.; ÁLVAREZ, C.; BOBO, G.; AGUILÓ-AGUAYO, I. Characterization of functional properties of proteins from Ganxet beans (*Phaseolus vulgaris* L. var. Ganxet) isolated using an ultrasound-assisted methodology. **LWT – Food Science and Technology**. [S. l.], v. 98, p. 106-112, 2018.

LATORRES, J. M.; RIOS, D. G.; SAGGIOMO, G.; WASIELESKY, W.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Food Science and Technology**, Brasil, v. 55, n. 2, p. 721–729, 2018.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LI, W.; YANG, H.; EMILIA, T.; ZHAO, H. Modification of structural and functional characteristics of brewer's spent grain protein by ultrasound assisted extraction. **LWT - Food Science and Technology**, China, v. 139, p. 110582, 2020.

LIN, C. S.; ZAYAS, J. F. Functionality of deffated corn germ proteins in a model system: fat binding capacity and water remotion. **Journal of Food Science**. v. 52, n. 5, p. 1308-1311, 1987.

LIU, Y.; LI, X.; CHEN, Z.; YU, J.; WANG., F.; WANG, J. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food Chemistry**. [S. l.], v.151, p. 459-465, 2014.

LYNCH, K. M.; STEFFEN, E. J.; ARENDT, E. K. Brewer's spent grain: a review with an emphasis on food and health. **Journal of the Institute of Brewing**, Irlanda, v. 122, n. 4, p. 553–568, 2016.

MACLEOD, A. M. The Physiology of Malting - a Review. **Journal of the Institute of Brewing**, Edimburgo, v. 73, n. 2, p. 146–162, 1967.

MATHIAS, T. R. D. S.; MELLO, P. P. M. D.; SÉRVULO, E. F. C. Solid wastes in brewing process: A review. **Journal of Brewing and Distilling**, Brasil, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2014.

MILLER, R.; GRONINGER, S. Functional Properties of Enzyme-Modified Acylated Fish Protein Derivatives. **Journal of Food Science**. [S. l.], v. 41, p. 268-272, 1976.

MUSSATTO, S. I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Portugal, v. 94, n. 7, novembro, 2014.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewer's spent grain : generation , characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, Brasil, v. 43, p. 1–14, 2006.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Portugal, v. 85, n. 14, p. 2453-2460, 2005.

NADATHUR, S. R.; WANASUNDARA, J. P. D.; SCANLIN, L. Proteins in the Diet: Challenges in Feeding the Global Population. **Sustainable Protein Sources**. [S. l.]: Elsevier Inc., p. 1-19, 2017.

NAOZUKA, K.; OLIVEIRA, P. V. Cu, Fe, Mn and Zn distribution in protein fractions of Brazil-nut, cupuassu seed and coconut pulp by solid-liquid extraction and electrothermal atomic adsorption spectrometry. **Journal of the Brazillian Chemical Society**. [S. l.], v. 18, n. 8, p. 1547-1553, 2007.

NIEMI, P.; MARTINS, D.; BUCHERT, J.; FAULDS, C. B. Pre-hydrolysis with carbohydrases facilitates the release of protein from brewer's spent grain. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 136, p. 529–534, 2013.

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

O'CONNEL, J. E.; FLYNN, C. The manufacture and application of casein-derived ingredients. **Handbook of Food Products Manufacturing**. New Jersey: John Wiley & sons: [s.n.], p. 557-593, 2007)

OCHOA-RIVAS, A.; NAVA-VALDEZ, Y.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; CHUCK-HERNÁNDEZ, C. Microwave and Ultrasound to Enhance Protein Extraction from Peanut Flour under Alkaline Conditions: Effects in Yield and Functional Properties of Protein Isolates. **Food and Bioprocess Technology**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 543–555, 2017.

OMURA, M. H.; OLIVEIRA, A. P. H.; SOARES, L. S.; COIMBRA, J. S. R.; BARROS, F. A. R.; VIDIGAL, M. C. T. R.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; OLIVEIRA, E. B.. Effects of protein concentration during ultrasonic processing on physicochemical properties and techno-functionality of plant food proteins. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 113, p. 106457, 2021.

ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed: [S.n], 2005.

O'SULLIVAN, J.; ARELLANO, M.; PICHOT, R.; NORTON, I. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of dairy proteins. **Food Hydrocolloids**. v. 42, p. 386-396, 2014.

ÖZTÜRK, S.; ÖZBOY, Ö.; CAVIDOĞLU, I.; KÖKSEL, H. Effects of brewer's spent grain on the quality and dietary fibre content of cookies. **Journal of the Institute of Brewing**, Turquia, v. 108, n. 1, p. 23–27, 2002.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S. l.], v. 26, n. 3, p. 716-723, 1978.

PIOTROWICZ, I. B. B.; SALAS-MELLADO, M. M. Protein concentrates from defatted rice bran: Preparation and characterization. **Food Science and Technology**. [S. l.], v. 37, p. 165-172. 2017.

POJI, M.; MI, A.; TIWARI, B. Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. **Trends in Food Science and Technology**. [S. l.], v. 75, p. 93–104, março, 2018.

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

REES CLAYTON, E. M.; SPECHT, E. A.; WELCH, D. R.; BERKE, A. P. **Addressing Global Protein Demand Through Diversification and Innovation: An Introduction to Plant-Based and Clean Meat**. Encyclopedia of Food Chemistry. Estados Unidos: The Good Food Institute: Elsevier, 2019.

ROMMI, K.; NIEMI, P.; KEMPPAINEN, K.; KRUIUS, K. Impact of thermochemical pretreatment and carbohydrate and protein hydrolyzing enzyme treatment on fractionation of protein and lignin from brewer's spent grain. **Journal of Cereal Science**, [S. l.], v. 79, p. 168–173, 2018.

SALGADO, P. R.; DRAGO, S. R.; ORTIZ, S. M. E.; PETRUCCELLI, S.; ANDRICH, O.; GONZÁLEZ, R. J.; MAURI, A. N. Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. **LWT - Food Science and Technology**. [S. l.], v. 45, n. 1, p. 65–72, 2012.

SANTOS, M.; JIMÉNEZ, J. J.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; DEL NOZAL, M. J. Variability of brewer's spent grain within a brewery. **Food Chemistry**, Espanha, v. 80, n. 1, p. 17–21, 2003.

SARAIVA, B. R.; AGUSTINHO, B. C.; VITAL, A. C. P.; STAUB, L.; PINTRO, P. T. M.. Effect of brewing waste (malt bagasse) addition on the physicochemical properties of hamburgers. **Journal of Food Processing and Preservation**, Brasil, p. 1–9, junho, 2019.

SARAIVA, B. R.; ANJO, F. A.; VITAL, A. C. P.; SILVA, L. H. M. D.; OGAWA, C. Y. L.; SATO, F.; COIMBRA, L. B.; MATUMOTO-PINTRO, P. T. Waste from brewing (trub) as a source of protein for the food industry. **International Journal of Food Science and Technology**, Brasil, v. 54, n. 4, p. 1247–1255, 2019. b.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Editora-Livraria Varela: [s.n.], 1996.

SHENG, L.; WANG, Y.; CHEN, J.; ZOU, J.; WANG, Q.; MA, M. Influence of high-intensity ultrasound on foaming and structural properties of egg white. **Food Research International**, [S. l.], v. 108, p. 604–610, 2018.

SLIZYTE, R.; ROMMI, K.; MOZURAITYTE, R.; ECK, P.; FIVE, K.; RUSTAD, T. Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. **Biotechnology Reports**, [S. l.], v. 11, p. 99–109, 2016.

STEINER, J.; PROCOPIO, S.; BECKER, T. Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. **European Food Research and Technology**, Alemanha, v. 241, n. 3, p. 303–315, 2015.

STOJCESKA, V.; AINSWORTH, P. The effect of different enzymes on the quality of high-fibre enriched brewer's spent grain breads. **Food Chemistry**, Reino Unido, v. 110, n. 4, p. 865–872, 2008.

SULLIVAN, J. O.; PARK, M.; BEEVERS, J. The effect of ultrasound upon the physicochemical and emulsifying properties of wheat and soy protein isolates. **Journal of Cereal Science**, [S. l.], v. 69, p. 77–84, 2016.

TANG, D. S.; TIAN, Y. J.; HE, Y. Z.; LI, L.; HU, S. Q.; LI, B. Optimisation of ultrasonic-assisted protein extraction from brewer's spent grain. **Czech Journal of Food Sciences**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 9–17, 2010.

TANG, D. S.; YIN, G. M.; HE, Y. Z.; HU, S. Q.; LI, B.; LI, L.; LIANG, H. L.; BORTHAKUR, D. Recovery of protein from brewer's spent grain by ultrafiltration. **Biochemical Engineering Journal**, China, v. 48, n. 1, p. 1–5, 2009.

TÉLLEZ-MORALES, J. A.; HERNÁNDEZ-SANTO, B.; RODRÍGUEZ-MIRANDA, J. Effect of ultrasound on the techno-functional properties of food components/ingredients: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], p. 104787, 2019.

VANGA, S. K.; WANG, J.; RAGHAVAN, V. Effect of ultrasound and microwave processing on the structure, in-vitro digestibility and trypsin inhibitor activity of soymilk proteins. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 131, p. 109708, 2020.

WATERS, D. M.; JACOB, F.; TITZE, J.; ARENDT, E. K.; ZANNINI, E. Fibre, protein and

mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment. **European Food Research and Technology**, [S. l.], v. 235, n. 5, p. 767–778, 2012.

WILDING, P. Functional properties of protein in foods. **Journal of Chemical**, n. April, p. 182-189, 1984.

XIROS, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Biotechnological potential of brewer's spent grain and its recent applications. **Waste and Biomass Valorization**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 213–232, 2012.

YU, D.; SUN, Y.; WANG, W.; O'KEEFE, S. F.; NEILSON, A. P.; FENG, H.; WANG, Z.; HUANG, H. Recovery of protein hydrolysates from brewer's spent grain using enzyme and ultrasonication. **International Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 357–368, 2020.

ZHANG, C.; SANDERS, J. P. M.; BRUINS, M. E. Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 67, n. 0, p. 466–472, 2014.

ZHANG, Y.; WANG, B.; ZHANG, W.; XU, W.; HU, Z. Effects and mechanism of dilute acid soaking with ultrasound pretreatment on rice bran protein extraction. **Journal of Cereal Science**. [S. l.], v. 87, p. 318–324, 2019.