



---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

**Ingrid da Costa Maia**

**EXTRAÇÃO NÃO-CONVENCIONAL E NANOENCAPSULAÇÃO DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS DE BAGAÇO DE MALTE FERMENTADO  
E COPRODUÇÃO DE ADSORVENTES**

Rio de Janeiro

2024

Ingrid da Costa Maia

**EXTRAÇÃO NÃO-CONVENCIONAL E NANOENCAPSULAÇÃO DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS DE BAGAÇO DE MALTE FERMENTADO  
E COPRODUÇÃO DE ADSORVENTES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
como requisito parcial para obtenção do título de  
Doutora em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Larraz Ferreira  
Coorientadoras: Profa. Dra. Juliana Furtado Dias  
Profa. Dra. Elisa D. C. Cavalcanti

Rio de Janeiro

2024

## Catalogação informatizada pelo(a) autor(a)

dM217e da Costa Maia, Ingrid  
EXTRAÇÃO NÃO-CONVENCIONAL E NANOENCAPSULAÇÃO DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS DE BAGAÇO DE MALTE FERMENTADO E  
COPRODUÇÃO DE ADSORVENTES / Ingrid da Costa Maia. -- Rio  
de Janeiro : UNIRIO, 2024.  
100  
Orientadora: Mariana Simões Larraz Ferreira .  
Coorientadora: Juliana Furtado Dias.  
Coorientadora: Elisa d'Avila Costa Cavalcanti.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Estado do  
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e  
Nutrição, 2024.  
1. Fermentação. 2. Extração não-convenional. 3.  
Encapsulação. I. Simões Larraz Ferreira , Mariana, orient.  
II. Furtado Dias, Juliana, coorient. III. d'Avila Costa  
Cavalcanti, Elisa, coorient. IV. Título.

Ingrid da Costa Maia

# **EXTRAÇÃO NÃO-CONVENCIONAL E NANOENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE BAGAÇO DE MALTE FERMENTADO E COPRODUÇÃO DE ADSORVENTES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## **BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** MARIANA SIMÕES LARRAZ FERREIRA  
Data: 14/01/2025 14:19:11-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira – UNIRIO

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** MARIA GABRIELA BELLO KOBILITZ  
Data: 13/01/2025 09:06:17-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Maria Gabriela Bello Koblitz – UNIRIO

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** SUELLEN GOMES MOREIRA  
Data: 06/01/2025 22:33:24-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Suellen Gomes Moreira – IFRJ

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** PRISCILLA VANESSA FINOTELLI  
Data: 09/01/2025 18:33:08-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Priscila Vanessa Finotelli – UFRJ

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** CAROLINA BERES  
Data: 10/01/2025 18:42:20-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Carolina Beres – UERJ

Dedico este trabalho aos meus pais Dora e  
Admir (*in memoriam*), Guilherme, Wellington,  
Mônica e Fernando, os amores da minha vida!

## **AGRADECIMENTOS**

Meus agradecimentos serão reduzidos a uma folha, pois os farei pessoalmente, se fossem só aqui, preencheriam as quase 100 folhas da minha tese.

Agradeço às agências de fomento FAPERJ e CNPq, por financiarem este projeto e pela bolsa de doutorado. Agradeço à querida UNIRIO por me acolher como aluna e ao PPGAN pela oportunidade de fazer parte deste Programa.

Gratidão infinita pelas minhas orientadoras, à querida Mariana Ferreira por ser essa pessoa tão especial e por ter orientado com toda competência e carinho, e à Juliana Dias e Elisa Cavalcanti por toda gentileza na coorientação.

À Denise Freire e Elisa Cavalcanti minha gratidão por permitir que eu utilizasse o banco de microrganismos e a estrutura do LaBiM (UFRJ) para iniciar a minha fermentação, assim como à cervejaria Brewpoint pelos bagaços cedidos.

Agradeço aos professores e pós-docs da UFSC que me acolheram, às equipes do LATESC, LCP, LabMAC e todos os outros alunos que viraram minha família na minha estadia por Floripa.

Agradeço a minha família, que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas, a minha querida mãe Dora que se preocupou com a minha saúde acima de qualquer coisa, ao meu amado pai Admir que está em outro plano espiritual com certeza torcendo por mim, ao meu irmão Wellington, cunhada Mônica e sobrinho Guilherme, que me encheram de amor quando eu mais precisei. Ao meu namorado Fernando que aturou meu mau humor e que sempre me disse “calma, tudo vai dar certo” nos períodos mais difíceis. A todos os meus familiares e amigos que vibram com minhas vitórias.

Muito obrigada também a equipe tão querida da Los Paderos, por fazer parte da minha vida. E aí veio a parte de falar do LABBIO- UNIRIO, me acolheram com café fresquinho, papo para desestressar e muitos helps na bancada, sou infinitamente grata por essa equipe, que hoje são meus amigos do coração. A pesquisa nos faz família, e tenho muito orgulho de estar com vocês! Obrigada à querida amiga Roberta, por ser minha dupla imbatível, e aos ICs que passaram pela minha coorientação, principalmente Matheus e Estelinha, que estão no meu coração.  
Uma folha não é suficiente, e nunca será, muitas folhas ainda virão, pois o mundo tem sido absurdamente generoso comigo, e não posso nunca deixar de agradecer!

"Aprendi com as primaveras a deixar-me cortar e a voltar sempre inteira"

**Cecília Meireles**

## RESUMO

O bagaço de malte (BM) é o principal subproduto da fabricação de cerveja, composto principalmente por restos de grãos de cevada. É um subproduto lignocelulósico que possui uma rica composição de compostos bioativos e representa uma fonte potencial de ingredientes funcionais. Há evidências da valorização do BM usando técnicas de fermentação em estado sólido (FES), e novas técnicas para recuperação desses compostos de interesse têm sido buscadas, tais como as extrações não-convencionais, como líquido pressurizado (PLE) e extração assistida por micro-ondas (MAE) que são consideradas mais sustentáveis. A nanoencapsulação é uma tecnologia promissora utilizada para incorporar os extratos obtidos em alimentos e proteger por meio de uma barreira física os compostos bioativos encapsulados. Este estudo teve como objetivo aplicar FES em BM, extrair e encapsular compostos fenólicos do bagaço fermentado, por meio de técnicas de extração não-convencionais, e avaliar a aplicação do material remanescente como material adsorvente para tratamento de água. BM do tipo Pilsen foi fermentado com *Aspergillus oryzae* (NRRL 32657) por 7 dias. Técnicas de PLE e MAE foram usadas para obter extratos ricos em compostos fenólicos de BM fermentado ou não, que foram quantificados por análise dirigida por UHPLC-PDA-MS. Os extratos foram então encapsulados com cera de carnaúba por simples e dupla nanoemulsão através da técnica de fusão/emulsificação. A FES por 2 dias foi suficiente para promover a liberação de compostos antioxidantes. As extrações por PLE e MAE foram eficientes, principalmente em altas temperaturas (130 °C e 150 °C). A FES promoveu o aumento do teor de ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico em 4 vezes com relação ao controle não fermentado, enquanto a PLE a 150 °C aumentou em cerca de 12 vezes. As emulsões, tanto simples quanto dupla, apresentaram uma eficiência máxima de encapsulação de 35% e os ensaios demonstraram boa estabilidade. O tamanho médio da partícula foi de 250 nm e a média do índice de polidispersão foi de 0,15 ao longo de pelo menos 50 semanas. O resíduo pós extração do BM não fermentado apresentou uma remoção de azul de metileno de 79%, demonstraram um potencial para adsorção de contaminantes, podendo ser aplicados em tratamento de efluentes industriais. Os resultados obtidos nesse trabalho são importantes pois contribuem para a valorização do BM no contexto da economia circular, principalmente devido ao seu potencial de uso como ingrediente funcional, fonte de compostos bioativos, podendo ser utilizados na indústria alimentícia, nutracêutica e farmacêutica.

**Palavras-chave:** Compostos bioativos; líquidos pressurizados; micro-ondas; nanoencapsulação; adsorvente.

## ABSTRACT

Brewers spent grain (BSG) is the main byproduct of beer production, composed mainly of barley grain residues. It is a lignocellulosic byproduct that has a rich composition of bioactive compounds and represents a potential source of functional ingredients. There is evidence of the valorization of BSG using solid-state fermentation (SSF) techniques, and new techniques for the recovery of these compounds of interest have been sought, such as unconventional extractions, pressurized liquid extraction (PLE) and microwave-assisted extraction (MAE), which are considered more sustainable. Nanoencapsulation is a promising technology used to incorporate the obtained extracts into foods and protect the encapsulated bioactive compounds through a physical barrier. This study aimed to apply SSF to BSG, to extract and to encapsulate phenolic compounds from fermented BSG, through unconventional extraction techniques, and to evaluate the application of the remaining material as an adsorbent material for water treatment. Pilsen-type BSG was fermented with *Aspergillus oryzae* (NRRL 32657) for 7 days. PLE and MAE techniques were used to obtain extracts rich in phenolic compounds from fermented or unfermented BSG, which were quantified by UHPLC-PDA-MS-directed analysis. The extracts were then encapsulated with carnauba wax by single and double nanoemulsion through the melt dispersion technique. SSF for 2 days was sufficient to promote the release of antioxidant compounds. PLE and MAE extractions were efficient, mainly at high temperatures (130 °C and 150 °C). SSF promoted an increase in the content of ferulic acid and *p*-coumaric acid by 4 times compared to the unfermented control, while PLE at 150 °C increased it by approximately 12 times. The emulsions, both single and double, showed a maximum encapsulation efficiency of 35% and the tests demonstrated good stability. The average particle size was 250 nm and the average polydispersity index was 0.15 over at least 50 weeks. The post-extraction residue of the unfermented BSG showed a methylene blue removal of 79%, demonstrated potential for adsorption of contaminants, and can be applied in the treatment of industrial effluents. The results obtained in this work are important because they contribute to the valorization of BSG in the context of the circular economy, mainly due to its potential use as a functional ingredient, a source of bioactive compounds, which can be used in the food, nutraceutical and pharmaceutical industries.

**Keywords:** Bioactive compounds; pressurized liquids; microwave; nanoencapsulation; adsorbent.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### **Capítulo 1**

Figura 1. Fluxograma da organização da tese. ....	11
Figura 2. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) segundo a Agenda da Organização das Nações Unidas (ONU) para 2030. ....	14
Figura 3. Como reduzir o impacto do desperdício de alimentos no meio ambiente, adaptado de EPA (Wasted Food Scale US EPA - United States Environmental Protection Agency). ....	15
Figura 4. Total da produção de cerveja declarada por região (MAPA, 2024). ....	16
Figura 5. Bagaço de malte seco do tipo Pilsen. Fonte: autoria própria. ....	17
Figura 6. Representações da estrutura da parede celular primária do material vegetal e ligação cruzada entre componentes estruturais e compostos fenólicos. (A) celulose. (B) Hemicelulose. (C) proteínas estruturais. (D) pectina. (E) Ácidos fenólicos. (F) ) (Acosta-Estrada et al., 2014). ....	19

Figura 8. Algumas das implicações mais importantes alcançadas por técnicas não-convencionais de extração (Gil-Martín et al., 2022). ....	24
Figura 9: Equipamento desenvolvido para extração por líquidos pressurizados (LATESC/UFSC). Fonte: autoria própria. ....	25

### **Capítulo 2**

Figure. 1. Fermentation kinetics. (A) Reducing compounds (Folin-Ciocalteu) and (B) antioxidant capacity (DPPH). Values are mean ± standard deviation (n=3). Different letters mean a significant difference ( $p < 0.05$ ). ....	41
Figure 2. Antioxidant capacity (DPPH) expressed as $\mu\text{mol}$ Trolox equivalent (TE) in relation to the extract (A) and in relation to BSG (B). Results are expressed as mean ± SD (n=3). C: control; PLE: pressurized liquid extraction; MAE: microwave-assisted extraction; F: fermented. Different lowercase letters mean a statistically significance ( $p < 0.05$ ) between PLE extracts and capital letters between MAE extracts, and * compares C samples. ....	42
Figure 3. Reducing capacity of Folin-Ciocalteu expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) in relation to the extract (A) and in relation to BSG (B). Different letters mean a significant difference ( $p < 0.05$ ). C: control; PLE: pressurized liquid extraction; MAE: microwave-assisted extraction; F: fermented. The values 130 and 150 correspond to the extraction temperature in °C.....	44

Figure 4. TEM micrographs of nanostructured lipid carriers containing unfermented brewers spent grain extracts, prepared using (a-c) melt dispersion technique and (d-f) the double emulsion/ melt dispersion technique ..... 50

Figure 5. Values of average particle diameter ( $D_p$ ) and polydispersity index (PDI) over time for NLCs obtained by simple emulsion (SE). Values represent the average of duplicate experiments. N – non-fermented extract; F – fermented extract ..... 51

Figure S1. DSC curve of carnauba raw wax ..... 53

Figure S2. Extract yield with pressurized liquid and microwave-assisted extraction. BSG: Brewers spent grain; C: control; PLE: pressurized liquid extraction; MAE: microwave assisted extraction; F: fermented ..... 54

Figure S3: Chromatogram (a), UV spectrum (b) and mass spectrum of 3,7-dimethylquercetin (potential identification) ..... 54

### Capítulo 3

Figure 1. Samples that were tested as adsorbents and the processes they underwent ..... 60

Figure 2. ATR-FTIR spectra. In red: in natura samples; in gray: biochar; in blue, samples after the adsorption experiment with methylene blue. BSG: brewers spent grain; F: fermented; PER: post extraction residue; BC1-BC4: respective biochars; MB: after ..... 64

Figure 3. Methylene blue removal (bars) and adsorption capacity (line) using BSG sample and its derivations (A) and pH influence in MB removal percentage (B). BSG: Brewers Spent Grain; F: fermented; PER: post-extraction residue; BC: biochar;  $q$ : adsorption capacity ..... 67

Figure 4. Experimental data for methylene blue adsorption equilibrium (squares) with pos extraction residue (A) and biochar (B). The lines are adjustments of the Langmuir (continuous lines) and Freundlich (dashed lines) models.  $q$ : adsorption capacity;  $C_{eq}$ : equilibrium concentration ..... 68

Figure 5. Fit of kinetic data to pseudo-first and pseudo-second-order models. Experimental data (squares) with A) pos extraction residue (PER) and B) biochar (BC3). The lines are adjustments of the pseudo-first-order (continuous lines) and pseudo-second-order ..... 70

Figure 6. Spectrophotometric analysis of methylene blue solutions after adsorption (A) and 0.1 M hydrochloric acid solutions after desorption (B). MB: methylene blue solution; C1, C2 and C3 are the three adsorption cycles; C1 HCl, C2 HCl and C3 HCl are the three desorption cycles ..... 72

## LISTA DE TABELAS

### **Capítulo 1**

Tabela 1. Compostos fenólicos mais abundantes no bagaço de malte (Maia et al., 2020). .... 21

### **Capítulo 2**

Table 1. Phenolic compounds content from brewer's spent grain (BSG) extracts..... 46

Table 2. Comparison between simple emulsion (SE) and double emulsion (DE) techniques on average particle diameter (D<sub>p</sub>), polydispersity index (PDI), and encapsulation efficiency (EE).

..... 49

Table S1. Effect of crodamol content and ultrasonic emulsification conditions (amplitude and time) on average diameter particle (D<sub>p</sub>) and polydispersity index (PDI) of blank carnauba wax nanoparticles in simple emulsion. ..... 55

Table S2. Melting and crystallization temperatures (T) and enthalpies ( $\Delta H$ ) of carnauba wax (CW). ..... 55

### **Capítulo 3**

Table 1. Carbonization yield of brewers spent grain..... 63

Table 2. Morphological characteristics of the samples. ..... 66

Table 3. Adsorption parameters for Langmuir and Freundlich equilibrium models..... 69

Table 4. Kinetic parameters for Pseudo-first-order and Pseudo-second-order models. ..... 71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysis of variance
BC	Biochar
BET	BET method (Brunauer, Emmett and Teller)
BJH	BJH method (Barret, Joyner and Halenda)
BM	Bagaço de Malte
BSG	Brewers Spent Grain
C	Control
Ceq	Equilibrium concentration
CF	Compostos fenólicos
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CW	Carnauba wax
DE	Double emulsion
DLS	Dynamic Light Scattering
DP	Average diameters
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EE	Encapsulation efficiency
EPA	Environmental Protection Agency
ESI	Electro spray ionization
F	Fermented
FA	Ferulic acid
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FES	Fermentação em Estado-Sólido
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
GAE	Gallic acid equivalent
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
HCA	Hydroxycinnamic Acids
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>K</i>	Equilibrium constant
LC	Cromatografia Líquida

<i>m/z</i>	massa/carga
MAE	Microwave assisted extraction
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mini	Miniemulsion
MS	Espectrometria de Massas
NaOH	Hidróxido de Sódio
NLC	Nanostructured lipid carriers
ODS	Objetivos de desenvolvimento sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
PC	Phenolic Compound
<i>p</i> -CA	<i>p</i> -Coumaric acid
PDI	Polydispersity indexes
PER	Pos-extraction residue
PFO	Pseudo-first-order
PLE	Pressurized liquid extraction
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
PSO	Pseudo-second-order
<i>q</i>	Adsorption capacity
<i>q</i> <sub>max</sub>	Maximum adsorption capacity
R <sup>2</sup>	Correlation coefficient
S <sup>2</sup> <sub>R</sub>	Sum of squares of residuals
SE	Simple emulsion
SE+L	Simple emulsion with lecithin
SE-E	Simple emulsion - less extract
SSF	Solid-state fermentation
T	Temperature
TE	Trolox equivalent
TEM	Transmission Electron Microscopy
TRC	Total reducing capacity
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
UV	Ultravioleta-visível
W/O	Water/Oil
W/O/W	Water/Oil/Water

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	7
PARTE I .....	12
Capítulo 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
1. Sustentabilidade e economia circular como estratégias para redução do desperdício de alimentos.....	13
2. Bagaço de malte: composição e usos.....	16
3. Compostos fenólicos no bagaço de malte.....	18
4. Fermentação em estado sólido como técnica de pré-tratamento do bagaço de malte	21
5. Técnicas de extração de compostos fenólicos do bagaço de malte .....	23
6. Cromatografia líquida de alta eficiência como estratégia para quantificação dos compostos de interesse .....	26
7. Nanoencapsulação de compostos bioativos .....	27
8. Material adsorvente para tratamento de efluentes industriais.....	29
PARTE II.....	31
Capítulo 2 – VALORIZATION OF FERMENTED BREWERS SPENT GRAIN WITH SUSTAINABLE EXTRACTION AND ENCAPSULATION TECHNIQUES.....	32
GRAPHICAL ABSTRACT .....	33
ABSTRACT .....	33
1. INTRODUCTION .....	34
2. MATERIAL AND METHODS.....	36
2.1 Materials .....	36
2.2 Brewers spent grain preparation and solid-state fermentation .....	36
2.3 Phenolic compounds extraction by non-conventional techniques.....	36
2.4 Total reducing capacity and antioxidant activity.....	37
2.5 Targeted UHPLC-PDA-MS analysis .....	38
2.6 Nanoencapsulation with lipid carriers by melt dispersion technique .....	38
2.7 Characterization of nanostructured lipid carriers .....	39
2.8 Encapsulation efficiency.....	40
2.9 Statistical analysis .....	40
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	40
3.1 Selection of fermentation time in phenolic compounds release .....	40
3.2. Effect of the extraction temperature of phenolic compounds using unconventional techniques .....	41

3.3.	Comparison between unconventional extraction methods of phenolic compounds..	43
3.4.	Quantification of phenolic compounds by UHPLC-PDA-MS .....	45
3.5.	Nanostructured lipid carriers.....	48
4.	CONCLUDING REMARKS.....	51
Capítulo 3 – EXPLORING BREWER'S SPENT GRAIN AS A LOW-COST ADSORBENT FOR ENVIRONMENTAL APPLICATIONS.....		56
GRAPHICAL ABSTRACT.....		57
ABSTRACT.....		57
1.	INTRODUCTION .....	58
2.	MATERIAL AND METHODS.....	59
2.1	Brewers spent grain and sample treatment .....	59
2.2	Samples characterization .....	60
2.3	Adsorption experiments .....	61
2.4	Desorption and recycling experiments .....	61
2.5	Statistical analysis.....	62
3.	RESULTS AND DISCUSSION.....	62
3.1	Biochar yield.....	62
3.2	Characterization of the adsorbent .....	63
3.3	Assessment of adsorbent potential and MB removal with pH variation .....	66
3.4	Adsorption isotherms and kinetics.....	68
3.5	Efficiency of consecutive cycles of the sorption and desorption.....	71
4.	CONCLUSIONS .....	72
PARTE III .....		74
Capítulo 4 – Considerações finais, conclusão e perspectivas futuras .....		74
4.1	Considerações finais .....	75
4.2	Conclusão .....	78
4.3	Perspectivas .....	79
TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS .....		80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		82

## INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos globais, conforme estabelecido pelos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) de nº 12 - Consumo e Produção Sustentáveis da ONU (2015), é reduzir pela metade o desperdício de alimentos per capita mundial até 2030 e reduzir as perdas de alimentos ao longo das cadeias de produção e abastecimento, incluindo as perdas pós-colheita. Estima-se que cerca de 1,3 bilhão de toneladas de alimentos são desperdiçados no mundo anualmente. No Brasil, a Política Nacional de Resíduos Sólidos – PNRS, Lei nº 12.305 de 2 de agosto de 2010 (Brasil, 2010), regulamentada pelo Decreto nº 10.936, de 12 de janeiro de 2022, foi implementada com o objetivo de reduzir a geração de resíduos. Essa política promove hábitos de consumo sustentável e estabelece instrumentos para aumentar a reciclagem e a reutilização de resíduos sólidos, além de garantir a destinação ambientalmente adequada dos rejeitos que não podem ser reciclados ou reutilizados. Tanto essa medida brasileira quanto os diversos planos de ação adotados globalmente trazem uma abordagem estratégica baseada na reutilização de subprodutos agroindustriais, que podem dar origem a novos produtos contendo compostos funcionais, que beneficia tanto a indústria quanto os consumidores.

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais antigas e consumidas no mundo, sendo a terceira bebida mais popular depois da água e do chá (Mitri et al., 2022). Sua produção envolve apenas quatro ingredientes principais: cevada, lúpulo, fermento e água. Naturalmente rica em compostos bioativos, a cerveja se beneficia desses compostos não só pelas suas contribuições sensoriais, mas também pela sua atividade antioxidante, auxiliando a manutenção da estabilidade oxidativa da bebida (Ambra et al., 2021; da Silva et al., 2021). Nos últimos anos, a produção de cerveja tem apresentado um crescimento significativo, e, em 2023, o mercado brasileiro se consolidou com 1.847 cervejarias legalmente registradas e uma produção superior a 15 bilhões de litros de cerveja (MAPA, 2024). No entanto, a indústria cervejeira também é responsável pela geração de grandes volumes de subprodutos.

O bagaço de malte (BM) é o subproduto mais abundante da indústria cervejeira, representando cerca de 85% dos resíduos totais gerados (Lynch et al., 2016). Embora seu uso seja comum na formulação de ração animal, uma parte significativa ainda acaba sendo descartada em aterros sanitários, que não são capazes de absorver a imensa quantidade gerada anualmente (Stefanello et al., 2018). O BM é composto principalmente por fibras e proteínas, nutrientes de grande valor nutricional, tornando-o um material promissor para

o enriquecimento de alimentos (Mussatto, 2014). Além disso, sua composição é rica em compostos fenólicos (CF), substâncias associadas a bioatividades antitumoriais, anti-inflamatórias e antioxidantes (Connolly et al., 2021), despertando um interesse crescente da indústria alimentícia, farmacêutica e dos consumidores no aproveitamento desse subproduto.

A valorização dos CF presentes no BM depende diretamente do tipo de pré-tratamento e das técnicas de extração aplicadas a esse subproduto (Bonifácio-Lopes et al., 2020). O pré-tratamento do BM contribui para a quebra da matriz lignocelulósica, aumentando a eficiência da extração ao facilitar o acesso do solvente aos vacúolos e outras estruturas de armazenamento presentes no BM (Mitri et al., 2022). Métodos biológicos, como a fermentação em estado sólido (FES), combinados com extração convencional de CF, têm se mostrado promissores para aumentar os rendimentos de recuperação fenólica neste caso (Costa et al., 2021). No entanto, é essencial incorporar novas técnicas de extração que possibilitem a recuperação máxima dos CF de forma sustentável. Além disso, o material remanescente após a extração, rico em fibras e com elevado potencial ecológico e econômico, deve ser mais bem aproveitado, garantindo seu uso como um recurso renovável e sustentável.

Diante do apresentado, este manuscrito teve como objetivo valorizar o BM cervejeiro por meio de duas abordagens: (i) otimizar a extração sustentável de CF presentes no BM, utilizando a FES e técnicas de extração não-convencionais; (ii) nanoencapsular o extrato obtido para viabilizar uma aplicação do BM, e (iii) avaliar a aplicação do resíduo resultante da extração fenólica como material adsorvente para tratamento de efluentes industriais. Este trabalho é guiado por quatro perguntas centrais:

1. Qual a contribuição da fermentação em estado sólido para a recuperação de compostos fenólicos do bagaço de malte?
2. Qual a contribuição dos métodos alternativos de extração para a recuperação de compostos fenólicos?
3. Qual técnica de encapsulação por nanoemulsão foi mais efetiva no aprisionamento dos compostos fenólicos?
4. Qual material derivado do bagaço de malte possui melhor potencial adsorvente para azul de metileno?

Esta tese de doutorado foi desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN) da UNIRIO no âmbito da linha de pesquisa “Processamento, qualidade, valorização de alimentos, coprodutos e resíduos” e do projeto de pesquisa “Metabolômica e proteômica dos alimentos”. Este trabalho faz parte do grupo de pesquisa do CNPq “Proteômica e metabolômica de compostos bioativos - Ciências ômicas aplicadas a organismos de interesse econômico e biotecnológico” e foi realizado no Laboratório de Bioativos da UNIRIO. Este trabalho é resultado de um projeto interinstitucional entre o PPGAN da UNIRIO e o PósENQ (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) apoiado pelo CNPq – Edital 01/2019 - Apoio à Formação de Doutores em Áreas Estratégicas e da colaboração entre UNIRIO, UFSC e Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

As amostras foram cedidas por uma cervejaria na cidade de Petrópolis-RJ (Brewpoint) e a fermentação foi realizada com parceria do Laboratório de Biotecnologia Microbiana – LaBiM, do Instituto de Química (IQ) da UFRJ. As extrações não-convencionais foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica – LATESC; as nanoemulsões foram desenvolvidas no Laboratório de Controle e Processos de Polimerização – LCP; e a avaliação do potencial adsorvente dos bagaços foram realizadas no Laboratório de Materiais e Computação Científica – LabMAC; todas realizadas pelo Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), na UFSC.

Os resultados obtidos ao longo desta tese foram organizados e apresentados em dois artigos científicos originais, sendo um deles submetido em uma revista de alto impacto científico na área de Ciência de Alimentos; enquanto o outro está em fase de preparação para submissão. Além disso, a tese inclui uma revisão bibliográfica no capítulo 1 e, no último capítulo são discutidos os principais achados da pesquisa, bem como as conclusões centrais e as perspectivas para futuras investigações. Este manuscrito está estruturado em três grandes partes, abrangendo quatro capítulos (Figura 1):

- Parte I desta tese, intitulada "**O potencial do bagaço de malte de cervejarias na bioeconomia circular: situação atual e perspectivas futuras**", é composta pelo **Capítulo 1** que apresenta uma revisão abrangente da literatura sobre o bagaço de malte no contexto da economia circular, destacando aplicações biológicas, como a fermentação em estado sólido, e métodos de extração não convencionais como estratégias para obtenção de compostos bioativos deste subproduto agroindustrial.

A revisão também explora possíveis aplicações funcionais dos extratos obtidos, como nanoemulsões encapsuladas com potencial uso em alimentos e no emprego dos resíduos de extração como adsorventes para o tratamento de efluentes industriais.

- Parte II, intitulada "**Valorização do bagaço de malte cervejeiro: transformando resíduos em recursos para a bioeconomia circular**", explora técnicas inovadoras e sustentáveis para a incorporação desse subproduto no cotidiano. Esta parte da tese é composta por dois capítulos. O **Capítulo 2** é um artigo científico original submetido à revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Fator de Impacto: 5,7; Qualis CAPES: A1), no qual técnicas de encapsulação são aplicadas como estratégia para proteger os compostos fenólicos extraídos do bagaço de malte. O **Capítulo 3**, em fase de submissão ao periódico *Food Bioscience* (Fator de Impacto: 4,8; Qualis CAPES: A2), investiga o uso de extratos de bagaço de malte como adsorventes potenciais de azul de metileno em águas residuais, dentro dos princípios da economia circular.
- Parte III é dedicada a uma discussão geral (**Capítulo 4**), na qual são abordados os principais resultados desta tese, seguidos de considerações finais e propostas de perspectivas para pesquisas futuras.

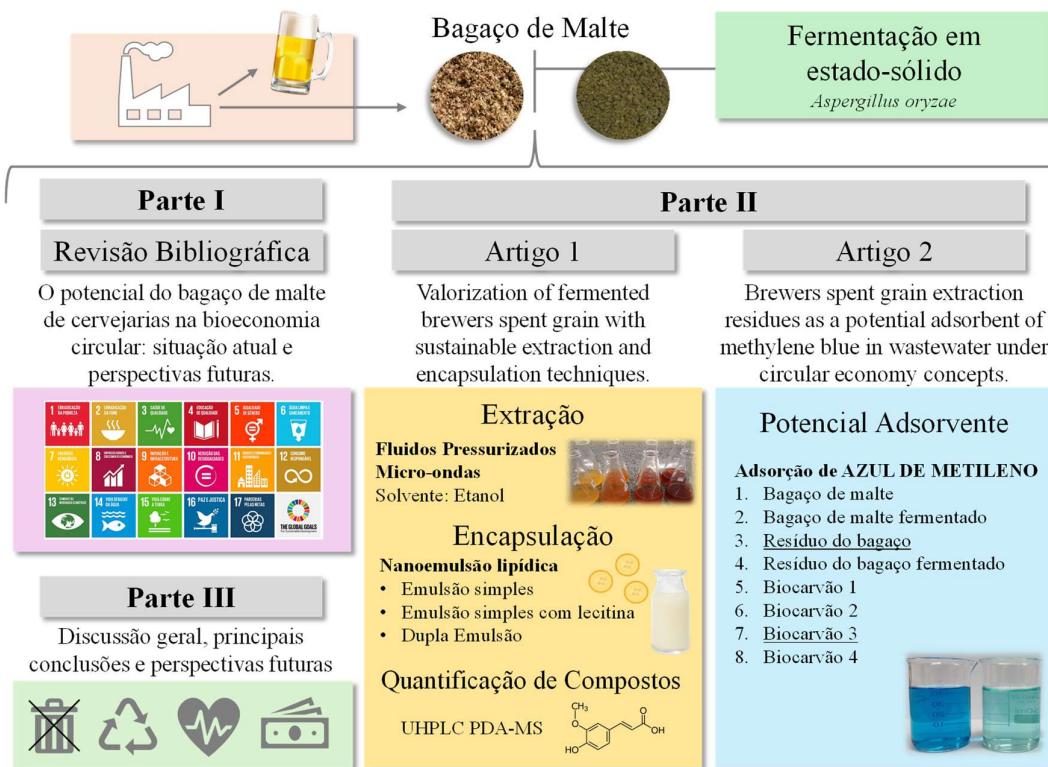


Figura 1. Fluxograma da organização da tese.

# PARTE I

**"O potencial do bagaço de malte de cervejarias na  
bioeconomia circular: situação atual e perspectivas futuras"**

---

Capítulo 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## **1. Sustentabilidade e economia circular como estratégias para redução do desperdício de alimentos**

O crescimento populacional global e o aumento desenfreado do consumo têm intensificado as preocupações com o meio ambiente e a sustentabilidade da vida humana no futuro. Questões como mudanças climáticas, uso inadequado dos recursos naturais, geração excessiva de resíduos e um padrão insustentável de consumo representam sérias ameaças à economia global (Sachs et al., 2022). Nesse contexto, a transição de um modelo de desenvolvimento baseado na economia linear — caracterizada pela geração de resíduos e pelo esgotamento de recursos — para um modelo circular é fundamental para enfrentar esses desafios, uma vez que esse paradigma já se provou insustentável (Jørgensen & Pedersen, 2018).

Diante desse cenário, o interesse por políticas voltadas à sustentabilidade e à economia circular tem crescido significativamente nos últimos anos. O conceito de economia circular envolve a utilização eficiente de recursos finitos, o uso ampliado de recursos renováveis, a recuperação de materiais ao final de seu ciclo de vida e a regeneração de sistemas naturais (Moraga et al., 2019). A sustentabilidade, por sua vez, refere-se à capacidade de um sistema se manter ao longo do tempo sem degradação ou esgotamento dos recursos essenciais de que depende (Sachs et al., 2022). Quando alinhadas, essas políticas contribuem diretamente para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (ONU, 2015), com destaque para o ODS 12, que visa promover padrões de produção e consumo sustentáveis (Figura 2).



Figura 2. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) segundo a Agenda da Organização das Nações Unidas (ONU) para 2030.

Embora a transição para uma economia mais circular e sustentável seja incentivada, o mundo ainda enfrenta desperdícios significativos em diversos setores, incluindo o agroindustrial. Segundo a ONU/FAO, as indústrias de base agrícola geram anualmente cerca de 1,3 bilhão de toneladas de resíduos, o que equivale a cerca de 30% da produção global de alimentos (FAO, 2013). Em contrapartida, 733 milhões de pessoas vivem em situação de fome, o que representa 1 em cada 11 indivíduos no planeta (FAO, 2024). A principal causa do elevado desperdício de alimentos é a má coordenação entre os diversos setores ao longo da cadeia de suprimentos, resultando em perdas desde os estágios iniciais de produção até o consumo final (Govindan, 2018). A Figura 3 apresenta possíveis estratégias em diferentes níveis de prioridade para reduzir o desperdício de alimentos, destacando a produção e a compra conscientes como as mais relevantes.

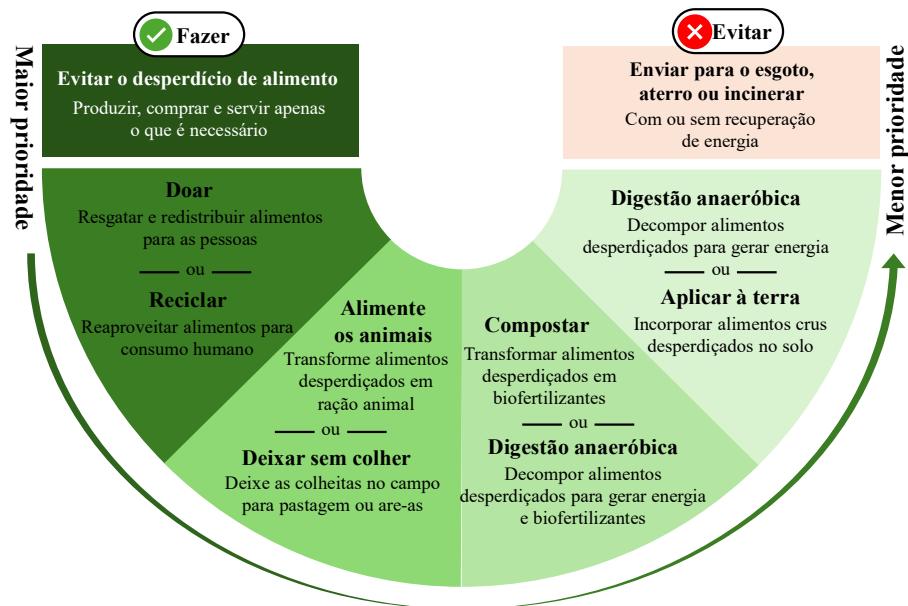


Figura 3. Como reduzir o impacto do desperdício de alimentos no meio ambiente, adaptado de EPA (Wasted Food Scale US EPA - United States Environmental Protection Agency).

Infelizmente, a principal estratégia de descarte desses resíduos ainda envolve a incineração ou destinação em aterros, o que acarreta desafios ambientais, econômicos e sociais significativos. Do ponto de vista ambiental, os resíduos agroindustriais contribuem para o acúmulo anual de 3,3 bilhões de toneladas de CO<sub>2</sub> na atmosfera, degradando a qualidade do ar e provocando problemas respiratórios (Yaashikaa et al., 2022). Os impactos econômicos e sociais são igualmente preocupantes. O desperdício de alimentos, por si só, gera um custo de 1 bilhão de dólares por ano, valor que poderia ser utilizado para suprir as necessidades nutricionais de milhões de pessoas (Capanoglu et al., 2022). Essa abundância de resíduos agroindustriais afeta particularmente os países em desenvolvimento, onde as alternativas viáveis para recuperar e reutilizar esses recursos ainda são limitadas (Freitas et al., 2021).

Nesse contexto, a implementação de modelos de sustentabilidade e de economia circular no setor agroindustrial pode aumentar a eficiência no uso de recursos, reduzir impactos ambientais e promover sistemas mais socialmente responsáveis. Além disso, os resíduos agroindustriais, devido à sua rica composição em nutrientes e substâncias bioativas, possuem um potencial inexplorado de valorização múltipla. Eles podem ser aproveitados para a produção de uma ampla variedade de produtos de alto valor agregado,

como biocombustíveis, biopolímeros, biofertilizantes, enzimas, nutracêuticos, entre outros (Sadh et al., 2018).

## 2. Bagaço de malte: composição e usos

O bagaço de malte (BM) é um subproduto da produção de cerveja que é uma das bebidas alcoólicas mais populares no mundo, sendo a terceira mais consumida globalmente, atrás apenas da água e do chá. Em 2023, o Brasil produziu mais de 15 bilhões de litros de cerveja, e o setor cervejeiro do país registrou um crescimento de 6,8% no número de cervejarias (Figura 4). Segundo o MAPA, a maior parte das cervejarias brasileiras está concentrada na região Sudeste, que responde por aproximadamente 53% da produção total do país (MAPA, 2024). Com o crescimento contínuo do setor cervejeiro, a geração de resíduos também aumenta. Durante o processo de fabricação da cerveja, cerca de 85% dos resíduos sólidos provêm da etapa de mosturação, também conhecida como brassagem, maceração ou cozimento, sendo compostos principalmente por grãos residuais de malte (Mussatto, 2014), conhecidos então como BM.

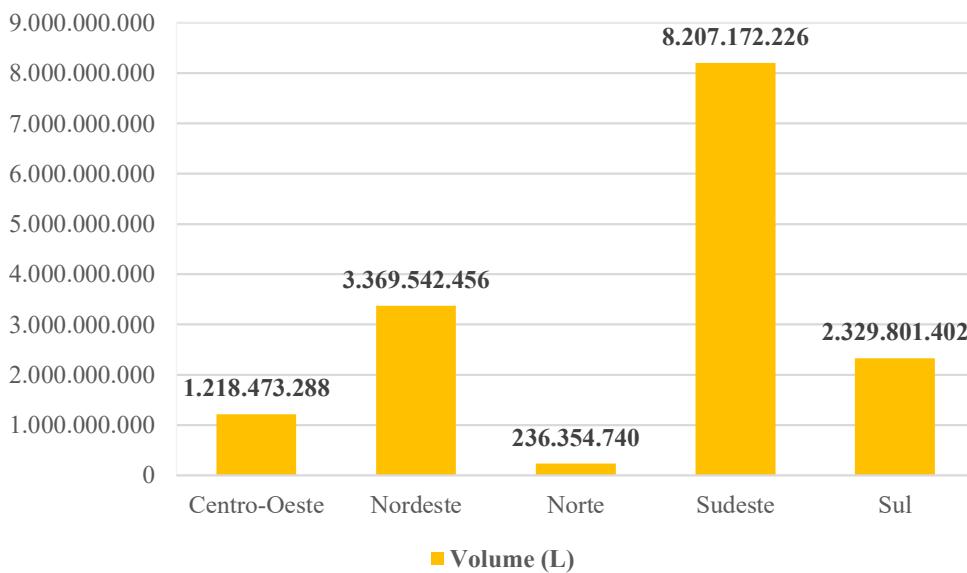


Figura 4. Total da produção de cerveja declarada por região (MAPA, 2024).

O BM é composto principalmente por restos de grãos de cevada, incluindo o pericarpo, o revestimento da semente, a casca e a camada de aleurona do grão original (Figura 5) (Mussatto, 2014). De acordo com Jay et al. (2008) o BM contém materiais que

fazem parte da inflorescência que envolve o grão durante o seu desenvolvimento (ex: gluma floral, raquilha e lodículas), além de partes do eixo embrionário, camadas de farelo, e fragmentos do endosperma. Em comparação com o farelo de trigo, isso torna a composição do BM fisicamente mais heterogênea e quimicamente mais complexa. Quando a mosturação envolve outros cereais, como arroz, trigo e milho, os resíduos desses grãos também podem estar presentes. Dessa forma, a composição química do BM pode variar, não apenas em função da variedade dos grãos utilizados, mas também devido a fatores como o momento da colheita, o método de processamento e as condições de fermentação a que os grãos são submetidos (Mussatto, 2014).

O BM possui um teor de água entre 70% e 90% e é composto principalmente por material lignocelulósico fibroso (70% em base seca), com um alto teor de proteína (20% em base seca). A fibra presente no BM é predominantemente hemicelulose (28–35% em base seca), seguida por celulose (16–25% em base seca) e lignina (7–27% em base seca) (Mussatto & Roberto, 2006; Steiner et al., 2015). Entre os monossacarídeos mais abundantes estão glicose, xilose e arabinose (Mussatto et al., 2006). Apesar do teor de amido ser reportado como insignificante, devido à degradação durante o processo de maceração do grão, há relatos na literatura de que este teor pode chegar próximo de 10% (Jay et al., 2008). Além disso, minerais também estão presentes na estrutura do BM (Muthusamy, 2014).



Figura 5. Bagaço de malte seco do tipo Pilsen. Fonte: autoria própria.

Atualmente, cerca de 70% do BM é utilizado como ração animal, 10% são destinados à produção de biogás, enquanto os 20% restantes são descartados em aterros sanitários (Bolwig et al., 2019). O descarte em aterros é particularmente preocupante, pois o BM, devido ao seu elevado teor de umidade, compostos orgânicos e presença de açúcares fermentáveis, é altamente suscetível à rápida deterioração microbiana, o que pode aumentar a carga microbiana nos aterros e representar um risco ambiental (Wang et al., 2014). Além disso, cada tonelada de BM descartada em aterros libera aproximadamente 513 kg de CO<sub>2</sub> equivalente em gases de efeito estufa (Nigam, 2017). Diante desses impactos, cresce a preocupação com a necessidade de valorizar melhor esse resíduo e/ou implementar rotas alternativas de descarte. Lu e Gibb (2008) sugeriram, por exemplo, o uso do BM como biossorventes, ou seja, adsorventes de baixo custo provenientes de subprodutos ou resíduos da indústria e agricultura. Além disso, o BM pode ser aproveitado para a fabricação de produtos de valor agregado, devido à sua rica composição em compostos fenólicos (McCarthy et al., 2013).

### **3. Compostos fenólicos no bagaço de malte**

Nas últimas décadas, os estudos sobre compostos bioativos têm avançado significativamente, impulsionados principalmente pela crescente preocupação dos consumidores com a saúde. Pesquisas envolvendo compostos bioativos tais como fenólicos, carotenoides, betalaínas e vitaminas demonstraram que seu consumo diário pode trazer diversos benefícios à saúde, incluindo a redução dos níveis plasmáticos de colesterol, a diminuição de fatores de risco cardiovascular, a prevenção da agregação plaquetária e a mitigação dos danos causados pela lesão de reperfusão isquêmica, dentre outros efeitos (Sant' Anna et al., 2013).

Compostos fenólicos (CF) são metabólitos especializados que desempenham um papel essencial na proteção das plantas durante o cultivo. Eles apresentam uma ampla diversidade estrutural, que inclui moléculas simples, como vanilina, ácido gálico e ácido cafeico, bem como polifenóis mais complexos, como estilbenos, flavonoides e polímeros derivados desses grupos (Andersen & Markham, 2005). Os CF são sintetizados pela via metabólica dos fenilpropanoides e possuem uma estrutura básica composta por um ou mais anéis fenólicos e grupos hidroxila (Quideau et al., 2011). Esses compostos atuam

como potentes antioxidantes devido à sua capacidade de neutralizar ou reduzir radicais livres de alta energia, como as espécies reativas de oxigênio (Quideau et al., 2011). Por isso, estão associados à redução do risco de doenças crônicas, como câncer, e à promoção da saúde por meio da proteção contra o estresse oxidativo intracelular (Surh, 2003).

Os CF são classificados em cinco grandes grupos: flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas, estilbenos e outros polifenóis. A forma em que os CF estão presentes na matriz alimentar pode variar de acordo com a classe fenólica. Por exemplo, os flavonoides são geralmente compostos de fácil extração, pois podem estar livres nos vacúolos celulares das plantas (fenólicos livres) ou glicosilados a uma ou mais unidades de açúcar por meio de grupos hidroxila (O-glicosídeos) ou por ligações carbono-carbono (C-glicosídeos), formando os chamados fenólicos conjugados. Por outro lado, os ácidos fenólicos costumam estar covalentemente ligados (fenólicos ligados) a componentes insolúveis da parede celular, como celulose, hemicelulose, lignina, pectina e proteínas estruturais, formando complexos estáveis (Acosta-Estrada et al., 2014; Wang et al., 2019) (Figura 6). Esses fenólicos ligados são resistentes à hidrólise enzimática gastrointestinal e à absorção no trato digestivo superior, chegando ao cólon, onde podem atuar como prebióticos (Attri et al., 2018).

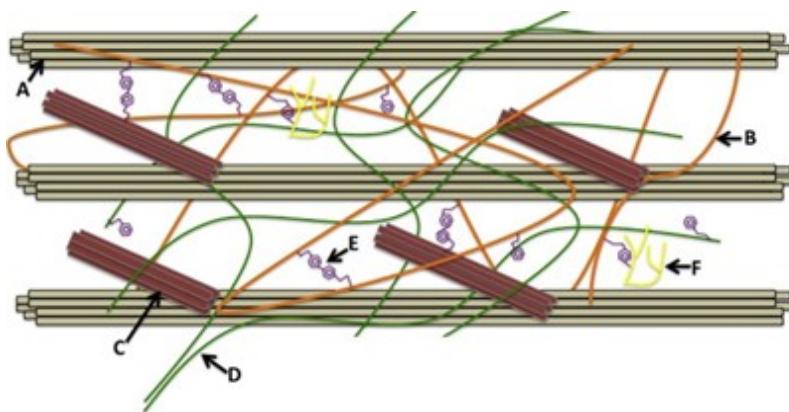


Figura 6. Representações da estrutura da parede celular primária do material vegetal e ligação cruzada entre componentes estruturais e compostos fenólicos. (A) celulose. (B) Hemicelulose. (C) proteínas estruturais. (D) pectina. (E) Ácidos fenólicos. (F) (Acosta-Estrada et al., 2014).

Como ocorre com a maioria dos cereais, os grãos de cevada contêm quantidades significativas de CF (Figura 7), concentrados principalmente nas camadas externas. Dessa forma, o BM pode ser considerado uma fonte potencialmente valiosa de bioativos,

especialmente de ácidos fenólicos hidroxicinâmicos. Entre esses, os ácidos ferúlico e *p*-cumárico são os mais abundantes no BM, com concentrações variando entre 1,86 e 1,95 mg/g e entre 0,56 e 0,79 mg/g, respectivamente. Outros ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos sinápico, cafeico e siríngico, também foram encontrados em altos níveis nesse subproduto. Esses compostos possuem diversas propriedades fisiológicas, incluindo atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitrombótica e anticancerígena (Hernanz et al., 2001). Extratos fenólicos ricos nesses compostos, obtidos a partir do BM, demonstraram eficácia no tratamento da hipertensão em modelos *in vitro* e *in vivo* (Connolly et al., 2021). Em um estudo com diferentes tipos de BM, foram apresentados os dez compostos mais abundantes presentes em amostras do tipo pilser, IPA e witbier (Tabela 1), sendo estes das classes dos ácidos fenólicos e flavonoides; estas classes corresponderam a 44,8% e 49,4%, respectivamente, da abundância total na fração de compostos livres (Maia et al., 2020).

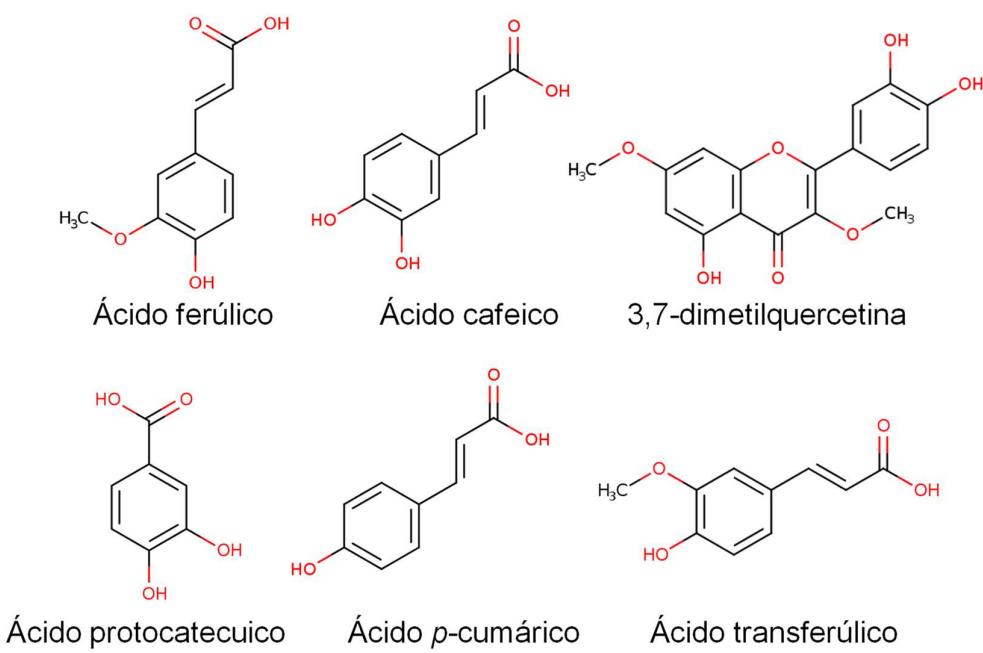


Figura 7. Estrutura química de compostos fenólicos presentes nos grãos de cevada (Phenol Explorer).

Tabela 1. Compostos fenólicos mais abundantes no bagaço de malte (Maia et al., 2020).

Nome	Fórmula molecular	Classe	Abundância total
Ácido transferúlico	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Ácido fenólicos	4.17x10 <sup>7</sup>
Ácido <i>p</i> -cumárico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Ácido fenólicos	3.88x10 <sup>7</sup>
Ácido ferúlico	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Ácido fenólicos	1.37x10 <sup>7</sup>
Ácido caféico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	Ácido fenólicos	1.12x10 <sup>7</sup>
Ácido protocatecuico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Ácido fenólicos	6.35x10 <sup>6</sup>
3,7-dimetilqueracetina	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	Flavonoides	4.51x10 <sup>6</sup>
Isômero 3 da tetrametilsacetelareína	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	Flavonoides	2.27x10 <sup>6</sup>
Ácido gentísico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Ácido fenólicos	1.78x10 <sup>6</sup>
Florizina	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	Flavonoides	1.30x10 <sup>6</sup>
Naringenina 7-O-glicosídeo	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	Flavonoides	1.25x10 <sup>6</sup>

Apesar da abundância de CF no BM, é importante destacar que parte dos CF da cevada é solubilizada durante a mosturação no processo de fabricação da cerveja, ficando retida no produto. No BM, permanecem principalmente compostos ligados à biomassa lignocelulósica. Assim, é essencial aplicar técnicas de pré-tratamento ao BM para quebrar a estrutura lignocelulósica, melhorando a eficácia do processo de extração e facilitando o acesso do solvente às estruturas celulares. Além disso, o planejamento da extração de CF deve ser cuidadosamente elaborado, com a seleção de solventes e técnicas que sejam de fácil replicação, de baixo custo e sustentáveis, ao mesmo tempo garantindo máxima eficiência de extração e valorização desse subproduto.

#### 4. Fermentação em estado sólido como técnica de pré-tratamento do bagaço de malte

Um processo de pré-tratamento biológico amplamente aplicado ao BM e com resultados promissores é a fermentação em estado sólido (FES). Como mencionado

anteriormente, a rica composição do BM pode conferir valor agregado a produtos e extratos. No entanto, devido à complexa estrutura da parede celular vegetal, a utilização desses materiais lignocelulósicos requer um pré-tratamento que rompa essa estrutura. Um tipo de pré-tratamento eficiente é o biológico, que utiliza microrganismos, principalmente fungos ou bactérias, para degradar a hemicelulose, lignina e, em alguns casos, celulose, dependendo do microrganismo empregado (Aftab et al., 2019). O pré-tratamento biológico destaca-se por ser ecologicamente correto, consumir menos energia, operar sob condições brandas e ter baixo custo.

A FES é um processo de fermentação controlado no qual microrganismos crescem na ausência de água ou com uma quantidade mínima de umidade. Esse método tem grande potencial como bioprocesso para a geração de metabólitos secundários a partir de resíduos agrícolas e industriais. Tem sido amplamente utilizado com sucesso em resíduos como bagaços, farelos, cascas e outros subprodutos anteriormente subutilizados ou descartados. De maneira geral, a FES é capaz de melhorar o perfil nutricional desses materiais e produzir enzimas valiosas, especialmente aquelas envolvidas na degradação de biomassa.

Os microrganismos mais utilizados em sistemas de FES são fungos filamentosos, que incluem diversas espécies empregadas industrialmente, para produção de enzimas (como glicoamilases, celulases e tanases) e ácidos orgânicos (como ácido láctico e ácido fumárico). Fungos filamentosos são empregados industrialmente por sua capacidade de utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono. A penetração de suas hifas no interior das partículas do substrato melhora a acessibilidade aos nutrientes, superando o desempenho de microrganismos unicelulares nesse aspecto (Londoño-Hernández et al., 2017). Entre os fungos filamentosos amplamente estudados em processos de FES, destaca-se o *Aspergillus oryzae*, que tem se mostrado um microrganismo versátil na valorização de subprodutos agroindustriais (Acosta-Estrada (Acosta-Estrada et al., 2019; Maia et al., 2020; Shin et al., 2019). É importante destacar que os microrganismos utilizados na indústria de alimentos precisam ser reconhecidos como GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration), assegurando que não produzam toxinas nem representem riscos à saúde.

Um estudo conduzido por Ogunjobi et al. (2011) investigou a FES de 35 dias com *A. oryzae*, utilizando o BM como substrato. Os resultados mostraram um aumento de 55% na concentração de proteína, enquanto o teor de fibra bruta diminuiu ao longo do processo de fermentação. Esses dados confirmam a capacidade do *A. oryzae* de degradar fibras, o

que resultou no aumento relativo da concentração de proteínas. Além disso, estudos demonstraram a superioridade do *A. oryzae* no impacto sobre compostos fenólicos durante a FES, em comparação com outras quatro cepas de fungos filamentosos (Maia et al., 2020). O microrganismo aumentou em 7 vezes o conteúdo total de compostos fenólicos e em 5 vezes a atividade antioxidante, em relação ao BM não fermentado. Um estudo de Goh e Ken (2021), que utilizou oito diferentes linhagens de fungos filamentosos na fermentação do BM, também relatou uma melhoria significativa no conteúdo total de fenólicos em todos os BM fermentados. No entanto, *A. oryzae* destacou-se, sendo responsável por elevar o conteúdo fenólico de 1,4 mg GAE/g (não fermentado) para 9,5 mg GAE/g (fermentado).

## **5. Técnicas de extração de compostos fenólicos do bagaço de malte**

A escolha da técnica de extração adequada é um dos passos mais críticos na recuperação e isolamento de CF de materiais vegetais. Diversos fatores influenciam esse processo, incluindo o tipo de composto a ser extraído, o método de extração, o solvente utilizado, o tamanho das partículas da amostra, além da presença de substâncias interferentes. Tradicionalmente, os CF têm sido extraídos de fontes naturais utilizando solventes orgânicos em extrações sólido-líquido, devido à sua simplicidade, eficiência e ampla aplicabilidade. No entanto, nos últimos anos, diversas pesquisas têm explorado técnicas alternativas de extração para a recuperação de CF, como a extração líquida pressurizada e a extração assistida por micro-ondas (González-García et al., 2021; Herbst et al., 2021). Essas abordagens, conhecidas como técnicas de extração não convencionais, são cada vez mais valorizadas por seus impactos principalmente atribuídos a maior sustentabilidade (Figura 8).



Figura 8. Algumas das implicações mais importantes alcançadas por técnicas não-convencionais de extração (Gil-Martín et al., 2022).

### 5.1 Extração sólido-líquido

A extração sólido-líquido, também conhecida como método de extração convencional, utiliza diversos solventes, como metanol, etanol, acetona, ou suas misturas com água. Esse método envolve o uso de grandes volumes de solventes, o que não é sustentável, e procedimentos manuais, o que torna o processo dependente do operador e intensivo em mão de obra, resultando em uma menor consistência nos resultados. Embora muitos estudos apliquem essa técnica para a extração de compostos no BM (Almeida et al., 2017; Maia et al., 2020; Meneses et al., 2013), métodos de extração não convencionais vêm ganhando destaque, com o objetivo de superar as limitações dos métodos convencionais (Alara et al., 2021; Herbst et al., 2021).

### 5.2 Extração por líquidos pressurizados

Na extração com líquidos pressurizados (PLE) (Figura 9), aplica-se pressão entre 3,3 e 20,3 MPa, o que permite o uso de temperaturas acima do ponto de ebulação dos solventes. A extração em temperaturas elevadas, entre 40 e 200 °C, oferece vantagens ao facilitar a dessicção e solubilidade das moléculas nos solventes (Zhang et al., 2018). Esse método é considerado uma técnica automatizada de extração verde, sendo uma alternativa econômica e eficiente em termos de tempo comparada às técnicas convencionais, resultando em teores iguais ou superiores de CF em diversos extratos vegetais.



Figura 9: Equipamento desenvolvido para extração por líquidos pressurizados (LATESC/UFSC). Fonte: autoria própria.

A PLE é amplamente utilizada para obter biocompostos de fontes naturais e no fracionamento termoquímico de biomassa lignocelulósica. Em temperaturas elevadas, os solventes usados nessa extração exibem propriedades únicas devido à modificação da constante dielétrica, densidade, viscosidade e difusividade, causadas pela ruptura de forças intermoleculares, como interações de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações dipolo (Herbst et al., 2021).

Alguns estudos têm demonstrado os impactos da PLE na obtenção de compostos fenólicos no BM. Um estudo com BM demonstrou que a PLE obteve um rendimento de extração de até 20% em peso de BM, apresentando uma atividade antioxidante de 4096 mmol ET/100 g de extrato. Milagros Delgado-Zamarreño (2009) identificaram condições otimizadas para a técnica, recomendando a aplicação de alta pressão (~11 MPa) combinada com temperaturas mais baixas, como 50 °C. Embora essa técnica de extração não convencional tenha mostrado resultados promissores, até o momento não foram encontrados relatórios sobre seu uso específico para a extração de CF de BM fermentado.

### 5.3 Extração assistida por micro-ondas

A extração assistida por micro-ondas (MAE) utiliza energia de radiação de micro-ondas para aquecer rapidamente a mistura soluto-solvente, resultando em um tempo de extração mais curto e na obtenção de extratos de alta qualidade, com melhor recuperação do composto-alvo. O calor gerado pelo processo aumenta a difusividade do solvente na amostra, facilitando a liberação dos compostos-alvo. Esse aumento na difusão rompe as ligações de hidrogênio que prendem os compostos à matriz, permitindo que eles se dissolvam no fluido de extração (Alara et al., 2021). Diferentes substâncias químicas absorvem a energia das micro-ondas em diferentes intensidades, o que torna a extração assistida por micro-ondas um método eficiente para extrações seletivas, sendo particularmente vantajoso na separação de compostos-alvo de matrizes alimentares complexas (Setyaningsih et al., 2015). Quando a irradiação de micro-ondas penetra num material e interage com compostos polares, é gerado calor devido à rotação do dipolo, garantindo assim um elevado rendimento (Sirohi et al., 2020).

Várias classes de CF podem ser eficientemente extraídas por micro-ondas. Ao contrário da extração com líquidos pressurizados, a MAE já tem aplicação comprovada no BM. No entanto, o rendimento e o perfil fenólico extraído variam significativamente de acordo com parâmetros operacionais como tempo de extração, temperatura, volume de solvente e velocidade de agitação (Guido & Moreira, 2017). Moreira et al. (2012) demonstrou que a aplicação de micro-ondas por 15 min a 100 °C resultou em um rendimento de compostos fenólicos extraído do BM cinco vezes maior do que com técnicas convencionais. Além disso, a MAE proporcionou um aumento significativo na capacidade redutora total e na atividade antioxidante do BM proveniente de cervejas claras e vermelhas, quando comparado ao BM não tratado, por conta da liberação de compostos (Zago et al., 2022). Um estudo recente também confirmou a eficácia dessa técnica na obtenção de ácidos ferúlico e *p*-cumárico, compostos hidroxicinâmicos relevantes presentes no BM (López-Linares et al., 2021).

## 6. Cromatografia líquida de alta eficiência como estratégia para quantificação dos compostos fenólicos

Após a fermentação e extração dos CF, é essencial aplicar técnicas sensíveis e confiáveis para a quantificação desses metabólitos. Entre as principais técnicas

cromatográficas, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Essa técnica é amplamente utilizada devido à sua precisão, modernidade e versatilidade, sendo ideal para a separação, identificação e quantificação de componentes em misturas complexas, além de permitir a obtenção de perfis químicos detalhados de diferentes fontes (Nahar et al., 2020).

Na CLAE, a fase móvel, composta por um solvente ou uma mistura de solventes, é bombeada através de uma coluna cromatográfica (fase estacionária), essencial para a separação dos compostos. A coluna de fase reversa é a mais utilizada, na qual a fase estacionária é apolar, enquanto a fase móvel é uma mistura polar de solventes orgânicos e água (Jandera, 2011; Scott, 2020). Após a separação, os compostos eluídos são detectados e analisados (Rodríguez-Pérez et al., 2016). A CLAE é frequentemente combinada com detectores como ultravioleta-visível (UV) e matriz de fotodiodos (PDA), permitindo a caracterização de uma ampla variedade de compostos fenólicos e seus derivados, o que tem sido fundamental para a identificação de classes fenólicas em plantas (Shi et al., 2022).

Esta técnica tem se mostrado eficaz na identificação e quantificação de CF e outros metabólitos secundários em matrizes alimentares complexas, tornando-se uma ferramenta essencial para a investigação de compostos de interesse biotecnológico, especialmente para as indústrias alimentícia e de produtos naturais (Santos et al., 2019). No caso do BM, diversos estudos têm aplicado a CLAE para identificar compostos predominantes e avaliar as biotransformações que ocorrem durante tratamentos aplicados a esse subproduto. Maia et al. (2020) analisaram compostos fenólicos diferenciais no BM após a fermentação em estado sólido como pré-tratamento, observando um aumento significativo nos níveis de fenólicos em comparação ao controle (não tratado). A técnica também revelou que o ácido clorogênico, um éster do ácido cafeico e quínico, foi o ácido fenólico mais abundante em BM submetido a pré-tratamentos térmicos (Rahman et al., 2021). Becker et al. (2023), por sua vez, relatou que os principais compostos fenólicos do BM são ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos ferúlico, cafeico e p-cumárico.

## **7. Nanoencapsulação de compostos bioativos**

Uma vez extraídos, os CF presentes no BM podem ser amplamente utilizados no setor de alimentos como aditivos em indústrias de carnes, frutas, vegetais, bebidas,

especiarias, gorduras e óleo; promovendo melhorias na aparência, sabor e cor dos produtos, além de prolongar sua vida útil (Loganathan & Mohan, 2023). Entretanto, muitos ingredientes bioativos naturais são instáveis e suscetíveis à oxidação, processo acelerado pela exposição à luz, calor, pH e teor de umidade (Corrêa-Filho et al., 2019). Ademais, a adição direta de extratos ricos em CF pode causar adstringência no produto final (Comunian et al., 2021). Nesse contexto, a nanoencapsulação tem sido proposta como uma estratégia eficaz para contornar esses desafios, facilitando o aproveitamento dos CF e protegendo os nutrientes de condições adversas (Abdul Rahim et al., 2019).

A nanoencapsulação é uma tecnologia que oferece alta eficiência de encapsulamento e capacidade de carga, além de aprimorar a biodisponibilidade, estabilidade, o perfil de liberação controlada e mascarar sabores indesejáveis (Luo et al., 2020). A aplicação desta nanotecnologia em alimentos geralmente requer dois fatores essenciais: 1) a seleção de materiais encapsulantes adequados para o desenvolvimento do sistema; e 2) a escolha da técnica de encapsulação. Os materiais encapsulantes devem ser GRAS para uso em alimentos. Além disso, é importante considerar a funcionalidade, a concentração do encapsulamento, o perfil de liberação desejado e os requisitos de estabilidade. A maioria dos materiais usados no setor de alimentos inclui polímeros de carboidratos, proteínas, lipídios e outros materiais orgânicos e inorgânicos. Entre as técnicas de encapsulamento mais populares para compostos bioativos estão a emulsificação, secagem por spray, liofilização, extrusão, eletrofiação e coacervação (Shishir et al., 2018).

Na seleção de materiais encapsulantes, os lipídios possuem várias vantagens, incluindo a capacidade de capturar compostos bioativos com diferentes solubilidades. Em particular, moléculas instáveis e altamente hidrofóbicas podem ser protegidas contra a degradação, o que contribui para uma maior estabilidade durante o armazenamento (de Souza Simões et al., 2017). Nanopartículas lipídicas são geralmente produzidas a partir de um lipídio sólido, como cera de carnaúba (de origem vegetal), comum em alimentos (Jafari, 2017). Em produtos alimentícios, nanocápsulas feitas a partir de lipídios promovem uma maior solubilidade, alta biodisponibilidade e liberação controlada dos ingredientes ativos nanoencapsulados. Isso ocorre porque essas nanocápsulas aderem à parede gastrointestinal, permitindo a liberação dos bioativos precisamente onde são absorvidos. Além disso, os lipídios também são conhecidos por aumentar a absorção oral de diversos bioativos, potencializando sua biodisponibilidade (Souto & Severino, 2013).

Quanto à técnica de encapsulação, destaca-se a nanoemulsão que consiste em dois líquidos imiscíveis, com gotas de fase dispersa entre 50 e 1000 nm (Weiss et al., 2006). Esses sistemas coloidais encapsulam eficazmente compostos bioativos, como compostos lipofílicos em emulsões simples (óleo em água) e hidrofílicos em emulsões simples (água em óleo) ou dupla (água em óleo em água). Para melhorar sua estabilidade, utilizam-se surfactantes de baixo peso molecular, fosfolipídios, proteínas e polissacarídeos (Pisoschi et al., 2018). Catequina (antioxidante hidrofílico) e curcumina (hidrofóbica) foram co-encapsuladas em uma emulsão água-em-óleo-em-água, alcançando alta eficiência de encapsulamento, entre 88% e 97% (Aditya et al., 2015). Este estudo revelou um aumento de quatro vezes na bioacessibilidade em comparação às formas livres de catequina e curcumina, indicando que essa técnica é eficaz na preservação e na melhoria da bioacessibilidade de CF.

Embora a nanoencapsulação já tenha sido aplicada para produzir nanopartículas de ácido ferúlico extraído de BM para uso dermatológico (Bucci et al., 2020) et al., 2020), novos estudos são necessários para explorar seu uso em nutracêuticos de ingestão.

## **8. Material adsorvente para tratamento de efluentes industriais**

Dentro do contexto da economia circular, ainda que ocorra extração máxima dos CF presentes do BM, permanece um resíduo lignocelulósico que precisa ser adequadamente destinado. Paralelamente, a poluição hídrica tornou-se um problema crítico para a humanidade e o ecossistema, agravando o risco de escassez de água doce e limpa no futuro próximo. Muito se discute sobre economizar e reutilizar água nos sistemas produtivos, e diversas técnicas de tratamento para despoluição foram propostas e aplicadas durante as últimas décadas (Chen et al., 2021; Fetanat & Tayebi, 2022; Mannina et al., 2022).

A adsorção ainda é o método mais favorável para a remoção de poluentes de águas residuais devido ao seu baixo custo, facilidade de operação e tecnologia simples (Mo et al., 2018). Os materiais adsorventes são produzidos principalmente a partir de materiais poliméricos, que não são sustentáveis, e subprodutos industriais. Fibras naturais com alta porosidade, baixa gravidade específica e capacidade de adsorção removem metais e corantes de águas residuais industriais (ŞAFAK & ÇİFÇİ, 2023).

Nas estações de tratamento de esgoto, os processos de adsorção são utilizados para remover poluentes dissolvidos que persistem após as fases biológicas ou tratamentos de oxidação química. Diversos materiais, naturais ou sintéticos, são utilizados como sólidos adsorventes, sendo o carvão ativado o mais comumente empregado, devido a sua eficiência na remoção de diversos poluentes da água. No entanto, seu uso generalizado no tratamento de esgoto pode ser limitado devido ao seu custo elevado, além de desafios relacionados ao seu impacto sustentável (De Gisi et al., 2016).

Nesse contexto, a busca por adsorventes de baixo custo, provenientes de resíduos agroindustriais, tem sido uma alternativa promissora para a remoção de poluentes. Resíduos agrícolas como agentes adsorventes oferecem vantagens no tratamento de águas residuais: são abundantes, quimicamente estáveis, de baixo custo, renováveis, possuem ciclo de regeneração curto e são ambientalmente amigáveis. Além disso, sua estrutura é altamente porosa e possui grande área superficial, o que facilita a adsorção física de poluentes, como metais pesados (Anastopoulos et al., 2017). O BM, por exemplo, tem sido utilizado com sucesso para remover diferentes poluentes por adsorção (Bachmann et al., 2022), e já demonstrou que ser um excelente material precursor para a produção de adsorventes altamente eficientes para íons metálicos (Cechinel et al., 2022).

O BM gerado na fabricação de cerveja não apenas se destaca como uma fonte potencial de compostos bioativos, mas também apresenta grande capacidade para adsorver contaminantes da água, devido à sua composição rica em celulose, hemicelulose e lignina (Sganzerla et al., 2023). Isso o torna um candidato promissor para a descontaminação de águas residuais, podendo ser integrado em um modelo de economia circular (Bachmann et al., 2023; Cechinel et al., 2022; Lee et al., 2023). A água purificada pode, então, ser reutilizada na própria indústria cervejeira para lavar, limpar e esterilizar diversas unidades após a produção de cada lote (Olajire, 2020).

# **PARTE II**

**"Valorização do bagaço de malte cervejeiro: transformando resíduos em recursos para a bioeconomia circular"**

---

**Capítulo 2 – VALORIZATION OF FERMENTED BREWERS SPENT GRAIN WITH SUSTAINABLE EXTRACTION AND ENCAPSULATION TECHNIQUES**

**Capítulo 3 – EXPLORING BREWER'S SPENT GRAIN AS A LOW-COST ADSORBENT | ENVIRONMENTAL APPLICATIONS**

## **Capítulo 2 – VALORIZATION OF FERMENTED BREWERS SPENT GRAIN WITH SUSTAINABLE EXTRACTION AND ENCAPSULATION TECHNIQUES**

Maia, I. C. <sup>a</sup>, Santos, P. H. <sup>b</sup>, Agner, T. <sup>c</sup>, D’Almeida, C. T. S. <sup>a</sup>, Oliveira, J. V. <sup>b</sup>, Araújo, P. H. H. <sup>c</sup>, Sayer, C. <sup>c</sup>, Rostagno, M.A. <sup>b</sup>, Dias, J. F. <sup>a</sup>, Cavalcanti, E. A. C. <sup>d</sup>, Ferreira, M. S. L. <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Food and Nutrition Graduate Program (PPGAN), Nutrition School, Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Multidisciplinary Laboratory of Food and Health (LabMAS), School of Applied Sciences (FCA), University of Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Department of Chemical Engineering and Food Engineering (EQA); Federal University of Santa Catarina (UFSC), Santa Catarina, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Microbial Biotechnology, Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

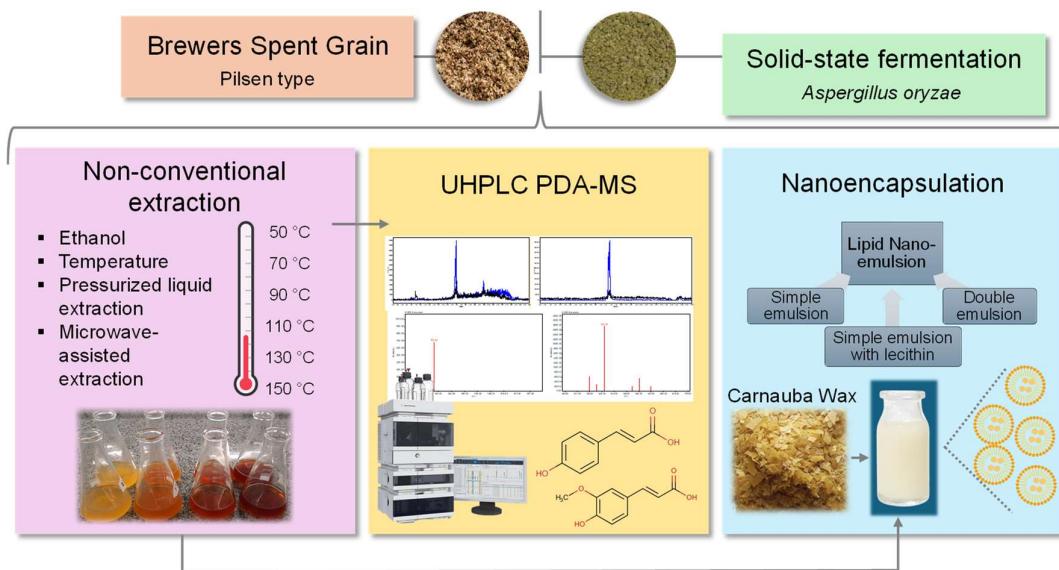
---

### **Highlights**

- Two days of solid-state fermentation were enough to release antioxidant compounds
- Pressurized liquid and microwave applied at high temperatures increased extraction
- The ferulic acid content increased with fermentation and non-conventional extraction
- Carnauba wax nanoparticles encapsulating the extract were stable for up to 50 weeks
- Encapsulation efficiency of phenolic compounds in carnauba wax nanoparticles was 35%

**Este capítulo foi submetido no *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Fator de Impacto: 5,7; Qualis CAPES: A1).**

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ABSTRACT

Brewer's spent grain (BSG), the main by-product of the beer industry, represents a source of bioactive compounds bound to the lignocellulosic matrix. Solid-state fermentation (SSF) is a promising technique to recover compounds from agro-industrial waste. This work explored pressurized liquid (PLE) and microwave-assisted extraction (MAE) to recover phenolic compounds from fermented BSG. Extracts were encapsulated by nanoemulsion techniques using carnauba wax. SSF and unconventional extractions enhanced the recovery of compounds, especially at 130–150 °C. However, MAE at 150 °C after fermentation leads to partial degradation of free-form compounds. Ferulic acid and *p*-coumaric contents (UHPLC-PDA-MS) were enhanced after SSF especially in PLE at 150 °C. Encapsulation efficiency reached 35%, with nanoparticles remaining stable for 50 weeks. SSF significantly increased antioxidant activity compared to unfermented BSG, and the extraction methods successfully liberated bioactive compounds, highlighting the potential of BSG as a renewable source for high-value applications.

**Keywords:** *Aspergillus oryzae*, Craft beer; Bioactive compounds; Antioxidant activity; Ferulic acid; UHPLC; nanostructured lipid carriers.

## 1. INTRODUCTION

Beer production has been growing worldwide in recent years and the Brazilian market has undergone significant consolidation, with 1,847 legally installed breweries and production of over 15 billion liters of beer in 2023 (MAPA, 2024). However, this growth comes with the challenge of managing large quantities of brewing by-products, mainly brewer's spent grain (BSG), which constitutes 85% of the waste generated in beer manufacturing (Lynch et al., 2016). For every 100 liters of beer brewed, around 20 kg of wet BSG are generated, which is generally incorporated into animal feed or disposed of in landfills – solutions insufficient to manage the vast annual production (Stefanello et al., 2018). As sustainability, renewable resource use, and the circular economy gain global importance, the valorization of this by-product for the agri-food, cosmetic and pharmaceutical industries present a strategic opportunity.

Comprising the hull, pericarp layers and the seed coat (testa) of the mature barley grains, BSG is rich in lignocellulosic fiber and has a relatively high protein content (Mussatto & Roberto, 2006). In addition to these components, BSG is also a valuable source of phenolic compounds (PC), which contribute to its potential as a functional ingredient (Almeida et al., 2017; Maia et al., 2020; Stefanello et al., 2018). PC are plant-specialized metabolites with well-reported antioxidant potential and health benefits, related to the inhibition or reduction of inflammatory, mutagenic, and carcinogenic processes (Lutz et al., 2019). As the insoluble fraction of brewer's wort, BSG contains mainly PC covalently bound to the components of the plant cell wall, such as the fibrous matrix (Aliyu & Bala, 2011). Therefore, the application of bioprocesses to BSG can be a valuable strategy to enhance the PC bioaccessibility within this fiber-rich matrix.

Solid-state fermentation (SSF) is a promising technique for the valorization of BSG, offering a water-efficient, low-cost, and low-waste method for concentrated metabolite production and extraction. Several studies have investigated the application of SSF on BSG compounds, demonstrating a mutually beneficial relationship between the microorganism and the substrate: BSG serves as an economical source of carbon and nitrogen for microbial growth, while filamentous fungi can enhance the phenolic content of BSG by up to sevenfold (Barrios-González, 2012; Cooray & Chen, 2018; Maia et al., 2020). This occurs because, during SSF, filamentous fungi produce enzymes, *e.g.*,  $\beta$ -xylosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -amylases, cellulases and feruloyl esterases (Costa et al., 2021; Miti et al., 2022). These enzymes can weaken the covalent bonds between PC and BSG structural components through extracellular enzymes

produced by microorganisms, making them more soluble in the substrate (Cooray & Chen, 2018).

Another crucial point for the effective recovery of these valuable PC present in BSG is the selection of an appropriate extraction technique. We have previously demonstrated the successful extraction of phenolic compounds from BSG using conventional solid–liquid extraction methods(Maia et al., 2020), but recent efforts have focused on exploring unconventional extraction methodologies based on green chemistry principles with minimal solvent. Microwave-assisted (MAE) and pressurized liquid extraction (PLE) have been highlighted as a sustainable method for valorizing compounds in BSG(Andres et al., 2020; Carciochi et al., 2018; Zago et al., 2022). Since both techniques involve the application of high temperatures, their effect on PC can be paradoxical: thermally unstable PC may be degraded, while those strongly bound to the matrix can be released through thermal hydrolysis (Chipurura et al., 2010).

Once extracted, the application of these PC is limited due to their high instability under certain environmental conditions, such as temperature, pH, and polarity compatibility. Owing to their capacity to mitigate degradation, nanoencapsulation has emerged as a versatile solution for enriched extracts in bioactive compounds (Albuquerque et al., 2021). Carnauba wax, derived from *Copernicia prunifera* (the carnauba palm tree), is a particularly attractive wall material for encapsulating BSG compounds, widely accepted across industries, capable of forming a protective barrier against environmental and chemical interactions(Islam et al., 2024). Furthermore, it enables the controlled release of functional compounds to specific target sites, enhancing their bioavailability, water solubility, and stability (Freitas et al., 2016).

Despite their potential, the effects of carnauba wax nanoparticles loaded with BSG compounds remain unexplored. This innovative approach aims to valorize the use of BSG, a by-product of the beer industry, while contributing to sustainability efforts. In this context, the aim of this study was: (1) to recover phenolic compounds from BSG using eco-friendly non-conventional extraction techniques, combined with SSF, and (2) to produce nanostructured lipid carriers (NLC) containing these compounds through melt dispersion technique, using carnauba wax as a carrier.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Materials

A Pilsen-type brewer's spent grain (BSG) sample was kindly provided from a craft beer factory (Brewpoint Brewery, Petrópolis, RJ, Brazil). Solid lipid carnauba wax T4 (CW) was kindly donated by GM Ceras (São Paulo, Brazil). Liquid lipid crodamol GTCC (saturated triglyceride from coconut oil) (Frederikssund, Denmark) and soy lecithin (90%) were purchased by Alpha Química and Alfa Aesar (Massachusetts, USA), respectively. Deionized water was used in all encapsulation experiments as the aqueous phase. Polysorbate 80 (Tween 80) and analytical standards, such as ferulic acid (CAS 537-98-4), caffeic acid (CAS 331-39-5), and p-coumaric acid (CAS 501-98-4) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 2.2 Brewers spent grain preparation and solid-state fermentation

Pilsen-type BSG samples were previously dried in a forced air-ventilation oven (MA 035, Marconi, Brazil) at 65 °C for 8 h, resulting in a final moisture content of 70%. Based on a previous study (Maia et al., 2020), the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* (NRRL 32657), sourced from the Microbial Biotechnology Laboratory's microorganism collection (UFRJ, Brazil), was selected for SSF. The samples were inoculated with  $10^7$  *A. oryzae* spores/g of BSG and incubated at 30 °C(Lira et al., 2020). A kinetics of SSF was performed and the flasks were collected at determined fermentation intervals (0, 1, 2, 4, 7 days), the remaining fermented solids were dried in a ventilated oven at 65 °C for 6 h and were stored at 4 °C until analysis. Autoclaved BSG was also analyzed. The total reducing capacity (TRC) determined by using the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant capacity determined using the DPPH method (both described in Section 2.3) were performed in triplicate to select the fermentation time, which was named “BSG-F” (brewers spent grain fermented).

### 2.3 Phenolic compounds extraction by non-conventional techniques

To extract phenolic compounds from both fermented (BSG-F) and non-fermented (BSG) samples, three extraction methods were tested: 1) microwave-assisted extraction (MAE), 2) pressurized liquid extraction (PLE), and 3) conventional extraction, applied as control. Ethanol (100%) was selected as solvent as it is generally recognized as safe, following the principles of green chemistry (Grassi et al.). The non-conventional extractions (MAE and PLE) were conducted at six different temperatures - 50, 70, 90, 110, 130, and 150 °C - using independent samples for each condition. The antioxidant capacity determined by the DPPH

method (described in Section 2.3) was performed in triplicate to select the extraction temperature.

**Non-conventional extractions** – MAE and PLE extractions were performed in duplicate according to Rudke *et al.* (2022) (Rudke et al., 2022), with minor modifications. Briefly, MAE was performed using a microwave (Monowave TM 200, Anton Paar, Graz, Austria), with 1 g of sample and a constant solute:solvent ratio of 1:20 w/v for 20 min. For PLE extraction, 5 g of the sample was inserted into the 90 mL extraction vessel, and its empty fraction was filled with layers of cotton and glass beads. Solvent was received into the system via an HPLC pump (Waters, Model 515, Milford, MA, USA), passed through a preheat vessel to reach the target temperature, and flowed downstream through the extraction vessel. After 100 bar was reached, the regulator valve was opened, and the extraction began in continuous mode at 5 mL/min. During the extraction process, 100 mL of ethanol was used, maintaining the same solute:solvent ratio of 1:20 w/v.

**Conventional extraction** – conventional extraction was performed as a control with the same solute:solvent ratio of 1:20 w/v, according to Santos *et al.* (2019)(Santos et al., 2019) with modifications. Shortly, 200 mg of sample were manually macerated with 10 mg of celite and 4 mL of ethanol (100%). Samples were agitated (25 °C for 20 min) (Multi Bio RS-24, Biosan, Brazil) and centrifuged (5000 *xg*, 10 min, 25 °C). The supernatants were reserved, and the extraction was repeated. The extraction was repeated twice, and the collected supernatants were combined.

Finally, all extracts were evaporated (Fisatom, Model 801, SP, Brazil), weighed and stored in amber tubes at -18 °C. For Folin-Ciocalteu and DPPH antioxidant activity, extracts were resuspended in 100% ethanol (final concentration of 5 mg/mL for samples), filtered using a nylon filter of 0.22 µm and stored in amber tubes at -18 °C.

## 2.4 Total reducing capacity and antioxidant activity

The total reducing capacity (TRC) was estimated by the Folin-Ciocalteu(Singleton et al., 1999) method adapted for microplates (Flex Station III, Molecular Devices) at 750 nm. TRC was expressed in milligrams of gallic acid equivalent per gram of extract (mg GAE/g extract) or per gram of BSG on a dry basis (mg GAE/100 g BSG). The antioxidant activity against the DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil) was determined in triplicate(Brand-Williams et al., 1995) at 517 nm with modifications in a microplate reader. The results were expressed in

µmol of Trolox equivalent per gram of extract (µmol TE/g extract) or per 100 g of BSG on a dry basis (µmol TE/100 g BSG).

## 2.5 Targeted UHPLC-PDA-MS analysis

Samples of BSG extracts obtained by conventional and non-conventional methods were injected into an ultra-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection and mass spectrometry (UHPLC-PDA-MS, Acquity, Waters Co., Milford, MA, USA) following the methodology described by Arruda et al.(2018), with minor modifications. Three analytical standards of phenolic compounds (caffeic, ferulic and *p*-coumaric acid) were prepared (0.005 - 100 ppm) and separately injected in triplicate to confirm the phenolic identification and to quantify their content in the analyzed samples.

The separation system was carried out in a Kinetex® 2.6 µm C18 100 Å LC Column 100 x 4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA), and the mobile phases consisted of 0.1% formic acid in water (eluent A) and methanol (eluent B). The gradient elution conditions were as follows: 0-1 min (5% B); 1-4 min (5-60% B); 4-7 min (60-70% B); 7-10 min (70-100% B); 10-10.5 min (100% B); 10.5-11 min (100-5% B); 11-15 min (5% B). The chromatography conditions were: 0.4 mL/min flow rate, and injection volume of 10 µL. UV spectra were recorded from 210 to 400 nm at a  $\lambda_{\text{max}}$  of 350 nm, and MS analysis was conducted in negative ionization mode (100 - 1000 Da) with a voltage of 15 V, capillary voltage of 0.8 kV, and probe temperature of 600 °C.

All results were expressed as the mean value ± standard deviation of duplicate assays. Empower 3 software (Waters, Alliance, Milford, MA, USA) was used for data processing.

## 2.6 Nanoencapsulation with lipid carriers by melt dispersion technique

### Simple emulsion

NLC containing the BSG extracts were prepared by the melt dispersion technique(de Meneses et al., 2019), with some modifications. The surfactant Tween 80 (3% in relation to the water, w/w) was dissolved in deionized water (10 g). Lipid phase (1g) was prepared by combining carnauba wax (CW) and crodamol in six different conditions varying time and ultrasonic amplitude (Table S1). To increase the extract encapsulation in the simple emulsion (SE), the addition of 0.01 g of soy lecithin (1% in relation to the lipid phase, w/w) in the lipidic

phase was evaluated (SE+L). The aqueous and lipid phases were magnetically stirred at 95 °C, ~10 °C above the melting point of the CW (82.40 °C, Figure S1, Table S2) until complete melting. The alcoholic BSG extract solution (5 mL, 10 mg/mL) was previously heated to 75 °C to avoid quick ethanol evaporation, and then was mixed with the lipid phase. Both phases were pre-emulsified under vigorous magnetic stirring for 3 min. The coarse emulsion formed was sonicated under heat for 1 min (30 s on/ 10 s off) at 70 % amplitude (VC 505 Vibra-Cell Ultrasonic Processor, Sonics & Materials, tip probe size of ½ in, Newtown, USA). Finally, the miniemulsion obtained was poured into cold water (90 mL at 4 °C) to promote the rapid solidification of wax nanoparticles. An emulsion with half the concentration of extract (5 mL, 5 mg/ml) was also evaluated (SE-E).

### **Double emulsion**

Double emulsion (DE) was prepared with the lipid phase (1 g) containing the CW or a mixture of CW and crodamol melted in the same conditions as SE. Soy lecithin was added (1% in relation to the lipid phase, w/w) as a stabilizer. The internal aqueous phase (0.5 mL of deionized water, W1) was heated at the same temperature. The BSG extract (5 mL, 10 mg/mL) was heated to 75 °C and then, was mixed with the lipid phase at 95 °C. The W1 aqueous phase was added under magnetic stirring (15 min) to form a coarse emulsion that was sonicated for 30 s at 70 % amplitude. Immediately after obtaining the W1/O emulsion, an external aqueous phase (10 g of deionized water and 3% of Tween 80 to water, W2) pre-heated at the same temperature was added and ultrasonically emulsified (30 s on/10 s off) at 70 % amplitude to obtain the DE (W1/O/W2).

Then, the double miniemulsion was poured over 90 mL of cold deionized water (4 °C), which allowed the nanoparticles solidification, avoiding possible aggregation or coalescence during the process.

### **2.7 Characterization of nanostructured lipid carriers**

Intensity average diameters of the NLC (D<sub>p</sub>) and the polydispersity indexes (PDI) were measured by Dynamic Light Scattering – DLS (Zetasizer Nano S, Malvern Instruments, Malvern, England) at 25 °C using a glass cuvette. The samples were diluted with deionized water before analysis. Results are expressed as the average of 2 experiments. The stability of the nanoparticles over time was assessed by size measurements, for a period of up to 50 weeks.

The morphology of the NLC was examined using Transmission Electron Microscopy (TEM) instrument operating at 80 kV (JEM-101, Tokyo, Japan). Each sample was diluted to

0.1% in deionized water (w/w), and a droplet was then deposited onto a carbon-coated 400-mesh copper grid and allowed to dry at ~25 °C.

### **2.8 Encapsulation efficiency**

The BSG extract encapsulation efficiency (EE) was determined by measuring the total reducing capacity (TRC) by Folin-Ciocalteu(Singleton et al., 1999) (please refer to 2.3 section) of the unencapsulated extract in the aqueous phase of the NLC dispersion. The NLC were separated from the aqueous phase by centrifugation using an Amicon® Ultra filter (0.5 mL, 100 kDa, Merck) at 13,400 rpm for 30 min (Centrifuge MiniSpin, Eppendorf). Then, an aliquot of the filtrate was analyzed, and the encapsulation efficiency (EE) was quantified by Equation 1:

$$EE (\%) = \left( 1 - \frac{TRC2}{TRC1} \right) * 100 \quad (1)$$

Where TRC2 is the TRC found in the aqueous phase after centrifugation and TRC1 is the initial TRC in the extract at the same dilution as the nanocarrier system(Niknam et al., 2020).

### **2.9 Statistical analysis**

Statistical analysis was carried out to compare the data obtained using GraphPad Prism software (5.0), considering a statistical significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) for tests comparing means between groups using ANOVA, with the post-Tukey test.

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1 Selection of fermentation time in phenolic compounds release**

For preliminary analyses, fermentation kinetics were carried out to follow the antioxidant activity, based on the conventional extraction. SSF promoted a sharply release of phenolic compounds during the first two days of fermentation, resulting in a 5-fold increase in reducing capacity and a 7-fold increase in antioxidant activity compared to control unfermented BSG (Figure. 1). This result is due to the catalytic enzymes produced from the filamentous fungus that break down the bonds between antioxidant compounds and the lignocellulosic matrix(Maia et al., 2020). The autoclaved BSG, even before fermentation, also showed an interesting result, the intense temperature applied (i.e. 110 °C for 30 min) starts to promote the

release of the antioxidant compounds. Beyond 48 h (days 3 to 7), these levels stabilized, demonstrating that two days of fermentation were sufficient for phenolic release. These findings corroborate previous research, where SSF of agro-industrial waste increased antioxidant activity by 2.3 times, and with the peak activity occurring within the first 2 days of fermentation (Leite et al., 2021). Based on these results, a fermentation period of 2 days was selected for BSG in subsequent analyses.

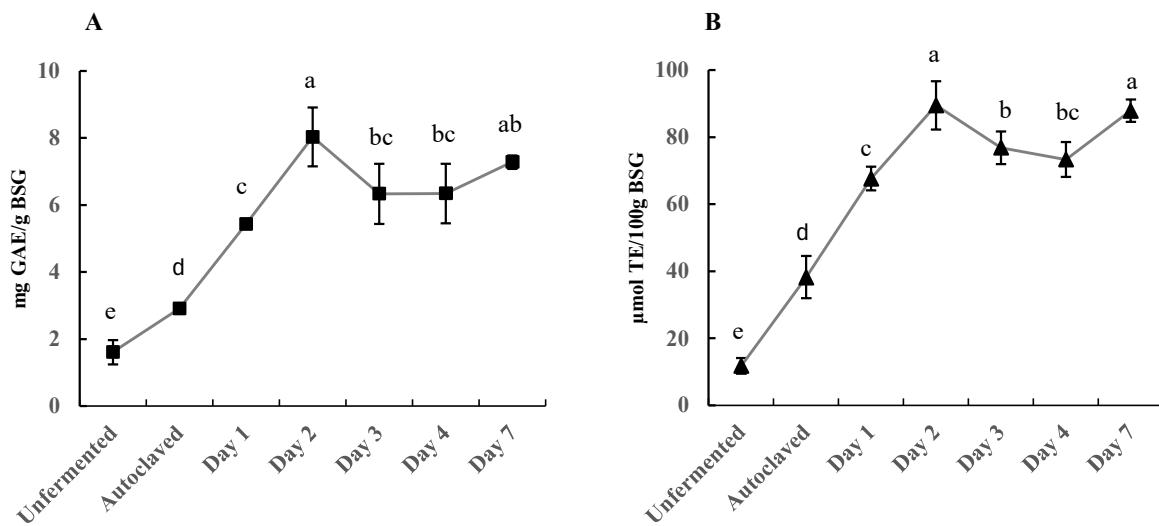


Figure. 1. Fermentation kinetics. (A) Reducing compounds (Folin-Ciocalteu) and (B) antioxidant capacity (DPPH). Values are mean  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ). Different letters mean a significant difference ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Effect of the extraction temperature of phenolic compounds using unconventional techniques

After determining the fermentation time to maximize phenolic compound availability, optimal extraction conditions were investigated. The control unfermented BSG and 2-day fermented BSG (BSG-F) samples were subjected to unconventional extraction methods (MAE and PLE) at different temperatures. Conventional extraction was used as a control. The obtained extracts were weighed to calculate the yield in each sample and considered it in the results (Figure S2). Antioxidant activity in each temperature, measured by the DPPH method, is presented in Figure 2 and expressed per g of extract (A) and per 100 g of BSG sample (B).

Overall, raising the extraction temperature had a positive effect on both BSG-F and BSG samples across both techniques, resulting in a progressive increase in extract yield (Figure. S2) and antioxidant activity (Figure. 2). At the lowest temperature (50 °C), BSG extracted by PLE exhibited nearly 10 times higher antioxidant activity, and by MAE, 11 times higher, compared to conventional extraction (Figure. 2A), underscoring the greater efficiency of unconventional extractions.

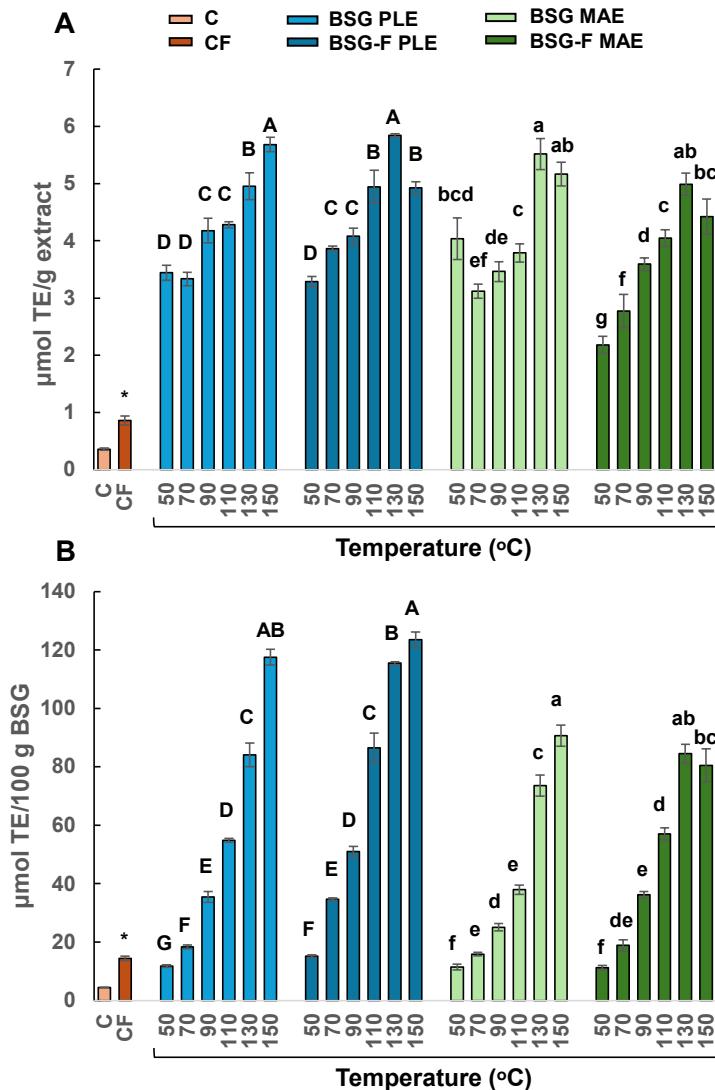


Figure 2. Antioxidant capacity (DPPH) expressed as  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalent (TE) in relation to the extract (A) and in relation to BSG (B). Results are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). C: control; PLE: pressurized liquid extraction; MAE: microwave-assisted extraction; F: fermented. Different lowercase letters mean a statistically significance ( $p < 0.05$ ) between PLE extracts and capital letters between MAE extracts, and \* compares C samples.

As temperature increased, antioxidant activity in the extracts and extract yield continued to rise, enhancing the antioxidant activity relative to BSG. The high temperatures applied in both extraction techniques enhanced the action of the solvent, decreasing its viscosity and surface tension, increasing the solvent transport to the matrix sample and accelerating the extraction of compounds (Herbst et al., 2021).

In the 2-day fermented samples, SSF had a predominant effect on phenolic extraction and the yield of the obtained extracts increased in average 25% for both extraction techniques (Figure. S2). Compared to control (unfermented), the yield of BSG-F samples increased 1.5 and 2.0 folds with MAE-F and PLE-F, respectively (Figure S2). This result is expected, as SSF generates enzymes that facilitate biomass degradation, enhancing solvent penetration into BSG and thereby improving the accessibility and extractability of phenolic compounds(Londoño-Hernández et al., 2017). While this progressive increase was evident in both methods, in MAE-F, the impact of fermentation on the extraction yield diminished at temperatures above 130 °C (Figure S2). This change is marked by an inflection point at 130 °C, from which the yield of MAE-F samples is lower than that of unfermented samples extracted by PLE.

The antioxidant potential of fermented samples exhibited a similar trend (Figure 2). SSF significantly enhanced the BSG-F PLE antioxidant activity, showing higher activity at nearly all temperatures when compared to unfermented BSG PLE (Figure 2B). No significant difference ( $p > 0.05$ ) was observed between fermented and unfermented BSG PLE at 150 °C (Figure 2B). For MAE, SSF similarly increased antioxidant activity; although at extreme temperatures (50 °C and 150 °C;  $p > 0.05$ ), SSF showed minimal impact on BSG. This indicates that SSF is an effective pretreatment for maximizing phenolic compound utilization in BSG, with the greatest efficiency observed at intermediate temperatures (70–130 °C) across both extraction methods. Based on the data discussed, two optimal temperatures - 130 °C and 150 °C - were selected for unconventional extractions.

### **3.3.Comparison between unconventional extraction methods of phenolic compounds**

Sections 3.1 and 3.2 of this study focused on identifying optimal parameters for phenolic recovery and valorization of BSG. With the SSF duration (2 days) and extraction temperatures (130 and 150 °C) established, only these selected samples were prioritized for further analysis. The data presented above highlights the effectiveness of unconventional extraction methods compared to the control (solid-liquid extraction) and compare which method is most advantageous (MAE and PLE). Initially, PLE demonstrated slightly superior results ( $p < 0.05$ )

when compared to MAE, yielding better extraction results at both 130 and 150 °C (Figure 2 and S2).

Evaluating the total reducing capacity of the samples (Figure 3), there were no significant differences between MAE and PLE ( $p > 0.05$ ), indicating that both extraction methods exhibited similar responses to temperature variations and the application of SSF pretreatment. Interestingly, this pattern differed from that observed for the antioxidant activity of the extracts (Figure 2), where PLE at 130 and 150 °C, before SSF (14% and 30%, respectively) and after SSF (37% and 53%, respectively) showed superior performance compared to MAE (Figure 2). These findings lead to two hypotheses: 1) the enhanced antioxidant capacity may be attributed to other compounds that were more effectively extracted via PLE; and 2) PLE recovers a distinct phenolic profile than MAE, with these phenolic classes exhibiting greater antioxidant activity.

In addition, the literature highlights several operational benefits of PLE compared to MAE. PLE requires less solvent and shorter extraction times, making it more economical for industrial-scale applications. Moreover, PLE involves fewer operational steps, as most instruments are automated and produce a pre-filtered extract, which enhances reproducibility and reduces labor.

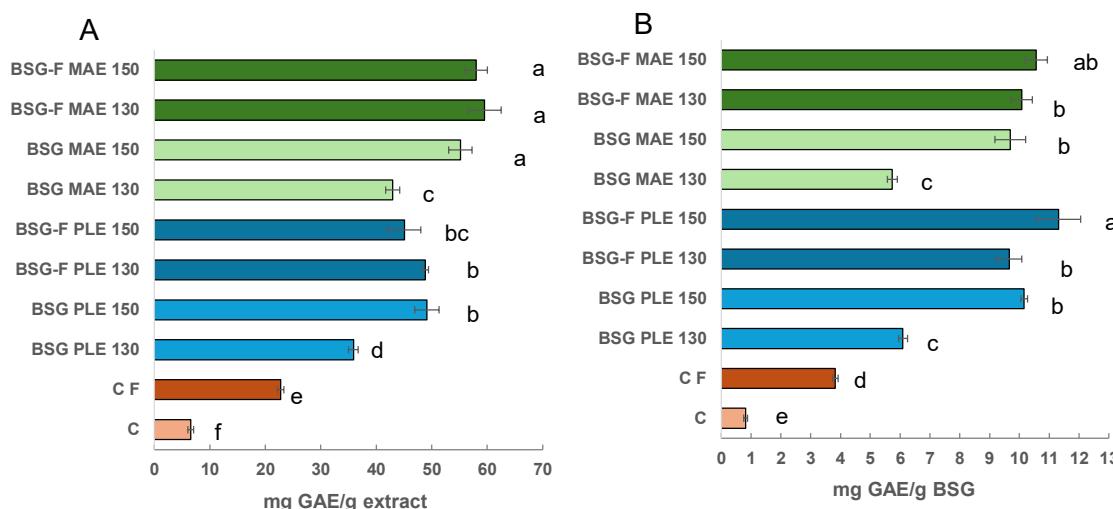


Figure 3. Reducing capacity of Folin-Ciocalteu expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) in relation to the extract (A) and in relation to BSG (B). Different letters mean a significant difference ( $p < 0.05$ ). C: control; PLE: pressurized liquid extraction; MAE: microwave-assisted extraction; F: fermented. The values 130 and 150 correspond to the extraction temperature in °C.

To sum up, PLE emerges as the most promising extraction method investigated in this study, supporting the hypothesis that it facilitates the extraction of phenolic compounds with enhanced antioxidant properties. To validate this hypothesis and to establish PLE as the selected extraction method for BSG, further analysis using more specific and sensitive techniques, such as UHPLC-MS/MS, is recommended.

### **3.4. Quantification of phenolic compounds by UHPLC-PDA-MS**

BSG-F and BSG extracts obtained via PLE, MAE, and conventional techniques were analyzed using UHPLC-PDA-MS. For absolute quantification, three hydroxycinnamic acids typically found in BSG extracts, ferulic acid (FA), *p*-coumaric acid (*p*-CA) and caffeic acid were employed(Maia et al., 2020). The quantification of *p*-CA and FA are presented in Table 1 based on the quantification within the extract, as well as relating to BSG sample, considering the yield. Surprisingly, caffeic acid was not identified in any of the samples. Nevertheless, these data agree with another study that revealed the presence of coumaric and ferulic acids, and the absence of caffeic acids, in extraction with PLE in BSG (Amaya-Chantaca et al., 2022).

FA and *p*-CA are hydroxycinnamic acids generally found covalently cross-linked with proteins, lignin, hemicellulose, and/or polysaccharides through ether or ester bonds in the cell wall, making them difficult to recover (Kumar & Pruthi, 2014; Zago et al., 2022). In this work, SSF was an effective bioprocess for releasing these phenolic acids (Table 1). Using a conventional extraction (control), fermentation (C-F) increased the levels of FA by five times and *p*-CA by 19% in BSG. This effect may be attributed to the action of enzymes produced by the fungus during SSF, which facilitates the cleavage of bonds between phenolic compounds and the cell wall. Once again, SSF demonstrated its essential role in the valorization of important compounds in BSG.

Table 1. Phenolic compounds content from brewer's spent grain (BSG) extracts.

Sample	T (°C)	Ferulic acid		<i>p</i> -Coumaric acid		Total (BSG) (mg/100 g)
		Extract (mg/100 g)	BSG (mg/100 g)	Extract (mg/100 g)	BSG (mg/100 g)	
C	-	2.75 <sup>d</sup> ± 0.11	0.34 <sup>c</sup> ± 0.01	0.38 <sup>c</sup> ± 0.00	0.05 <sup>c</sup> ± 0.00	0.39 <sup>c</sup> ± 0.01
C-F	-	9.62 <sup>c</sup> ± 0.66	1.62 <sup>cd</sup> ± 0.11	0.34 <sup>c</sup> ± 0.06	0.06 <sup>c</sup> ± 0.01	1.67 <sup>d</sup> ± 0.12
BSG PLE	130	8.66 <sup>c</sup> ± 0.07	1.47 <sup>d</sup> ± 0.01	2.00 <sup>c</sup> ± 0.03	0.34 <sup>c</sup> ± 0.00	1.8 <sup>cd</sup> ± 0.02
BSG-F PLE	130	20.53 <sup>a</sup> ± 1.12	4.06 <sup>a</sup> ± 0.22	1.37 <sup>d</sup> ± 0.22	0.27 <sup>cd</sup> ± 0.04	4.33 <sup>a</sup> ± 0.26
BSG PLE	150	17.47 <sup>b</sup> ± 0.46	3.61 <sup>ab</sup> ± 0.10	2.18 <sup>bc</sup> ± 0.08	0.45 <sup>b</sup> ± 0.02	4.06 <sup>a</sup> ± 0.08
BSG-F PLE	150	15.96 <sup>b</sup> ± 0.45	4.00 <sup>a</sup> ± 0.11	1.91 <sup>c</sup> ± 0.07	0.48 <sup>b</sup> ± 0.02	4.48 <sup>a</sup> ± 0.09
BSG MAE	130	15.27 <sup>b</sup> ± 0.09	2.04 <sup>c</sup> ± 0.01	1.98 <sup>c</sup> ± 0.27	0.26 <sup>cd</sup> ± 0.03	2.30 <sup>c</sup> ± 0.05
BSG-F MAE	130	20.46 <sup>a</sup> ± 1.30	3.46 <sup>b</sup> ± 0.22	1.28 <sup>d</sup> ± 0.07	0.22 <sup>d</sup> ± 0.01	3.68 <sup>b</sup> ± 0.23
BSG MAE	150	9.80 <sup>c</sup> ± 0.82	1.72 <sup>cd</sup> ± 0.14	3.46 <sup>a</sup> ± 0.02	0.61 <sup>a</sup> ± 0.00	2.33 <sup>c</sup> ± 0.14
BSG-F MAE	150	8.37 <sup>c</sup> ± 0.34	1.52 <sup>d</sup> ± 0.06	2.58 <sup>b</sup> ± 0.10	0.47 <sup>b</sup> ± 0.02	1.99 <sup>cd</sup> ± 0.04

C: control; F: fermented; BSG: Brewer's spent grain; PLE: pressurized liquid extraction; MAE: microwave-assisted extraction; T: extraction temperature. Different letters mean a significant difference ( $p < 0.05$ ).

These hydroxycinnamic acids are bioactive compounds showing significant antioxidants, anti-inflammatory, and antimicrobial properties, contributing to their potential in promoting health and preventing chronic diseases development (Coman & Vodnar, 2020). Due to these attributes, FA and *p*-CA are highly valued in the nutraceutical, cosmetic, and pharmaceutical industries, where they aid in developing functional foods, natural preservatives, and anti-aging products. Enhancing the extractability of these compounds BSG not only increases the utility of this abundant byproduct but also aligns with sustainability goals, adding value to waste material within a circular economy framework.

Comparing extraction methods, an increase in FA was observed in PLE for both fermented and unfermented samples, at 130 and 150 °C. In unfermented samples (BSG PLE),

FA levels were approximately 3 and 12 times higher than the controls at 130 and 150 °C, respectively. After SSF (BSG-F PLE), the increase was less pronounced but still significant, with FA levels at both temperatures being 2.5 times higher than the control. A similar pattern was noted for *p*-CA: in unfermented samples, levels increased in approximately 7 and 9 times at 130 and 150 °C, respectively, while in SSF samples, the increases were more modest, at 5 and 8 times higher than controls at 130 and 150 °C, respectively. This behavior can be attributed to the efficiency of SSF alone in releasing these compounds rather than the effect of temperature or extraction techniques. While PLE enhances the extractability of phenolic acids in BSG, SSF serves as the primary mechanism for liberating phenolics that were previously bound to the food matrix.

A similar trend was observed with MAE, showing increased FA and *p*-CA levels compared to the control, although the increase was less pronounced in SSF-treated samples. However, two key differences emerged when compared to PLE: 1) at 130 °C, MAE yielded higher results for both fermented and unfermented samples than 150 °C; and 2) MAE at 150 °C applied to BSG-F did not affect ferulic acid levels. These findings can be useful to select optimal parameters, such as temperature, for targeting specific compounds or the desired phenolic composition in the extract.

It is important to note that FA and *p*-CA together accounted for only 3% of the total phenolics quantified by the total reducing capacity method (shown previously in Figure 3). While FA and *p*-CA are among the most abundant compounds in BSG, this matrix is rich in a wide variety of phenolic compounds from different classes. This study focused on a targeted analysis of these two compounds, as the full characterization of BSG extract had already been performed previously and considering that the primary composition of the BSG (beer type) also has an influence on the compounds obtained (Maia et al., 2020). It is also important to mention that the difference between malts type also impacts the way fermentation behavior, it means that the phenolic profile seems to differ between the type of the fermented BSG (Maia et al., 2020).

An abundant peak detected at the retention time around 9.1 min was observed in all samples, as shown in the chromatogram relative to the unfermented MAE 150 °C sample (Figure S3.A), which exhibited a  $\lambda$  max of 352.5 nm (Figure S3.B). Based on the Metabolomics Standards Initiative identification level 3 (Figure S3.C), this compound can be annotated as 3,7-dimethylquercetin. This flavonoid was also previously reported by Maia et al. (Maia et al., 2020)

as one of the main compounds found in BSG extracts, notable for having potent antioxidant, anti-inflammatory, antiviral and anticancer properties (Aghababaei & Hadidi, 2023).

Since PLE showed more favorable results than MAE in terms of bioactive content, including both total reducing capacity and the extractability of hydroxycinnamic acids, it was identified as the most promising unconventional extraction method for phenolic valorization of BSG. Consequently, only the extracts obtained through PLE were advanced to the nanoencapsulation phase.

### 3.5.Nanostructured lipid carriers

Preliminary tests were performed without the extracts to determine the formulation and ultrasonic emulsification conditions for the nanoencapsulation experiment (Table. S1). Six miniemulsion formulations (Mini) were tested. The first tested formulation (Mini-1) used an emulsion consisting of 1g of carnauba wax (without crodamol and without final cooling). This formulation exhibited a high polydispersity index (PDI) (Table. S1), suggesting that the solidification process might have been incomplete, leading to particle aggregation and coalescence. Consequently, a new nanoparticle solidification method was implemented, in which the miniemulsion was immediately poured into 90 mL of deionized water at 4 °C after emulsification. Additionally, the liquid lipid crodamol was incorporated to lower the melting point of the lipid mixture, helping to prevent premature solidification (de Meneses et al., 2019). The revised solidification method and modified organic phase composition (Mini-2) decreased the PDI, though it remained above the target threshold ( $\geq 0.2$ ). Increasing sonication time to 120 s (Mini-3) achieved the desired values, with further increases, up to 210 s (Mini-4 and Mini-5), leading to no additional improvements. However, raising the amplitude to 70% (Mini-6) significantly reduced both particle size and PDI compared to Mini-3, establishing these conditions as optimal for encapsulation tests. Based on these preliminary findings, the Mini-6 formulation was selected to produce NLC with the PLE extracts: BSG (150 °C) and BSG-F (130 °C).

After selecting the emulsion composition, BSG extracts were incorporated into the NLC through simple and double emulsion (Table 2). The NLC containing extracts showed slightly larger particle sizes when prepared by melt dispersion with double emulsification than by simple emulsification. In all cases, particle sizes remained below 300 nm with narrow size distributions. To enhance encapsulation of the extract's phenolic compounds - which was

around 30% in the simple emulsion – several new strategies were tested. For instance, adding soy lecithin to the lipidic phase (SE+L), which acts as a stabilizer by reducing the migration of hydrophilic compounds from the lipid to the aqueous phase, did not significantly impact encapsulation efficiency. Similarly, reducing the extract concentration in the simple emulsion (SE-E) showed no significant effect.

Table 2. Comparison between simple emulsion (SE) and double emulsion (DE) techniques on average particle diameter (D<sub>p</sub>), polydispersity index (PDI), and encapsulation efficiency (EE).

Emulsion type	Extract	D <sub>p</sub> (nm)	PDI	EE (%)
SE	-	231 ± 11	0.175 ± 0.02	-
	BSG	251 ± 31	0.167 ± 0.05	34.3 ± 5.6
	BSG-F	260 ± 9	0.147 ± 0.01	28.4 ± 2.8
SE+L	BSG	223 ± 8	0.132 ± 0.003	23.2 ± 4.8
	BSG-F	225 ± 1	0.149 ± 0.020	30.7 ± 7.6
SE-E	BSG	254 ± 1	0.212 ± 0.010	26.3 ± 3.8
	BSG-F	216 ± 1	0.129 ± 0.007	25.9 ± 2.6
DE	-	239 ± 1	0.204 ± 0.003	-
	BSG	294 ± 2	0.194 ± 0.020	33.9 ± 5.3
	BSG-F	288 ± 3	0.203 ± 0.007	34.7 ± 5.8

Values refer to the average of duplicate experiments. SE: simple emulsion; SE+L: simple emulsion with soy lecithin; SE-E: simple emulsion with less extract; DE: double emulsion; BSG: unfermented extract; BSG-F: fermented extract.

The double emulsion technique aimed to create a water reservoir within the lipid nanoparticles, enabling hydrophilic compounds to diffuse and remain inside the carriers. However, the encapsulation efficiency with this technique was similar to that of simple emulsion. Despite the lower encapsulation efficiency compared to other extract nanoencapsulations (Hady et al., 2022), the bioactive properties of the non-encapsulated extract - free in the aqueous phase - remain accessible as antioxidants and retain their health-promoting properties. Therefore, when NLCs are used as a colloidal dispersion, including the aqueous

phase in which they were obtained, these properties function alongside the encapsulated extract, which enables controlled release in the gastrointestinal tract. It is important to note that the encapsulation efficiency was assessed based on phenolic compound quantification, and the presence of other compounds in the extract may have different solubilities (phase partition coefficients), which could affect encapsulation efficiency depending on the basis used for calculation.

The nanometric size range of NLC, with diameters consistent with those measured by DLS, was confirmed by TEM images (Figure.4). Simple and double emulsion samples with unfermented BSG extracts were tested. The NLC exhibited a narrow size distribution, spherical shape, smooth surface, and uniform appearance, indicating that no core-shell morphology was formed, with Crodamol and extract uniformly distributed within the lipid matrix. This morphology is typical for NLC formulations composed of a mixture of solid and liquid lipids(de Meneses et al., 2019).

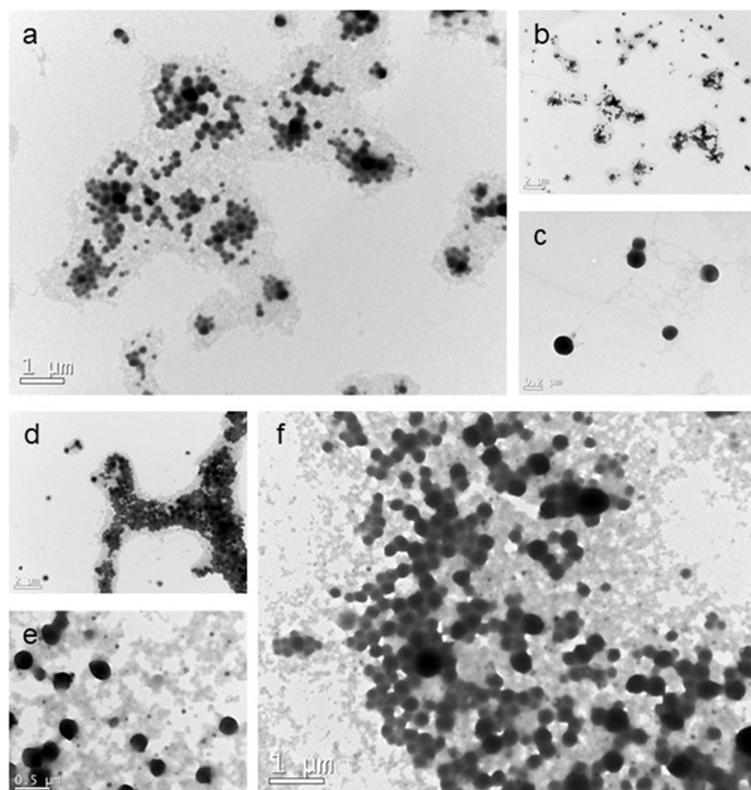


Figure. 4. TEM micrographs of nanostructured lipid carriers containing unfermented brewers spent grain extracts, prepared using (a-c) melt dispersion technique and (d-f) the double emulsion/ melt dispersion technique.

Finally, D<sub>p</sub> and PDI were measured over time, and all NLCs by SE demonstrated good stability (Figure. 5), as did those prepared by DE (data not shown). Particle size remained consistent with no significant changes in dispersion, indicating no destabilization for at least 50 weeks. Stability is an important factor in determining the shelf life of a product containing the emulsion (Ravera et al., 2021). A longer shelf life enhances the product quality and safety, emulsion efficacy, and consumer appeal, maintaining the product's integrity and performance over time.

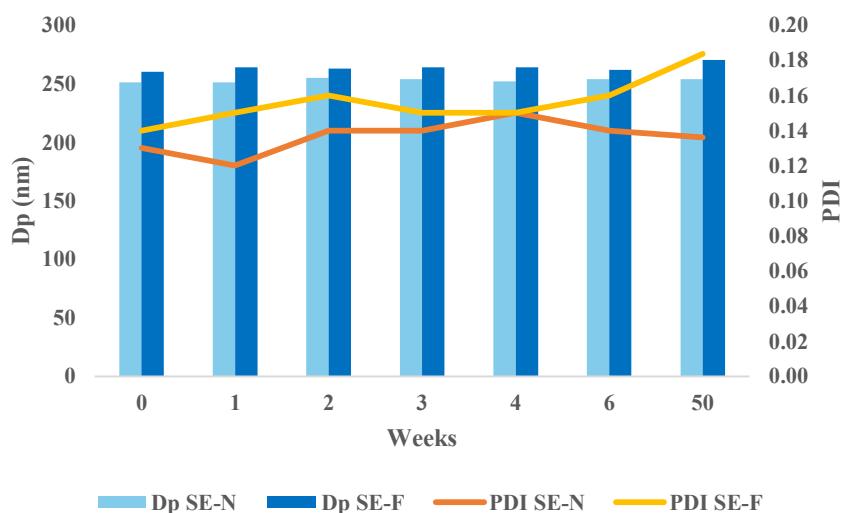


Figure. 5. Values of average particle diameter (D<sub>p</sub>) and polydispersity index (PDI) over time for NLCs obtained by simple emulsion (SE). Values represent the average of duplicate experiments. N – non-fermented extract; F – fermented extract.

#### 4. CONCLUDING REMARKS

This study introduced innovative approaches by combining sustainable techniques to recover valuable compounds from BSG. The kinetics of SSF showed that two days was enough to obtain the maximum phenolic extractability. PLE and MAE extractions at 130 and 150 °C allowed the highest yields and recovery of phenolic and antioxidant compounds. The UHPLC-PDA-MS analysis demonstrated increased amounts of hydroxycinnamic acids in fermented samples especially subjected to PLE. Encapsulation of phenolic compounds in lipid nanocarriers achieved up to 35% efficiency and were stable up to 50 weeks. Notably, the non-encapsulated extract retained bioactivity in the aqueous phase, which could be applied to extend

the shelf life of food products. In this way, BSG point out as a valuable source of bioactive compounds, making it a key byproduct for the circular economy due to its high industrial availability and rich phenolic profile. This work contributes to the valorization of BSG through biotechnological and green processes, supporting its application in functional foods and nutraceuticals. Future perspectives include exploring new encapsulation techniques to improve the capture and protection of bioactive compounds.

## **CONFLICTS OF INTEREST**

The Authors declare that they have no conflict of interest.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors acknowledge the Central Electron Microscopy Laboratory (LCME) at the Federal University of Santa Catarina (UFSC) for TEM analyses.

## **FUNDING SOURCES**

This work was financed by Foundation for the Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) (26/201.317/2022; E-26/210.152/2023, E-26/210.008/2024); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (401053/2019-9; 314100/2023-7; 407350/2023-3); The São Paulo Research Foundation (FAPESP) (2023/11025-6, 2018/14582-5, and 2019/13496-0); Coordination for Improvement of Personnel with Higher Education (CAPES) (financial code 001) and supported by UNIRIO.

## Supplementary material

### Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Carnauba raw wax was analyzed by Differential Scanning Calorimetry under a nitrogen atmosphere (20 mL/min) at a heating rate of 10 °C/min on a Jade DSC (Perkin Elmer) calorimeter. The phase change latent heat ( $\Delta H_m$ ) and the melting temperature ( $T_m$ ) were recorded from the second heating ramp from 0 °C to 110 °C.

## Supplementary Figures

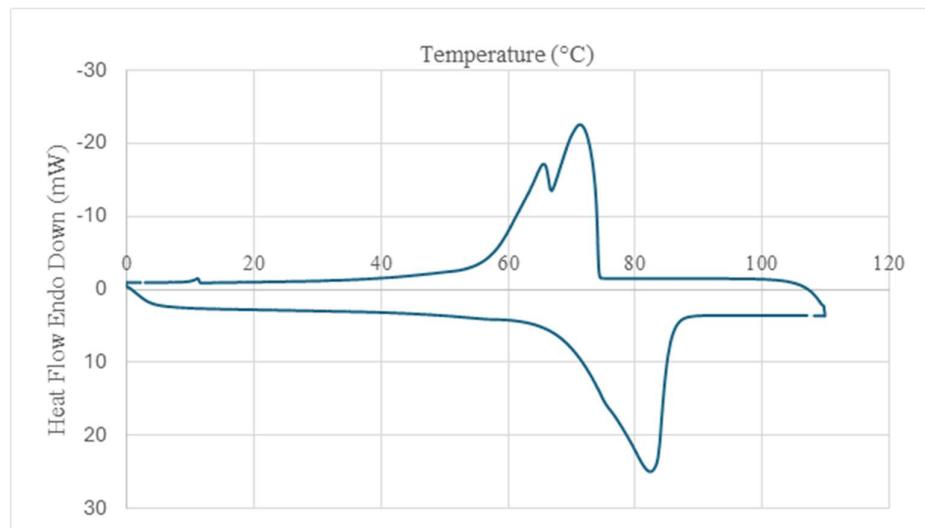


Figure S1. DSC curve of carnauba raw wax.

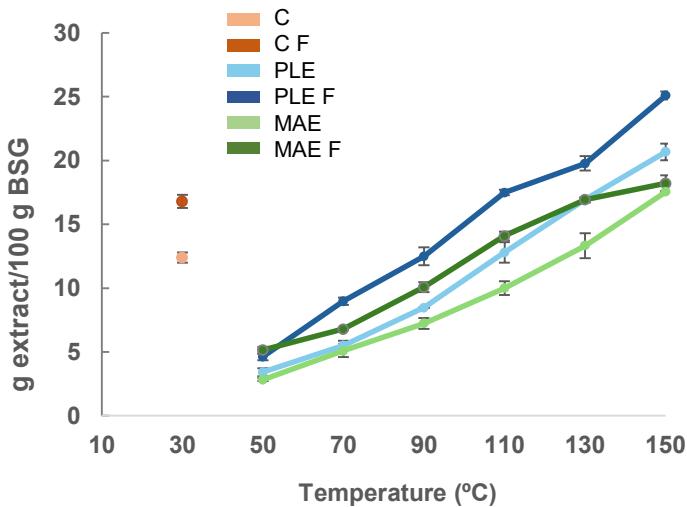


Figure S2. Extract yield with pressurized liquid and microwave-assisted extraction. BSG: Brewers spent grain; C: control; PLE: pressurized liquid extraction; MAE: microwave assisted extraction; F: fermented.

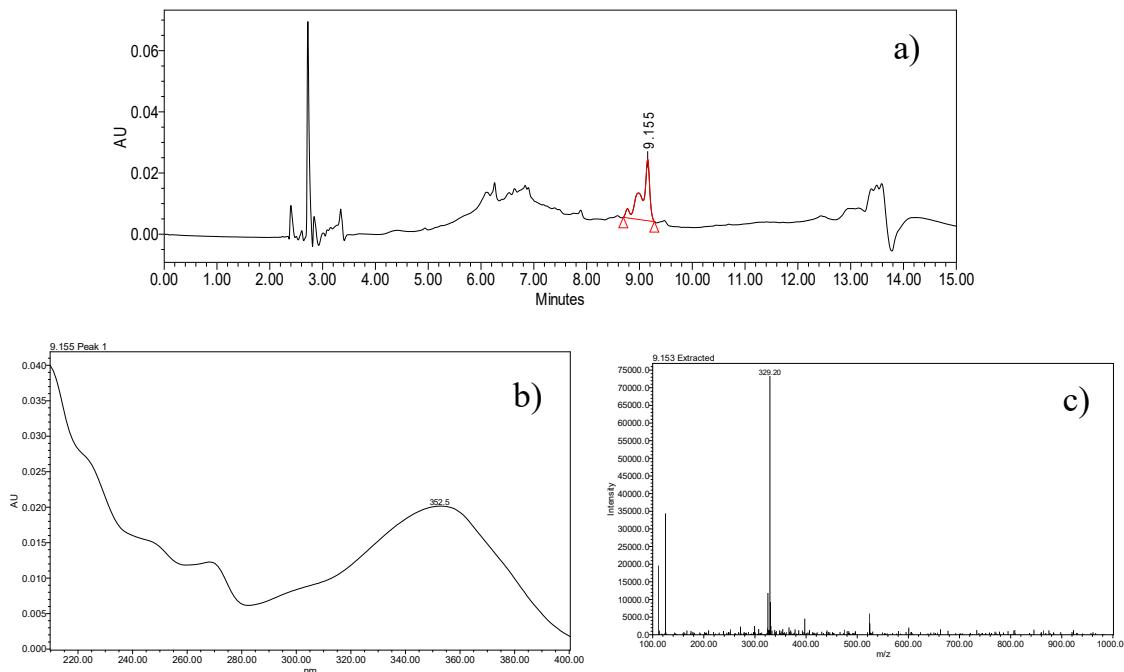


Figure S3: Chromatogram (a), UV spectrum (b) and mass spectrum of 3,7-dimethylquercetin (potential identification) (c). Non-fermented microwave extract (150 °C).

### Supplementary Tables

Table S1. Effect of crodamol content and ultrasonic emulsification conditions (amplitude and time) on average diameter particle (D<sub>p</sub>) and polydispersity index (PDI) of blank carnauba wax nanoparticles in simple emulsion.

Formulation	CW (g)	Crodamol (g)	Ultrasonic				D <sub>p</sub> (nm)	PDI		
			Emulsification		Water 4 °C					
			Amplitude (%)	Time (s)						
Mini-1	1.0	-	50	60	-	115 ± 1	0.530 ± 0.008			
Mini-2	0.9	0.1	50	60	90 ml	154 ± 6	0.320 ± 0.006			
Mini-3	0.9	0.1	50	120	90 ml	270 ± 1	0.132 ± 0.001			
Mini-4	0.9	0.1	50	150	90 ml	246 ± 2	0.170 ± 0.001			
Mini-5	0.9	0.1	50	210	90 ml	264 ± 1	0.200 ± 0.002			
Mini-6	0.9	0.1	70	120	90 ml	223 ± 3	0.074 ± 0.007			

CW: Carnauba wax; Mini: miniemulsion formulation tested.

Table S2- Melting and crystallization temperatures (T) and enthalpies ( $\Delta H$ ) of carnauba wax (CW).

	Melting		Crystallization		
	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	T <sub>a</sub> (°C)	T <sub>β</sub> (°C)	ΔH <sub>c</sub> (J/g)
CW	82.40	171.61	65.64	71.42	-173.86

## **Capítulo 3 – EXPLORING BREWERS SPENT GRAIN AS A LOW-COST ADSORBENT FOR ENVIRONMENTAL APPLICATIONS**

Maia, I. C.<sup>a</sup>, Cechinel, M. A.<sup>b</sup>, Padoin, N.<sup>b</sup>, Cavalcanti, E. D. C.<sup>c</sup>, Dias, J. F.<sup>a</sup>, Soares, C.<sup>b</sup> and Ferreira, M. S. L.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Food and Nutrition Graduate Program (PPGAN), Nutrition School, Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Department of Chemical Engineering and Food Engineering (EQA); Federal University of Santa Catarina (UFSC), Santa Catarina, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Microbial Biotechnology, Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

---

### **Highlights**

- Brewer's spent grain effectively removes methylene blue from water solutions.
- Mesopores in BSG enhance its capacity for MB adsorption.
- Solid State Fermentation increases BSG surface area significantly.
- PLE extraction residue shows an adsorption capacity of 12.8 mg/g at pH 7.
- Grain's functional groups lose sorption ability after 3 reuse cycles.

**Este capítulo está em processo de submissão no Food Bioscience (Fator de Impacto: 4.8; Qualis CAPES: A2).**

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ABSTRACT

Brewers' spent grain (BSG) is the largest byproduct of the brewing industry, generating 20 kg of waste per 100 L of beer produced. This study explored the potential of post-extraction residues (PER) from BSG extracted by using pressurized liquid extraction (PLE), as sustainable adsorbents for methylene blue (MB) dye removal from wastewater. Both fermented and unfermented BSG and their derived biochars were tested under varying conditions, including MB concentration, pH, and recycling cycles. The adsorption process was characterized by isotherm (Langmuir and Freundlich) and kinetic models (pseudo-first and pseudo-second order). PER exhibited the highest adsorption capacity (12.8 mg/g) at pH 7, attributed to increased surface area and mesoporosity created during the extraction process. Results showed a favorable fit to the Langmuir model, indicating monolayer adsorption. However, adsorption efficiency decreased after three reuse cycles due to loss of functional groups and incomplete desorption. This work demonstrated the potential of BSG-derived materials as a cost-effective and environmentally friendly adsorbents for water treatment. It highlights the value of integrating BSG into a circular economy framework by transforming an abundant industrial byproduct into a high-performance adsorbent for dye removal. These findings offer a sustainable alternative for mitigating water pollution while addressing waste valorization challenges in the brewing industry.

**Keywords:** Brewers spent grain, circular economy, wastewater treatment, adsorption, biochar.

## 1. INTRODUCTION

The exponential growth of industrialization and urbanization has significantly increased global human activities, resulting in substantial waste of natural resources and environmental pollution. A critical concern in the modern world is the rise in global water consumption. Excessive water use by industries and households has turned water sources into common disposal sites, impacting the ecosystem.

Brewers' spent grain (BSG) is a byproduct of the brewing industry, generating approximately 20 kg of waste per 100 L of beer produced. This lignocellulosic material, consisting of the husk of the original barley grain mixed with pericarp and seed coat layers, is rich in fibers, undigested starch, proteins, and minerals. Due to its high moisture content, BSG is often disposed of in landfills, used as animal feed, or incineration (Sganzerla et al., 2021). The valorization of BSG has gained momentum in recent years, especially as an industrial ingredient for creating high-value products due to its diverse range of health-beneficial compounds (Bonifácio-Lopes et al., 2020; Maia et al., 2020).

Additionally, the residue from this phenolic extraction, which is rich in cellulose, hemicellulose, and lignin, has significant potential as an effective adsorbent for water contaminants, thereby promoting circular economy practices. Research indicates that BSG is an excellent precursor for creating efficient, high-performance adsorbents for heavy metal pollution (Cechinel et al., 2022).

Adsorption is a process where molecules or ions from liquids or gases adhere to the surface of a solid material (Dąbrowski, 2001). It's commonly used in water purification to remove pollutants like heavy metals, dyes, or organic compounds. The waste materials and by-products from the agriculture and other industries could be assumed to be the low-cost adsorbents due to their abundance in nature and less processing requirements (Rafatullah et al., 2010). The versatility of BSG is supported by their fiber compounds (Jay et al., 2008) and the hypothesis behind using BSG as an adsorbent is supported by its large surface area and porous structure, which enable it to effectively capture contaminants in water. However, its application in treating dye-contaminated effluents remains unexplored.

The objective of this study was to apply a sustainable strategy for disposing of BSG residues generated after the extraction of phenolic compounds using pressurized liquids, in line with circular economic principles. Specifically, this research aimed to evaluate the adsorbent potential of BSG residues both before and after fermentation with *Aspergillus oryzae*, as well

as in their pyrolyzed form. The study likely emphasizes the dual benefits of using BSG: it helps address environmental pollution while also providing a new avenue for waste valorization. By exploring ways to enhance its adsorptive properties, BSG could become a valuable material in addressing global challenges related to water quality and waste management.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Brewers spent grain and sample treatment

Wet BSG was kindly donated by the brewery Brewpoint (Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil). All other samples used in this study were by-products obtained from extraction processes to recover bioactive compounds present in the raw material. BSG was fermented using the fungus *Aspergillus oryzae* for 2 days following the protocol described by Maia (2020), resulting in a sample referred to as BSG-F. Dry unfermented BSG was used as control. Both BSG and BSG-F underwent extraction using pressurized liquids (PLE) with 100% ethanol, producing extracts rich in bioactive compounds and generating post-extraction residue (PER and PER-F). For PLE, 5 g of the sample was inserted into the 90 mL extraction vessel, and its empty fraction was filled with layers of cotton and glass beads. The solvent was received into the system via an HPLC pump (Waters, Model 515, Milford, MA, USA), passed through a preheat vessel to reach 150 °C, and flowed downstream through the extraction vessel. After 100 bar was reached, the regulator valve was opened, and the extraction began in continuous mode at 5 mL/min. During the extraction process, 100 mL of ethanol was used, maintaining the same solute:solvent ratio of 1:20 w/v. The resulting extracts were used in another study, while the extraction residue was used in this study to evaluate its potential as an adsorbent. Samples were washed with distilled water to remove possible impurities, dried in a forced ventilation oven (Marconi, MA 035, São Paulo, Brazil) at 60 °C for 8 h to remove excess moisture, and then stored for further analysis.

Subsequently, the samples - BSG, BSG-F, PER, and PER-F - were subjected to carbonization to produce biochar. Approximately 5 g was placed in a fast-burning furnace reactor (ML 1300, Fortelab, São Carlos, Brazil) and carbonized at 350 °C with a heating rate of 5 °C/min for 105 min, condition previously established. After the pyrolysis process, samples were cooled naturally to room temperature ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and stored in sealed bottles until use. A total of 8 samples (Figure 1) were studied as adsorbents: unfermented BSG (BSG), fermented BSG (BSG-F), the post-extraction residues of unfermented (PER) and fermented (PER-F) BSG,

and the biochar obtained for each of these samples: BC1 obtained from the BSG sample, BC2 obtained from the BSG-F sample, BC3 obtained from the PER sample, and BC4 obtained from the PER-F sample.



Figure 1. Samples that were tested as adsorbents and the processes they underwent.

## 2.2 Samples characterization

Qualitative analysis of functional groups on sample surfaces was performed via Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) using Attenuated Total Reflectance (ATR). FTIR/ATR spectra were recorded using a spectrometer (BRUKER, model TENSOR II, Ontario, Canada). All spectra (100 scans and  $4.0\text{ cm}^{-1}$  resolution) were recorded at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Physisorption tests were carried out to determine the surface area using the BET method (Brunauer, Emmett and Teller) and porosity parameters using the BJH method (Barret, Joyner and Halenda), using the Autosorb 1C, Quantachrome equipment (Quantachrome Instruments, USA). The samples were previously dried at  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  under vacuum ( $10^{-7}$  torr) and then the adsorption of nitrogen gas was measured at  $77\text{ K}$ , at relative pressure values in the range of 0 to 1.0 bar.

### 2.3 Adsorption experiments

A preliminary analysis of optimal adsorbent was carried out to identify the samples with the highest potential for further analysis. Eight samples were evaluated: BSG, BSG-F, PER, PER-F, BC1-BC4. For each test, 50 mL of 20 mg/L methylene blue (MB) solution was combined with 50 mg of the sample (1 g/L) in duplicate. The samples were submitted to constant agitation (150 rpm) in an orbital shaker (SP Labor, Brazil) for 24 h at room temperature ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). After testing, the solution was separated from the sample using a simple sieve, and the residual MB concentration in the solution was measured using a UV/VIS spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu) at a wavelength of 665 nm, corresponding to the characteristic peak of the MB absorbance curve (Pahang et al., 2020).

The sample and biochar corresponding to the best result of the preliminary analysis were selected for further testing. The adsorbent potential was tested with different pH levels (2, 4, 7, 9), adjusting the pH of 20 mg/L MB solutions with hydrochloric acid (HCl) and sodium hydroxide (NaOH) 0.5 M. Each test used 50 mg of adsorbent (1 g/L), in duplicate. The samples were submitted to constant agitation (150 rpm) in an orbital shaker (CT 145, CIENTEC, Minas Gerais, Brazil) for 24 h at room temperature ( $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). After the test, the solution was separated from the sample using a sieve, and the residual MB concentration was measured using a spectrophotometer at a wavelength of 665 nm. The pH of the solution was measured at the beginning and end of each test using a pH meter (Kasvi, Paraná, Brazil).

The pH value yielding the highest adsorption was selected in subsequent equilibrium tests with different MB concentrations (10 - 200 mg/L). The assay was carried out as described above. The experimental equilibrium data were fitted using the Langmuir (Langmuir, 1918) and Freundlich (Freundlich, 1906) isotherm models. Finally, adsorption kinetics were studied following a similar method to the equilibrium tests, with 1 g/L of sample concentration in 50 mL of MB, over 24 h. The assay was carried out as described above. Samples were taken at predetermined intervals, and residual MB in the aqueous phase was measured by UV-Vis. Kinetic data were fitted using pseudo-first-order (PFO) and pseudo-second-order (PSO) Lagergren models (Lagergren, 1898; Vilar et al., 2006).

### 2.4 Desorption and recycling experiments

For the desorption and recycling experiment, only the sample that showed the highest potential in previous adsorption tests was evaluated. Initially, an adsorption test was carried out

with 1 g/L of sample in 100 mL of 20 mg/L MB solution, following the same conditions as previous tests. After a 24-hour adsorption period, the sample was separated from the solution using a sieve. The collected sample was then treated with a 0.1 M HCl solution under agitation for 2 h to enable desorption. Afterward, the sample was sieved and subjected to a new desorption cycle. MB concentrations in the solutions were measured in a spectrophotometer after each adsorption and desorption cycle. Desorption cycles were repeated for three cycles with the same sample.

## 2.5 Statistical analysis

For adsorption data, statistical analysis was carried out using GraphPad Prism software (5.0), considering a statistical significance level of 5% ( $p<0.05$ ) for tests comparing means between groups using ANOVA, with the post-Tukey test.

# 3. RESULTS AND DISCUSSION

## 3.1 Biochar yield

The carbonized samples (BC1- BC4) obtained an average yield of 23.7% (Table 1). The mass loss is associated with the degradation of cellulose and hemicellulose present in the sample, which occurs between 200 °C and 350 °C (Machado et al., 2020). This gives the material increased porosity (Mohammed et al., 2018) and, consequently, MB will have access to a greater number of active binding sites. The synthesis of biochar at 350 °C also ensures a higher content of oxygen-containing functional groups, which can remove inorganic pollutants through ionic interactions. Moreover, since BSG contains about 20% of lignin (Jay et al., 2008) and that a portion present in the material is not degraded, this makes it possible to preserve some of the surface functional groups responsible for the adsorption process (Cechinel et al., 2022).

Table 1. Carbonization yield of brewers spent grain.

Sample	BC1	BC2	BC3	BC4
Yield	29.4%	23.8%	22.4%	19.4%

BC1: biochar - brewers spent grain; BC2: biochar - fermented brewers spent grain; BC3: biochar - brewers spent grain extraction residue; BC4: biochar – fermented brewers spent grain extraction residue.

### 3.2 Characterization of the adsorbent

The representative ATR-FTIR spectra are shown in Figure 2. The BSG spectrum represents a complex heterogeneous matrix characterized by multiple functional groups typical of lignocellulosic structures (Belardi et al., 2023). The broad band in the region between 3100  $\text{cm}^{-1}$  and 3600  $\text{cm}^{-1}$  is mainly attributed to the stretching of –OH groups of polysaccharides (cellulose, arabinoxylan) and –NH groups of proteins (Belardi et al., 2023). The peaks at 2925  $\text{cm}^{-1}$  and 2854  $\text{cm}^{-1}$  correspond to CH stretch single bond vibrations in aliphatic chains ( $\text{CH}_2$  single bond and  $\text{CH}_3$  single bond), which can belong to cellulose, lignin, or hemicellulose (Fontana et al., 2018). This peak greatly reduces its intensity in the biochar, which may be related to a decrease in the adsorption capacity of these functional groups. It is also possible to observe a peak at 1650  $\text{cm}^{-1}$ , attributed to the carbonyl group in aromatic rings found in lignin (Cechinel et al., 2022; Ravindran et al., 2018), present in all samples. The peak observed at 1245  $\text{cm}^{-1}$  can be associated mainly with C–OH bond stretch vibrations of the aromatic compounds (Bachmann et al., 2023). The bands at 1035  $\text{cm}^{-1}$  can be attributed mainly to cellulose and hemicellulose vibrations (Belardi et al., 2023).

The groups identified in the FTIR spectrum are in accordance with the composition of brewing waste, which is rich in cellulose, hemicellulose, lignin, and proteins (Fontana et al., 2018). The shifting of peak positions, i.e., the change in the frequency of peaks and intensity of peaks of dye-loaded BSG samples compared to that of BSG that can be observed from the spectra, indicate the adsorption of dyes at the surface of BSG (Kezerle et al., 2018). The FTIR spectra of samples PER, BC3 and after the biosorption process show the same characteristic peaks, indicating that the functional groups are preserved during the biosorption process.

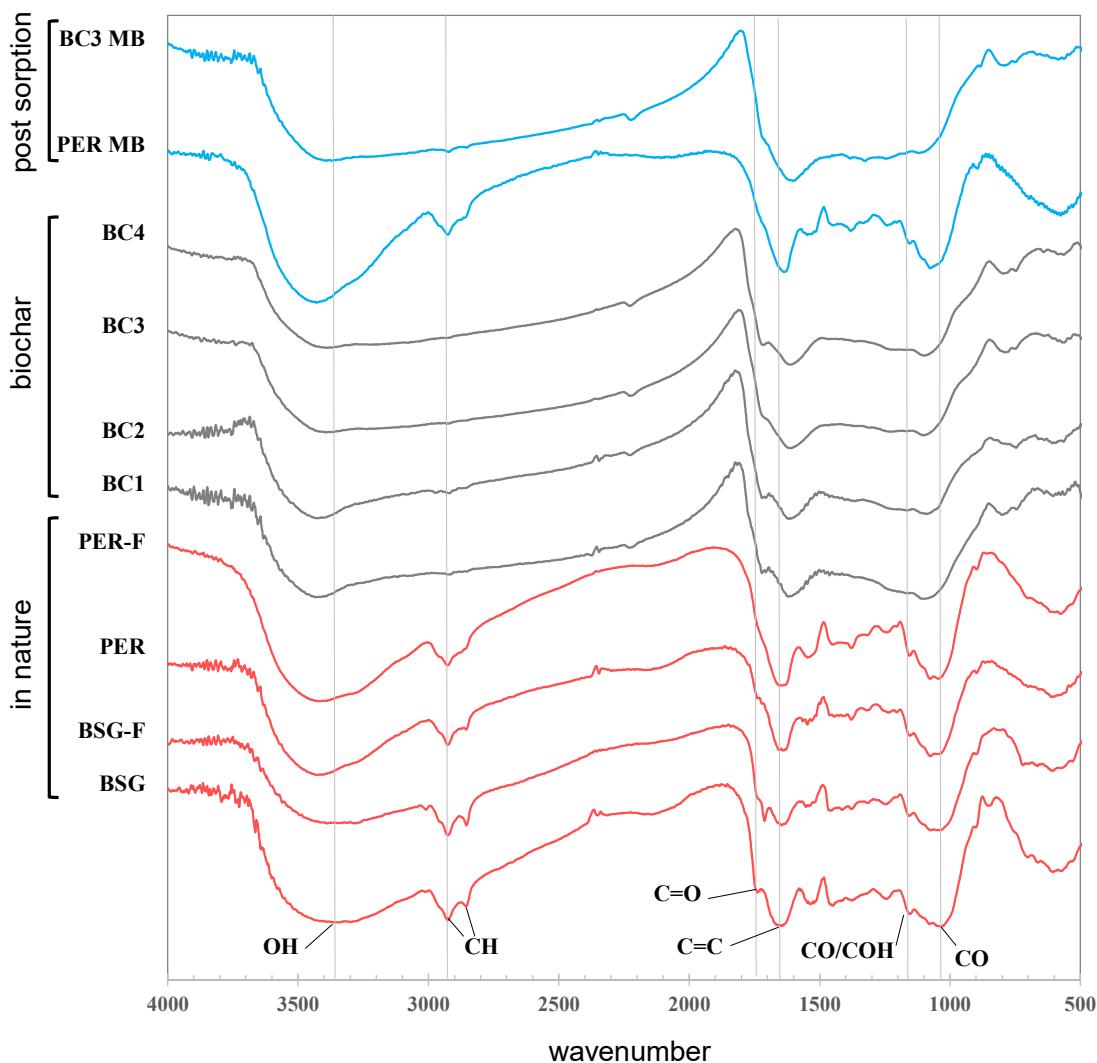


Figure 2. ATR-FTIR spectra. In red: in natura samples; in gray: biochar; in blue, samples after the adsorption experiment with methylene blue. BSG: brewers spent grain; F: fermented; PER: post extraction residue; BC1-BC4: respective biochars; MB: after adsorption of methylene blue.

As shown in Table 2, from the BET results to assess the surface area, it can be observed that the fermentation process could double the surface area of the material, as well as increase the pore volume and average pore diameter, attributable to the fermentation process that generates a more porous structure (da Silva Souza et al., 2024). After the extraction process, both BSG and BSG-F increased the surface area again, indicating the emergence of new pores or simply the increase in the percentage of lignocellulosic material due to the exit of content in the extract, such as sugars and lipids (Mustafa & Turner, 2011).

Biochars BC1 and BC2 do not increase the surface area concerning the corresponding *in natura* samples (BSG and BSG-F), as expected. This happens because the low carbonization energy is not capable of completely volatilizing the constituents (Cechinel et al., 2022). However, sample BC3 considerably increased both surface area (2.6 times) and pore volume (3.4 times) when compared to its corresponding uncarbonized sample, while BC4 doubled both surface area and pore volume. One hypothesis for why the samples derived from extraction responded better to the carbonization process and increased the surface area would be the absence of elements that would have already been extracted from the matrix, which could reduce the generation of new pores, such as elements that increase the ash content, for example, which can block micropores (Leng et al., 2021).

According to the classification by the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), porous materials are categorized based on their pore sizes: microporous ( $< 2$  nm), mesoporous ( $\leq 50$  nm), and macroporous ( $> 50$  nm) (Eddy et al., 2023). Therefore, the samples are classified as mesoporous. Mesoporous materials may have advantages over microporous materials due to their greater diffusion capacity and improved adsorption potential for larger molecules such as MB, and they may also offer more active sites for chemisorption, providing a more efficient and specific adsorption mechanism (da Silva Souza et al., 2024). The MB molecule has a minimum molecular cross section of about 0.8 nm and cannot enter pores with a diameter smaller than 1.3 nm, with the mesopores being the most responsible for adsorption (Wang et al., 2005).

Table 2. Morphological characteristics of the samples.

Sample	Surface Area (m <sup>2</sup> /g)	Pore Volume (cm <sup>3</sup> /g)	Average Pore Diameter (nm)
BSG	0.95	1.45 x 10 <sup>-3</sup>	6.07
BSG F	2.19	6.10 x 10 <sup>-3</sup>	11.13
PER	4.67	3.44 x 10 <sup>-3</sup>	2.95
PER F	4.92	4.56 x 10 <sup>-3</sup>	3.70
BC1	0.95	2.31 x 10 <sup>-3</sup>	6.32
BC2	0.92	1.43 x 10 <sup>-3</sup>	6.20
BC3	12.38	11.56 x 10 <sup>-3</sup>	3.68
BC4	8.67	11.13 x 10 <sup>-3</sup>	5.14

### 3.3 Assessment of adsorbent potential and MB removal with pH variation

BSG samples were tested in all the studied forms, non-fermented BSG (BSG), fermented BSG (BSG-F), post-extraction residue of BSG and BSG-F (PER and PER-F) and the 4 respective biochars (BC1, BC2, BC3 and BC4) (Figure 3A). Comparing the *in natura* samples (BSG and BSG-F), there was no significant difference in the adsorption potential concerning the fermentative bioprocess. BSG obtained a removal percentage of 65.7% and a removal capacity (q) of 10.6 mg/g, while BSG F obtained 63.2% and 10.8 mg/g, respectively, for the same quantities. Although fermentation increased surface area, volume, and pore size, this was not enough to increase the adsorption capacity of fermented BSG. In the literature, both results can be find, fermentation did or did not enhance the adsorption capacity of other lignocellulosic residues fermented in solid-state (Liu et al., 2016; Liu et al., 2018), and other factors seem to determine adsorption.

The samples that went through the extraction process performed differently (fermented and non-fermented). The PER sample had the best adsorption performance, with a removal percentage of 78.7% and a removal capacity of 12.8 mg/g, nearly 20% higher than the BSG potential. Regarding biochars, BC3 and BC4 obtained the best results (71.8%, 11.7 mg/g and 77.9%, 13.2 mg/g, respectively) and did not differ from each other, while samples BC1 and BC2 had lower results (16.9%, 2.7 mg/g and 42.6%, 7.1 mg/g, respectively).

In this preliminary test, the samples that had the best adsorption performance were PER, BC3, and BC4, probably because the extraction promoted the removal of compounds that could

be hindering the interaction of MB with the lignocellulosic matrix. Therefore, the PER sample and its biochar were selected for the next steps.

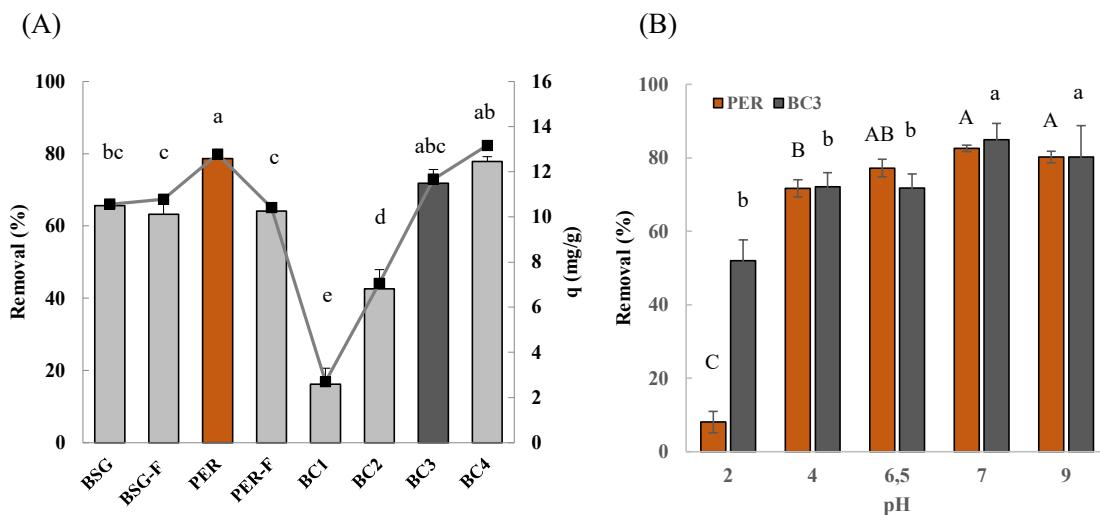


Figure 3. Methylene blue removal (bars) and adsorption capacity (line) using BSG sample and its derivations (A) and pH influence in MB removal percentage (B). BSG: Brewers Spent Grain; F: fermented; PER: post-extraction residue; BC: biochar;  $q$ : adsorption capacity.

The pH of the medium is an important factor affecting the adsorptive removal of different contaminants from wastewater. Therefore, the effect of solution pH on the amount of dye adsorbed at equilibrium was investigated in the pH range of 2–9, with a constant concentration of MB solution (20 mg/L). The tests were performed with the two selected samples PER and BC3 to evaluate in which range the adsorption would be increased. The results presented in Figure 3B show that the amount of MB adsorbed at pH 2 was 8.1% for PER and 52.1% for BC3, which reflects the efficiency of carbonization in the sample in more acidic solutions, as it presented as 6 times higher for BC3. When the pH increased to 4, the results of both samples were already equal at around 70%. At pH 6.5 (natural pH of the solution), the PER sample achieved its best performance (77.2%), while at pH 7 the BC3 sample obtained the highest result (84.9%). PER maintained the adsorption range (82.6%) without significant difference ( $p < 0.05$ ) for pH 6.5. At pH 9, the samples maintained their previously achieved values.

This agrees with the adsorptive removal study of MB with BSG that also reported constant dye adsorption in the pH range of 7–10 and lower adsorption at acidic pH (Kezerle et

al., 2018). The less efficient removal of MB at low pH can probably be attributed to the presence of positively charged H<sup>+</sup> ions that compete with MB cations for adsorption sites.

### 3.4 Adsorption isotherms and kinetics

Initially, at a low concentration of MB (10 mg/L), BC3 removal was greater compared to PER (86% and 71%, respectively - data not shown), but as the concentration increased, biochar seemed to gradually decrease its adsorption capacity compared to another sample. At the end of the test, at a MB concentration of 200 mg/L, the adsorption rates are 51.7% and 21.3% for PER and BC3, corresponding to more than 100% difference.

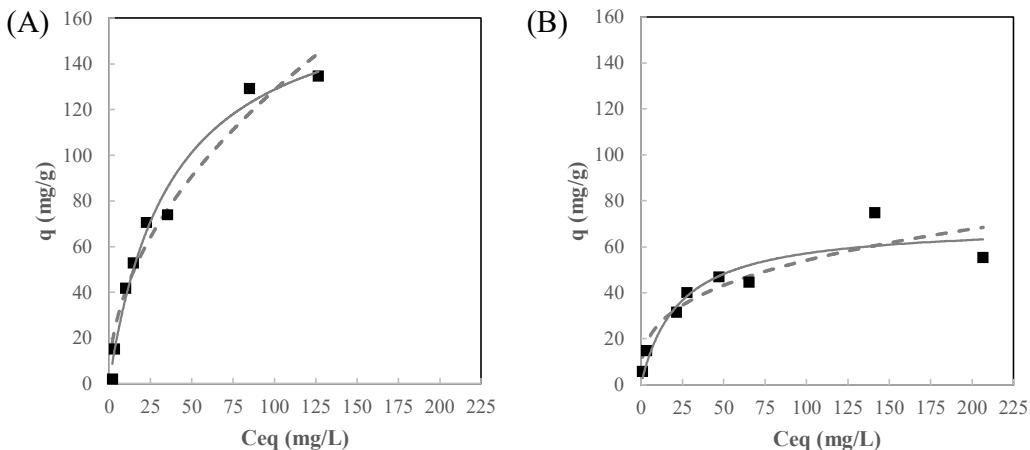


Figure. 4. Experimental data for methylene blue adsorption equilibrium (squares) with pos extraction residue (A) and biochar (B). The lines are adjustments of the Langmuir (continuous lines) and Freundlich (dashed lines) models. q: adsorption capacity; Ceq: equilibrium concentration.

The adsorption isotherms and adjustments for the Langmuir and Freundlich equilibrium models are represented in Figure 4. The adjusted isothermal parameters for each model are shown in Table 3. In both models, PER sample presented a good R<sup>2</sup> (0.98), and when we analyzed the S<sup>2</sup>R, the Langmuir model presented a lower value compared to the Freundlich model, which demonstrates a smaller difference between the experimental data and the trend line. This suggests that the adsorption process occurs in monolayers by chemisorption. Analyzing the parameters of the Langmuir model, it is observed that PER has a better adsorbent

maximum capacity ( $q_{máx}$ ) than BC3 (176.9 mg/g and 70.2 mg/g, respectively). These values were relevant when compared to other residues, such as sugarcane bagasse and soursop residue, also tested with MB, and when adjusted to the Langmuir models, they presented  $q_{max}$  of 55 mg/g and 17 mg/g, respectively (Meili et al., 2019). For the Freundlich model, the n/F ratio of both samples was greater than or equal to 1, indicating that the MB adsorption process was not favorable in this model.

Table 3. Adsorption parameters for Langmuir and Freundlich equilibrium models.

Langmuir model				Freundlich model					
	$q_{max}$ (mg/g)	$k_L$ (L/mg)	$R^2$	$S^2_R$ (mg/L) <sup>2</sup>		$n/F$	$k_F$ (mg <sup>1-1/n</sup> L <sup>1/n</sup> /g)	$R^2$	$S^2_R$ (mg/L) <sup>2</sup>
PER	176.9 ± 12.8	0.027 ± 0.005	0.98	279.1		1.0 ± 0.2	12.7 ± 2.0	0.96	641.6
BC3	70.2 ± 8.6	0.044 ± 0.02	0.87	372.7		3.09 ± 0.7	12.2 ± 3.9	0.84	477.9

$q_{max}$ : maximum adsorption capacity;  $k_L$ : Langmuir equilibrium constant;  $R^2$ : correlation coefficient;  $S^2_R$ : sum of squares of residuals

The kinetic data of the PER and BC3 samples were adjusted using the pseudo-first order and pseudo-second order kinetic models (Lagergren, 1898), and the parameters obtained are shown in Table 4 and Figure 5. The kinetic test was carried out to evaluate the adsorption efficiency over 24 h with the samples PER (squares - Figure 5A) and BC 3 (squares - Figure 5B). At the end of the experiment, PER had a ±20% higher adsorption capacity than BC3. The adsorption of MB by the PER sample was fastest in the first 2 h, around 41% of MB removal was observed, and, at the end of 24 h, a total of 77% of MB was removed (Figure 5A). In general, this behavior occurs due to external diffusion and surface biosorption, which are higher at first due to a large number of free active sites. After some time, the remaining active sites are difficult to occupy because of the repulsive force between the biosorbed molecules in the solid phase, leading to a longer time to reach equilibrium (Costa et al., 2023). On the other hand, for the BC3 sample, during the same 8 h of testing, the adsorption rate was 15%, and after 24 h it was 63% (Figure 5B).

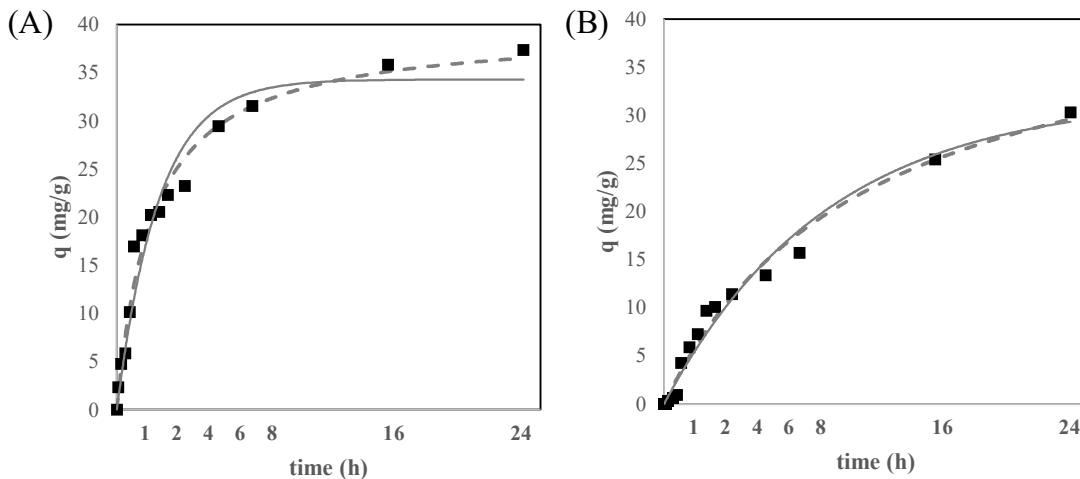


Figure 5. Fit of kinetic data to pseudo-first and pseudo-second-order models. Experimental data (squares) with A) pos extraction residue (PER) and B) biochar (BC3). The lines are adjustments of the pseudo-first-order (continuous lines) and pseudo-second-order (dashed lines).

In general, kinetic studies mainly aim to predict the rate at which pollutants are removed by a solid, which is an important factor to consider (Meili et al., 2019). The kinetic results of the pseudo-first-order and pseudo-second-order models for BSG are presented in Table 4. For both models, the  $R^2$  values were  $\geq 0.95$ . The  $S^2_R$  values were lower for the second model. Thus, the pseudo-second-order model was the most suitable to describe the adsorption kinetics of MB on PER and BC3 compared to the pseudo-first-order model. Furthermore, the calculated  $q_1$  values obtained from the pseudo-first-order model resulted in slightly lower values than the  $q_2$  values. The pseudo-second-order model predicts a chemisorption mechanism and suggests that the boundary layer resistance was not limiting the adsorption of MB (Meili et al., 2019).

Table 4. Kinetic parameters for Pseudo-first-order and Pseudo-second-order models.

	Pseudo-first order				Pseudo-second order			
	$q_1$ (mg/g)	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$R^2$	$S^2_R$ (mg/L) <sup>2</sup>	$q_2$ (mg/g)	$K_2$ (g/mg min)	$R^2$	$S^2_R$ (mg/L) <sup>2</sup>
PER	$34.3 \pm 1.5$	$0.007 \pm 0.0008$	0.95	84.07	$39.6 \pm 1.4$	$2.037E-4 \pm 2.8$	0.98	35.98
BC3	$31.9 \pm 1.9$	$0.002 \pm 2.12E-4$	0.98	24.82	$44.3 \pm 3.3$	$3.159E-5 \pm 6.86E-6$	0.98	19.32

$q$ : adsorption capacity;  $k$ : equilibrium constant;  $R^2$ : correlation coefficient;  $S^2_R$ : sum of squares of residuals

### 3.5 Efficiency of consecutive cycles of the sorption and desorption

Recycling tests were used to evaluate the possibilities of regeneration and multiple use of BSG. PER was the sample with the best activity in the equilibrium tests and thus was selected for the desorption analysis to evaluate the recycling performance. Figure 6 shows the reading spectra of the methylene blue solution, of the solutions after adsorption (A) and after desorption with HCl (B) in 3 cycles for each process. The adsorption capacity of the sample exhibited a decline as the number of cycles increased. For the first cycle, 80.8% adsorption and 60.5% desorption were obtained concerning the value of the initial concentration in the solution (20 mg/L). For the second and third cycles, 44.6% and 15.5% for adsorption and 50.3% and 39.4% for desorption, respectively, were obtained.

The decrease in adsorption capacity by approximately 36% from the first to the second cycle and 29% from the second to the third cycle may be the result of the cumulative effect of the incomplete desorption process. Furthermore, another possible cause of the reduction in sorption is the blocking, or chemical disintegration of functional groups, under the influence of acid (Wierzba & Kłos, 2019), which causes the BSG to lose its sorption characteristics in the third cycle, consequently causing a reduction in desorption efficiency.

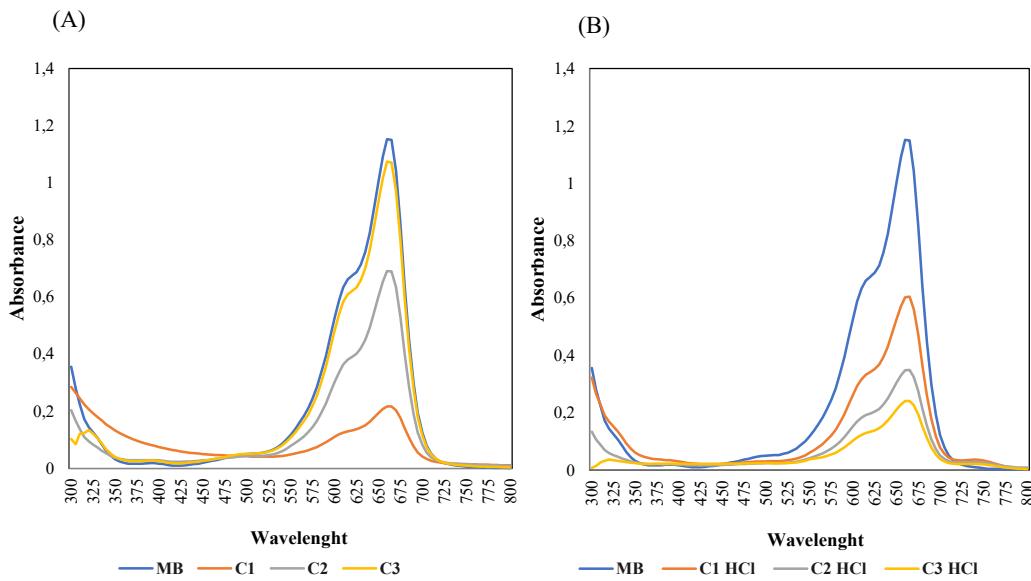


Figure 6. Spectrophotometric analysis of methylene blue solutions after adsorption (A) and 0.1 M hydrochloric acid solutions after desorption (B). MB: methylene blue solution; C1, C2 and C3 are the three adsorption cycles; C1 HCl, C2 HCl and C3 HCl are the three desorption cycles.

#### 4. CONCLUSIONS

This innovative study presents, for the first time, the residues generated from pressurized liquid extraction of a material that is already an industrial residue, exploring its potential for new applications and adding value to this waste material. The main results indicate that the post extraction residue from BSG sample presented a greater capacity for adsorption of methylene blue dying than the other materials studied, even better than its corresponding biochar. Based on these results, this material is a potential adsorbent for the removal of methylene blue from aqueous solutions and may be an environmentally friendly alternative for the regeneration of water bodies highly contaminated.

This study presented satisfactory results that show that BSG, a byproduct generated in high volume in all breweries and available globally, in addition to represent a raw material for bioactive compounds as demonstrated in studies, in its compound extraction process can also generate precursor material for the preparation of different highly efficient adsorbents, corroborating the concepts of circular economy.

## **CONFLICTS OF INTEREST**

The Authors declare that they have no conflict of interest.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was financed by Foundation for the Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) (26/201.317/2022; E-26/210.152/2023, E-26/210.008/2024); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (401053/2019-9; 314100/2023-7; 407350/2023-3); Coordination for Improvement of Personnel with Higher Education (CAPES) (financial code 001) and supported by UNIRIO.

# **PARTE III**

**Considerações finais, conclusões e perspectivas futuras**

---

**Capítulo 4 – Considerações finais, conclusão e perspectivas futuras**

#### 4.1 Considerações finais

Neste trabalho, foram avaliadas diferentes técnicas com o objetivo de maximizar a recuperação de compostos de interesse biotecnológico a partir do BM, um material lignocelulósico com grande potencial de aplicação. Esse resíduo, frequentemente descartado ou subaproveitado, possui uma rica composição química que pode conferir valor agregado a partir da utilização de processos que visam sua valorização, e deve ser explorado de maneira mais eficiente. Pela primeira vez, foi testada a associação da fermentação em estado-sólido (FES) com as técnicas não-convencionais de extração (extração com líquidos pressurizados – PLE e extração assistida por micro-ondas) - MAE no BM. Estas técnicas, em comparação com as convencionais (extração sólido-líquido, líquido-líquido, soxhlet e maceração) são ambientalmente mais apropriadas, mais eficientes, com maior rendimento e consequentemente maior economia no processo.

Esta tese de doutorado teve quatro questões centrais que puderam ser respondidas conforme apresentado abaixo.

1. Qual a contribuição da fermentação em estado-sólido para a recuperação de compostos fenólicos do bagaço de malte?

A aplicação da FES no BM possibilitou um aumento significativo do conteúdo total de compostos fenólicos, representados pelos ácidos hidroxicinâmicos majoritários, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, e aumento da atividade antioxidante determinada pelo método da capacidade redutora por Folin-Ciocalteu e capacidade antioxidant por DPPH (Figura 1 do capítulo 2), possivelmente pela liberação de compostos bioativos ligados covalentemente à matriz lignocelulósica. Essa liberação ocorre através da quebra de ligações do tipo éter e éster pelas enzimas fúngicas sintetizadas durante a fermentação. Esse efeito foi confirmado pela quantificação por UHPLC-PDA-MS, onde nota-se que a FES foi eficaz para liberar/solubilizar os ácidos fenólicos. Na extração convencional (controle), a fermentação aumentou os níveis de ácido ferúlico em 5 vezes e de *p*-cumárico em 19% no BM. Estes são ácidos hidroxicinâmicos geralmente encontrados reticulados com proteínas, lignina, hemicelulose e/ou polissacarídeos.

2. Qual a contribuição dos métodos alternativos de extração para a recuperação de compostos fenólicos?

As extrações não-convencionais PLE e MAE demonstraram um efeito positivo com aumento progressivo no rendimento e maior capacidade antioxidante quando comparados às extrações convencionais. Na temperatura mais baixa (50 °C), o extrato PLE apresentou atividade antioxidante quase 10 vezes maior, e por MAE, 11 vezes maior, em comparação à extração convencional (Figura 2A do capítulo 2), ressaltando a maior eficiência das extrações não convencionais. Quando as técnicas de extração foram associadas a fermentação, a FES aumentou significativamente a atividade antioxidante das amostras PLE, mostrando maior atividade em quase todas as temperaturas quando comparado as amostras não fermentadas (Figura 2B do capítulo 2). Porém não houve diferença entre as amostras fermentadas e não fermentadas a 150 °C (Figura 2B), demonstrando a eficiência da técnica de extração não convencional. Nas amostras de MAE, a fermentação aumentou de forma semelhante a atividade antioxidante; embora nas temperaturas 50 °C e 150 °C, a FES mostrou impacto mínimo. Isso indica que a FES é um pré-tratamento eficaz para maximizar a utilização de compostos fenólicos no BM, com a maior eficiência observada em temperaturas intermediárias (70–130 °C) em ambos os métodos de extração. Sendo assim, as temperaturas consideradas com melhores resultados foram 130 °C e 150 °C, onde foram alcançados os melhores resultados. Apesar de que alguns dados mostram que PLE é uma técnica ligeiramente melhor que MAE, como por exemplo no conteúdo de ácido ferúlico e *p*-cumárico, foi considerado que ambas as técnicas potencializaram as extrações de compostos de interesse.

3. Qual técnica de encapsulação por nanoemulsão foi mais efetiva no aprisionamento dos compostos fenólicos?

Com relação à nanoencapsulação, os encapsulados foram desenvolvidos a partir das técnicas de emulsão simples e dupla por fusão/emulsificação com cera de carnaúba e extrato de BM. O tamanho máximo das partículas (DP) foi de 294 nm, com um índice de polidispersão (PDI) máximo de 0,21 confirmando a eficácia das técnicas. A eficiência de encapsulação máxima foi de 35% (Tabela 2 do capítulo 2) e uma estabilidade em 50 semanas (Figura 4 do capítulo 2) em ambas as técnicas. Não houve diferença nos resultados entre as técnicas de simples e dupla emulsão, podendo ser considerado que ambas atenderam ao proposto, e mesmo que os compostos não tenham sido encapsulados em sua totalidade, ainda assim continuam na

fase aquosa da emulsão, podendo ser incorporados na formulação de um alimento funcional, por exemplo.

4. Qual material derivado do bagaço de malte possui melhor potencial adsorvente para azul de metileno?

O BM e seus derivados (fermentado, resíduo das extrações, biocarvões) mostraram grande potencial para a adsorção de corante com uma remoção de até 79% para o azul de metileno. Dentre as amostras, o resíduo final da extração com líquidos pressurizados teve o melhor desempenho entre as amostras apresentando uma capacidade de adsorção para azul de metileno ( $q$ ) de 129 mg/g de BM, se ajustando melhor no modelo de Langmuir, sugerindo que o processo de adsorção ocorra em monocamadas por quimissorção.

Neste trabalho, a combinação dos processos biotecnológicos tais como a FES, as extrações PLE ou MAE e nanoencapsulação apresentou-se como uma proposta de valorização do BM como rica matriz alimentar que pode ser aproveitada como ingrediente funcional ou extrato/aditivo natural. A sua utilização perpassa a indústria alimentícia, podendo ser utilizado como material adsorvente para tratamento de efluentes industriais.

## **4.2 Conclusão**

O presente estudo evidenciou o potencial do BM, um subproduto de grande volume subutilizado da indústria cervejeira, como uma rica fonte de compostos de interesse para diferentes indústrias – farmacêutica, nutracêutica e alimentícia, e seu uso até total esgotamento. A integração de técnicas inovadoras, como a fermentação em estado-sólido, combinada com extrações não-convencionais – extração por líquidos pressurizados e assistida por micro-ondas, revelou-se altamente eficiente na liberação e recuperação desses compostos. Além disso, a aplicação de técnicas de nanoencapsulação com cera de carnaúba para a encapsulação dos extratos obtidos a partir do BM demonstrou uma possibilidade de se aprimorar a estabilidade, eficácia e aplicabilidade desses compostos em diferentes matrizes industriais, como alimentos, cosméticos e fármacos.

O conceito de economia circular foi incorporado ao explorar integralmente o BM, desde a sua utilização como fonte de compostos bioativos até a aplicação do resíduo pós-extração como material adsorvente no tratamento de efluentes. Resultados como a remoção eficiente de corante reforçam a viabilidade do reaproveitamento total do BM, diminuindo o impacto ambiental associado ao seu descarte. Este ciclo de aproveitamento não apenas apresenta uma solução sustentável para um resíduo industrial, mas também aponta para oportunidades econômicas em mercados emergentes, como o de bioproductos e adsorventes para remediação ambiental.

Por fim, a pesquisa abre caminhos para a valorização do BM em múltiplos segmentos, destacando seu potencial como ingrediente nutricional em alimentos e como insumo para produtos de alto valor agregado. No entanto, desafios como a segurança alimentar, devido à possível presença de micotoxinas ou substâncias tóxicas, exigem investigações futuras. A implementação das soluções propostas dependerá de estudos adicionais para escalonamento industrial e regulamentação, mas o trabalho já estabelece bases sólidas para transformar o BM em um recurso valioso dentro da perspectiva de sustentabilidade e inovação.

### 4.3 Perspectivas

A realização do presente trabalho abre perspectivas que são destacadas a seguir como alguns pontos de maior interesse:

- Avaliação da toxicidade dos extratos, para confirmar a ausência de micotoxinas e substâncias tóxicas ao consumo humano;
- Avaliação do potencial antitumoral dos extratos, com testes *in vitro*, a fim de investigar um potencial nutracêutico específico;
- Avaliação das enzimas produzidas durante a FES, para compreender o conjunto de enzimas responsável pelo resultado positivo observado;
- Avaliação dos extratos nanoencapsulados em produtos alimentícios, tais como bebidas vegetais, visto que foi utilizada nas técnicas de nanoemulsão, uma cera vegetal; e assim investigar a estabilidade das nanopartículas, bem como a bioacessibilidade no sistema digestivo;
- Explorar novas técnicas de encapsulamento para aumentar a eficiência da encapsulação;
- Avaliação do potencial adsorvente do bagaço pós-extração em efluente industrial real, a fim de confirmar a aplicabilidade dos resultados promissores encontrados nos experimentos realizados no presente trabalho.

## **TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS**

- Maia, I. C.; Santos, P. H.; Rostagno, M.; Oliveira, J. V.; Cavalcanti, E. D. C.; Dias, J. F. e Ferreira, M. S. L. 2024. INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO-SÓLIDO E EXTRAÇÕES NÃO-CONVENCIONAIS SOBRE OS COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAGAÇO DE MALTE. Modalidade(s) Comunicação Oral - resumo expandido. Semana de Integração Acadêmica – SIA (UNIRIO).
- Maia, I. C.; Cechinel, M. A. P.; Padoin, N.; Soares, C.; Cavalcanti, E. D. C.; Dias, J. F. e Ferreira, M. S. L. 2024. RESÍDUO DE EXTRAÇÃO DE BAGAÇO DE MALTE COMO POTENCIAL MATERIAL ADSORVENTE PARA AZUL DE METILENO. Modalidade pôster. VI Simpósio de Alimentos e Nutrição – SIAN.
- Maia, I. C.; Santos, P. H.; Giovanardi, G.; Agner, T.; Freire, D. M. G.; Oliveira, J. V.; Araújo, P. H. H.; Sayer, C.; Cavalcanti, E. D. C.; Dias, J. F. e Ferreira, M. S. L. 2023. LIPID NANOENCAPSULATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM FERMENTED BREWERS SPENT GRAIN EXTRACTED BY NON-CONVENTIONAL TECHNIQUES. Modalidade pôster. 15° SLACAN - Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição.
- Maia, I. C.; Santos, P. H.; Oliveira, J. V.; Freire, D. M. G.; Cavalcanti, E. D. C.; Dias, J. F. e Ferreira, M. S. L. 2023. TÉCNICAS NÃO CONVENCIONAIS PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE BAGAÇO DE MALTE FERMENTADO. Modalidade(s) Comunicação Oral - resumo expandido. Semana de Integração Acadêmica – SIA (UNIRIO).

## **TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS EM CO-AUTORIA:**

- Pereira, E. M. F.; Santos, M. A.; Cavalcanti, E. D. C.; Ferreira, M. S. L.; Latini, J. T. P.; Maia, I. C. M., Dias, J. F. D. EFEITO DO CONSUMO DE BAGAÇO FERMENTADO DE MALTE EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA. Modalidade Oral. 23<sup>a</sup> Jornada de Iniciação Científica – UNIRIO.
- Pimentel, L. G.; Pereira, E. M. F.; Santos, M. A.; Santos, Y. F.; Maia, I. C. e Beres, C. 2023. VALORIZAÇÃO DE PANCS: DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO, BIOATIVIDADE E ACEITABILIDADE DE BOLO DE ORA-PRO-NÓBIS (PERESKIA ACULEATA) Modalidade pôster. VI Simpósio de Alimentos e Nutrição – SIAN.

- Santos, M. A.; Pereira, E. M. F.; Pinho, T. L.; Oliveira, V. P.; Neto, D. S.; Maia, I. C.; Ferreira, M. S. L.; Dias, J. F. 2024. ALGA KAPPAPHYCUS ALVAREZII COMO POTENCIAL FONTE DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES. Modalidade pôster. VI Simpósio de Alimentos e Nutrição – SIAN.
- Sereno, A. S. C.; Carvalho, M. G. O.; Maia, I. C.; Dias, J. F.; Ferreira, M. S. L. e Koblitz, M. G. B. 2023. "EXTRAÇÃO COMPARATIVA DE PROTEÍNA DE BAGAÇO DE MALTE FERMENTADO E NÃO FERMENTADO". Modalidade pôster. 15º SLACAN - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição.
- Pimentel, L. G.; Santos, M. A.; Pereira, E. M. F; Santos, Y. F.; Maia, I. C.; Beres, C. 2023. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DE BOLO COM FARINHA DE “ORA-PRO-NÓBIS” (PERESKIA ACULEATA). Modalidade pôster. 15º SLACAN - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição.
- Sereno, A. S. C.; Carvalho, M. G. O.; Maia, I. C. e Koblitz, M. G. B. 2023. EXTRAÇÃO COMPARATIVA DE PROTEÍNA DE BAGAÇO DE MALTE FERMENTADO E NÃO FERMENTADO. Modalidade Oral. 22ª Jornada de Iniciação Científica – UNIRIO.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul Rahim, R., Jayusman, P. A., Muhammad, N., Ahmad, F., Mokhtar, N., Naina Mohamed, I.,...Shuid, A. N. (2019). Recent Advances in Nanoencapsulation Systems Using PLGA of Bioactive Phenolics for Protection against Chronic Diseases. *International journal of environmental research and public health*, 16(24), 4962. <https://doi.org/10.3390/ijerph16244962>
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Acosta-Estrada, B. A., Villela-Castrejón, J., Perez-Carrillo, E., Gómez-Sánchez, C. E., & Gutiérrez-Uribe, J. A. (2019). Effects of solid-state fungi fermentation on phenolic content, antioxidant properties and fiber composition of lime cooked maize by-product (nejayote). *Journal of cereal science*, 90. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102837>
- Aditya, N., Aditya, S., Yang, H., Kim, H. W., Park, S. O., & Ko, S. (2015). Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion. *Food chemistry*, 173, 7-13.
- Aftab, M. N., Iqbal, I., Riaz, F., Karadag, A., & Tabatabaei, M. (2019). Different pretreatment methods of lignocellulosic biomass for use in biofuel production. *Biomass for bioenergy-recent trends and future challenges*, 1-24.
- Aghababaei, F., & Hadidi, M. (2023). Recent advances in potential health benefits of quercetin. *Pharmaceuticals*, 16(7), 1020.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current research in food science*, 4, 200-214.
- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & function*, 12(1), 14-29.
- Aliyu, S., & Bala, M. (2011). Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 324-331.
- Almeida, A. d. R., Geraldo, M. R. F., Ribeiro, L. F., Silva, M. V., Maciel, M. V. d. O. B., & Haminiuk, C. W. I. (2017). Bioactive compounds from brewer's spent grain: phenolic compounds, fatty acids and in vitro antioxidant capacity. *Acta Scientiarum Technology*, 39(3), 269. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v39i3.28435>
- Amaya-Chantaca, D., Flores-Gallegos, A. C., Iliná, A., Aguilar, C. N., Sepúlveda-Torre, L., Ascacio-Vadlés, J. A., & Chávez-González, M. L. (2022). Comparative extraction study of grape pomace bioactive compounds by submerged and solid-state fermentation. *Journal of chemical technology and biotechnology* (1986), 97(6), 1494-1505. <https://doi.org/10.1002/jctb.6977>
- Ambra, R., Pastore, G., & Lucchetti, S. (2021). The role of bioactive phenolic compounds on the impact of beer on health. *Molecules*, 26(2), 486.
- Anastopoulos, I., Bhatnagar, A., Hameed, B. H., Ok, Y. S., & Omirou, M. (2017). A review on waste- derived adsorbents from sugar industry for pollutant removal in water and wastewater. *Journal of molecular liquids*, 240, 179-188. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.063>
- Andersen, O. M., & Markham, K. R. (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC press.

- Andres, A. I., Petron, M. J., Lopez, A. M., & Timon, M. L. (2020). Optimization of extraction conditions to improve phenolic content and in vitro antioxidant activity in craft brewers' spent grain using response surface methodology (RSM). *Foods*, 9(10), 1398.
- Arruda, H. S., Pereira, G. A., de Morais, D. R., Eberlin, M. N., & Pastore, G. M. (2018). Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. *Food chemistry*, 245, 738-749.
- Attri, S., Sharma, K., Raigond, P., & Goel, G. (2018). Colonic fermentation of polyphenolics from Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries: Assessment of effects on microbial diversity by Principal Component Analysis. *Food Research International*, 105, 324-332.
- Bachmann, S. A. L., Calvete, T., & Féris, L. A. (2022). Potential applications of brewery spent grain: Critical an overview. *Journal of environmental chemical engineering*, 10(1), 106951. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106951>
- Bachmann, S. A. L., Nunes, K. G. P., Calvete, T., & Féris, L. A. (2023). Low-cost adsorbents prepared from brewer's spent grain for pollutants removal. *Emergent materials (Online)*, 6(2), 741-753. <https://doi.org/10.1007/s42247-023-00496-x>
- Barrios-González, J. (2012). Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, 47(2), 175-185.
- Becker, D., Stegmüller, S., & Richling, E. (2023). Characterization of brewer's spent grain extracts by tandem mass spectrometry and HPLC-DAD: Ferulic acid dehydrodimers, phenolamides, and oxylipins. *Food science & nutrition*, 11(5), 2298-2320. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3178>
- Belardi, I., Marrocchi, A., Alfeo, V., Sileoni, V., De Francesco, G., Paolantoni, M., & Marconi, O. (2023). Sequential Extraction and Attenuated Total Reflection–Fourier Transform Infrared Spectroscopy Monitoring in the Biorefining of Brewer's Spent Grain. *Molecules*, 28(24).
- Bolwig, S., Mark, M. S., Happel, M. K., & Brekke, A. (2019). Beyond animal feed? The valorisation of brewers' spent grain. *From waste to value: Valorisation pathways for organic waste streams in circular bioeconomies*.
- Bonifácio-Lopes, T., Teixeira, J. A., & Pintado, M. (2020). Current extraction techniques towards bioactive compounds from brewer's spent grain—A review [Review]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16), 2730-2741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655632>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brasil. (2010). *Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Diário Oficial da União, Brasília. pp.*
- Bucci, P. L., Santos, M. V., Montanari, J., & Zaritzky, N. (2020). Nanoferulic: From a by-product of the beer industry toward the regeneration of the skin. *Journal of cosmetic dermatology*, 19(11), 2958-2964. <https://doi.org/10.1111/jocd.13407>
- Capanoglu, E., Nemli, E., & Tomas-Barberan, F. (2022). Novel approaches in the valorization of agricultural wastes and their applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(23), 6787-6804.
- Carciochi, R., Sologubik, C., Fernández, M., Manrique, G., & D'Alessandro, L. (2018). Extraction of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grain: optimization and kinetics modeling. *Antioxidants* 7 (4): 45. doi. org/10.3390/antiox7040045.
- Cechinel, M. A. P., dos Santos, K. M., Rostirolla, A. C., & Junca, E. (2022). Synthesis of biochar using brewery waste for efficient adsorption of ionic iron species. *Biomass conversion and biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03495-w>

- Chen, C.-Y., Wang, S.-W., Kim, H., Pan, S.-Y., Fan, C., & Lin, Y. J. (2021). Non-conventional water reuse in agriculture: A circular water economy. *Water research (Oxford)*, 199, 117193-117193. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117193>
- Chipurura, B., Muchuweti, M., & Manditseraa, F. (2010). Effects of thermal treatment on the phenolic content and antioxidant activity of some vegetables.
- Coman, V., & Vodnar, D. C. (2020). Hydroxycinnamic acids and human health: Recent advances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), 483-499.
- Comunian, T. A., Silva, M. P., & Souza, C. J. F. (2021). The use of food by-products as a novel for functional foods: Their use as ingredients and for the encapsulation process. *Trends in food science & technology*, 108, 269-280. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.003>
- Connolly, A., Cermeño, M., Alashi, A. M., Aluko, R. E., & FitzGerald, R. J. (2021). Generation of phenolic-rich extracts from brewers' spent grain and characterisation of their in vitro and in vivo activities. *Innovative food science & emerging technologies*, 68, 102617. <https://doi.org/10.1016/j;ifset.2021.102617>
- Cooray, S. T., & Chen, W. N. (2018). Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state fermentation to enhance nutritional value. *Journal of Functional Foods*, 42, 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.027>
- Corrêa-Filho, L., Moldão-Martins, M., & Alves, V. (2019). Advances in the Application of Microcapsules as Carriers of Functional Compounds for Food Products. *Applied sciences*, 9(3), 571. <https://doi.org/10.3390/app9030571>
- Costa, F. M. A. S., Seolatto, A. A., Fontoura, R. S., & Freitas, F. F. (2023). Use of brewery spent grains as a biosorbent for reactive blue 5G dye removal: batch and continuous flow studies. *Chemical Engineering Communications*, 210(2), 147-164.
- Costa, R. D. S., de Almeida, S. S., Cavalcanti, E. D. A. C., Freire, D. M. G., Moura-Nunes, N., Monteiro, M., & Perrone, D. (2021). Enzymes produced by solid state fermentation of agro-industrial by-products release ferulic acid in bioprocessed whole-wheat breads. *Food research international*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109843>
- da Silva, R. N. P., Dias, J. F., & Koblitz, M. G. B. (2021). Cervejas: relação entre estilos; compostos fenólicos e capacidade antioxidante. *Research, Society and Development*, 10(3), e42210313471-e42210313471.
- da Silva Souza, M., Sampaio, I. C. F., de Carvalho Tavares, I. M., Pimentel, A. B., dos Anjos, P. N. M., de Moura, I. V. L.,...de Carvalho, M. S. (2024). Fermented cocoa bean shell by-product as an enhanced adsorbent for dye of the textile industry. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-18.
- De Gisi, S., Lofrano, G., Grassi, M., & Notarnicola, M. (2016). Characteristics and adsorption capacities of low-cost sorbents for wastewater treatment: A review. *Sustainable Materials and Technologies*, 9, 10-40.
- de Meneses, A. C., Marques, E. B. P., Leimann, F. V., Gonçalves, O. H., Ineu, R. P., de Araújo, P. H. H.,...Sayer, C. (2019). Encapsulation of clove oil in nanostructured lipid carriers from natural waxes: Preparation, characterization and in vitro evaluation of the cholinesterase enzymes. *Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects*, 583, 123879. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123879>
- de Souza Simões, L., Madalena, D. A., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Ramos, O. L. (2017). Micro-and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*, 243, 23-45.
- Dąbrowski, A. (2001). Adsorption—from theory to practice. *Advances in colloid and interface science*, 93(1-3), 135-224.
- Eddy, N. O., Ukpe, R. A., Ameh, P., Ogbodo, R., Garg, R., & Garg, R. (2023). Theoretical and experimental studies on photocatalytic removal of methylene blue (MetB) from aqueous

- solution using oyster shell synthesized CaO nanoparticles (CaONP-O). *Environmental Science and Pollution Research*, 30(34), 81417-81432.
- FAO. (2013). *Food wastage footprint: Impacts on natural resources - Summary report*. Retrieved 06 de novembro de 2024 from <https://www.fao.org/4/i3347e/i3347e.pdf>
- FAO. (2024). *Food Security and Nutrition in the World 2024*. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/ffb79f08-bf03-404a-9ad3-f8ef9c3c9e6b/content/cd1254en.html#gsc.tab=0>
- Fetanat, A., & Tayebi, M. (2022). A picture fuzzy set-based decision support system for treatment technologies prioritization of petroleum refinery effluents: A circular water economy transition towards oil & gas industry. *Separation and purification technology*, 303, 122220. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.122220>
- Fontana, I. B., Peterson, M., & Cechinel, M. A. P. (2018). Application of brewing waste as biosorbent for the removal of metallic ions present in groundwater and surface waters from coal regions. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(1), 660-670. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.01.005>
- Freitas, C. A. S., Vieira, Í. G. P., Sousa, P. H. M., Muniz, C. R., da Costa Gonzaga, M. L., & Guedes, M. I. F. (2016). Carnauba wax p-methoxycinnamic diesters: Characterisation, antioxidant activity and simulated gastrointestinal digestion followed by in vitro bioaccessibility. *Food Chemistry*, 196, 1293-1300.
- Freitas, L. C., Barbosa, J. R., da Costa, A. L. C., Bezerra, F. W. F., Pinto, R. H. H., & de Carvalho Junior, R. N. (2021). From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products? *Resources, Conservation and Recycling*, 169, 105466.
- Freundlich, H. M. F. (1906). Over the adsorption in solution. *J. Phys. chem*, 57(385471), 1100-1107.
- Goh, L. L., & Lee, K. C. L. (2021). Biovalorisation of Brewer's Spent Grain (BSG) and Sensory Evaluation of BSG Bread.
- González-García, E., Marina, M. L., & García, M. C. (2021). Impact of the use of pressurized liquids on the extraction and functionality of proteins and bioactives from brewer's spent grain. *Food chemistry*, 359. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129874>
- Govindan, K. (2018). Sustainable consumption and production in the food supply chain: A conceptual framework. *International Journal of Production Economics*, 195, 419-431.
- Grassi, S., Cardone, G., Bigagnoli, D., & Marti, A. (2018). Monitoring the sprouting process of wheat by non-conventional approaches. *Journal of Cereal Science*, 83, 180-187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.08.007>
- Guido, L. F., & Moreira, M. M. (2017). Techniques for extraction of brewer's spent grain polyphenols: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 1192-1209.
- Hady, E., Youssef, M., Aljahani, A. H., Aljumayi, H., Ismail, K. A., El-Damaty, E.-S.,...El-Sharnouby, G. (2022). Enhancement of the stability of encapsulated pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract by double emulsion with carboxymethyl cellulose. *Crystals*, 12(5), 622.
- Herbst, G., Hamerski, F., Errico, M., & L. Corazza, M. (2021). Pressurized liquid extraction of brewer's spent grain: Kinetics and crude extracts characterization. *Journal of industrial and engineering chemistry (Seoul, Korea)*, 102, 370-383. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.07.020>
- Hernanz, D., Nuñez, V., Sancho, A. I., Faulds, C. B., Williamson, G., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2001). Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4884-4888.

- Islam, R. U., Khan, T., Junaid, P. M., & Naseem, S. (2024). Recent Developments in Sustainable Bio-Based Wax Nanoemulsions as Edible Coatings for Food Commodities: A Comprehensive Review. *Packaging Technology and Science*.
- Jafari, S. M. (2017). An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. *Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries*, 1-34.
- Jandera, P. (2011). Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta*, 692(1), 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>
- Jay, A. J., Parker, M. L., Faulks, R., Husband, F., Wilde, P., Smith, A. C.,...Waldron, K. W. (2008). A systematic micro-dissection of brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, 47(2), 357-364.
- Jørgensen, S., & Pedersen, L. J. T. (2018). The circular rather than the linear economy. *RESTART sustainable business model innovation*, 103-120.
- Kezlerle, A., Velić, N., Hasenay, D., & Kovačević, D. (2018). Lignocellulosic materials as dye adsorbents: adsorption of methylene blue and Congo red on brewers' spent grain. *Croatica Chemica Acta*, 91(1), 53-64.
- Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 4, 86-93.
- Lagergren, S. (1898). Zur theorie der sogenannten adsorption geloster stoffe.
- Langmuir, I. (1918). The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society*, 40(9), 1361-1403.
- Lee, H. W., Jeon, H. G., & Kim, K.-W. (2023). Removal of cobalt and strontium by adsorption using Brewer's spent grain formed by pyrolysis. *Environmental geochemistry and health*, 45(10), 7131-7144. <https://doi.org/10.1007/s10653-023-01655-z>
- Leite, P., Belo, I., & Salgado, J. M. (2021). Co-management of agro-industrial wastes by solid-state fermentation for the production of bioactive compounds. *Industrial crops and products*, 172, 113990. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113990>
- Leng, L., Xiong, Q., Yang, L., Li, H., Zhou, Y., Zhang, W.,...Huang, H. (2021). An overview on engineering the surface area and porosity of biochar. *Science of the total Environment*, 763, 144204.
- Lira, K. H. D. d. S., Passos, T. S., Ramalho, H. M. M., Rodrigues, K. D. d. S. R., Vieira, É. d. A., Cordeiro, A. M. T. d. M.,...de Assis, C. F. (2020). Whey protein isolate-gelatin nanoparticles enable the water-dispersibility and potentialize the antioxidant activity of quinoa oil (*Chenopodium quinoa*). *PloS one*, 15(10), e0240889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240889>
- Liu, J., Li, E., You, X., Hu, C., & Huang, Q. (2016). Adsorption of methylene blue on an agro-waste oiltea shell with and without fungal treatment. *Scientific reports*, 6(1), 38450.
- Liu, J., Wang, Z., Li, H., Hu, C., Raymer, P., & Huang, Q. (2018). Effect of solid state fermentation of peanut shell on its dye adsorption performance. *Bioresource Technology*, 249, 307-314.
- Loganathan, V., & Mohan, L. (2023). Dietary Antioxidants and Bioactive Compounds in Food Processing. In *Recent Developments in Antioxidants from Natural Sources*. IntechOpen.
- Londoño-Hernández, L., Ramírez-Toro, C., Ruiz, H., Ascacio-Valdés, J., Aguilar-Gonzalez, M., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. (2017). *Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 110.
- Lu, S., & Gibb, S. W. (2008). Copper removal from wastewater using spent-grain as biosorbent. *Bioresource Technology*, 99(6), 1509-1517.

- Luo, Y., Wang, Q., & Zhang, Y. (2020). Biopolymer-based nanotechnology approaches to deliver bioactive compounds for food applications: a perspective on the past, present, and future. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(46), 12993-13000.
- Lutz, M., Fuentes, E., Ávila, F., Alarcón, M., & Palomo, I. (2019). Roles of phenolic compounds in the reduction of risk factors of cardiovascular diseases. *Molecules*, 24(2), 366.
- Lynch, K. M., Steffen, E. J., & Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 553-568.
- López-Linares, J. C., Campillo, V., Coca, M., Lucas, S., & García-Cubero, M. T. (2021). Microwave-assisted deep eutectic solvent extraction of phenolic compounds from brewer's spent grain. *Journal of chemical technology and biotechnology* (1986), 96(2), 481-490. <https://doi.org/10.1002/jctb.6565>
- Machado, L. M., Lütke, S. F., Perondi, D., Godinho, M., Oliveira, M. L., Collazzo, G. C., & Dotto, G. L. (2020). Simultaneous production of mesoporous biochar and palmitic acid by pyrolysis of brewing industry wastes. *Waste Management*, 113, 96-104.
- Maia, I. d. C., D'Almeida, C. T. d. S., Freire, D. M. G., Cavalcanti, E. d. A. C., Cameron, L. C., Dias, J. F., & Ferreira, M. S. L. (2020). Effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from brewer's spent grain revealed by UPLC-MSE. *LWT*, 110136.
- Mannina, G., Gulhan, H., & Ni, B.-J. (2022). Water reuse from wastewater treatment: The transition towards circular economy in the water sector. *Bioresource technology*, 363, 127951-127951. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127951>
- MAPA. (2024). Anuário da Cerveja 2023. In. Brasília, Brasil.
- McCarthy, A. L., O'Callaghan, Y. C., Piggott, C. O., FitzGerald, R. J., & O'Brien, N. M. (2013). Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: a review. *Proceedings of the Nutrition Society*, 72(1), 117-125.
- Meili, L., Lins, P., Costa, M., Almeida, R., Abud, A., Soletti, J.,...Carvalho, S. (2019). Adsorption of methylene blue on agroindustrial wastes: experimental investigation and phenomenological modelling. *Progress in biophysics and molecular biology*, 141, 60-71.
- Meneses, N. G., Martins, S., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and purification technology*, 108, 152-158.
- Milagros Delgado-Zamarreño, M., Bustamante-Rangel, M., Sierra-Manzano, S., Verdugo-Jara, M., & Carabias-Martínez, R. (2009). Simultaneous extraction of tocotrienols and tocopherols from cereals using pressurized liquid extraction prior to LC determination. *Journal of separation science*, 32(9), 1430-1436.
- Mitri, S., Salameh, S.-J., Khelfa, A., Leonard, E., Maroun, R. G., Louka, N., & Koubaa, M. (2022). Valorization of Brewers' Spent Grains: Pretreatments and Fermentation, a Review. *Fermentation (Basel)*, 8(2), 50. <https://doi.org/10.3390/fermentation8020050>
- Mo, J., Yang, Q., Zhang, N., Zhang, W., Zheng, Y., & Zhang, Z. (2018). A review on agro-industrial waste (AIW) derived adsorbents for water and wastewater treatment. *Journal of environmental management*, 227, 395-405. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.069>
- Mohammed, N. A., Abu-Zurayk, R. A., Hamadneh, I., & Al-Dujaili, A. H. (2018). Phenol adsorption on biochar prepared from the pine fruit shells: Equilibrium, kinetic and thermodynamics studies. *Journal of environmental management*, 226, 377-385.

- Moraga, G., Huysveld, S., Mathieu, F., Blengini, G. A., Alaerts, L., Van Acker, K.,...Dewulf, J. (2019). Circular economy indicators: What do they measure? *Resources, Conservation and Recycling*, 146, 452-461.
- Moreira, M. M., Morais, S., Barros, A. A., Delerue-Matos, C., & Guido, L. F. (2012). A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403, 1019-1029.
- Mussatto, S. I. (2014). Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. In (Vol. 94, pp. 1264-1275). Chichester, UK.
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2006). Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(3), 268-274.
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica chimica acta*, 703(1), 8-18.
- Muthusamy, N. (2014). Chemical composition of brewers spent grain. *Int. J. Sci. Environ. Technol*, 3, 2109-2112.
- Nahar, L., Onder, A., & Sarker, S. D. (2020). A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). *Phytochemical Analysis*, 31(4), 413-457.
- Nigam, P. S. (2017). An overview: Recycling of solid barley waste generated as a by- product in distillery and brewery. *Waste management (Elmsford)*, 62, 255-261. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.018>
- Niknam, S. M., Escudero, I., & Benito, J. M. (2020). Formulation and preparation of water-in-oil-in-water emulsions loaded with a phenolic-rich inner aqueous phase by application of high energy emulsification methods. *Foods*, 9(10), 1411.
- Ogunjobi, A. A., Mejeha, O. K., & Fagade, O. E. (2011). Protein enrichment of brewery spent grains using *Aspergillus oryzae*. *AU Journal of Technology*, 15(1).
- ONU. (2015). *General Assembly. Resolution 70/1, 25 september 2015. "Transforming our World: the 2030 Agenda for Sustainable Development"*. Retrieved Acessado em 16 de outubro de 2024 from [https://www.un.org/en/development/desa/population/migration/generalassembly/docs/globalcompact/A\\_RES\\_70\\_1\\_E.pdf](https://www.un.org/en/development/desa/population/migration/generalassembly/docs/globalcompact/A_RES_70_1_E.pdf)
- Pahang, F., Parvin, P., Ghafoori-Fard, H., Bavali, A., & Moafi, A. (2020). Fluorescence properties of methylene blue molecules coupled with metal oxide nanoparticles. *OSA Continuum*, 3(3), 688-697.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., Turcuş, V., Predoi, G., & Iordache, F. (2018). Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity-A critical view. *European journal of medicinal chemistry*, 157, 1326-1345.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621.
- Rafatullah, M., Sulaiman, O., Hashim, R., & Ahmad, A. (2010). Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: a review. *Journal of hazardous materials*, 177(1-3), 70-80.
- Rahman, M. J., Malunga, L. N., Eskin, M., Eck, P., Thandapilly, S. J., & Thiyan-Hollander, U. (2021). Valorization of heat-treated brewers' spent grain through the identification

- of bioactive phenolics by UPLC-PDA and evaluation of their antioxidant activities. *Frontiers in Nutrition*, 8, 634519.
- Ravera, F., Dziza, K., Santini, E., Cristofolini, L., & Liggieri, L. (2021). Emulsification and emulsion stability: The role of the interfacial properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 288, 102344.
- Ravindran, R., Jaiswal, S., Abu-Ghannam, N., & Jaiswal, A. K. (2018). A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewers' spent grain. *Bioresource Technology*, 248, 272-279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.039>
- Rodríguez-Pérez, C., Gilbert-López, B., Mendiola, J. A., Quirantes-Piné, R., Segura-Carretero, A., & Ibáñez, E. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* leaves by multiresponse surface methodology. *Electrophoresis*, 37(13), 1938-1946. <https://doi.org/10.1002/elps.201600071>
- Rudke, A. R., da Silva, M., de Andrade, C. J., Vitali, L., & Ferreira, S. R. S. (2022). Green extraction of phenolic compounds and carrageenan from the red alga *Kappaphycus alvarezii*. *Algal Research*, 67, 102866.
- Sachs, J., Kroll, C., Lafourture, G., Fuller, G., & Woelm, F. (2022). Sustainable Development Report 2022. Cambridge University Press. In: Cambridge.
- Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and bioprocessing*, 5(1), 1-15.
- Sant' Anna, V., Gurak, P. D., Ferreira Marczak, L. D., & Tessaro, I. C. (2013). Tracking bioactive compounds with colour changes in foods – A review. *Dyes and Pigments*, 98(3), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.04.011>
- Santos, M. C. B., da Silva Lima, L. R., Nascimento, F. R., do Nascimento, T. P., Cameron, L. C., & Ferreira, M. S. L. (2019). Metabolomic approach for characterization of phenolic compounds in different wheat genotypes during grain development. *Food Research International*, 124, 118-128.
- Scott, R. P. (2020). *Techniques and practice of chromatography*. CRC Press.
- Setyaningsih, W., Saputro, I., Palma, M., & Barroso, C. (2015). Optimisation and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food chemistry*, 169, 141-149.
- Sganzerla, W. G., Ampese, L. C., Mussatto, S. I., & Forster-Carneiro, T. (2021). A bibliometric analysis on potential uses of brewer's spent grains in a biorefinery for the circular economy transition of the beer industry. *Biofuels, bioproducts and biorefining*, 15(6), 1965-1988. <https://doi.org/10.1002/bbb.2290>
- Sganzerla, W. G., da Silva, M. F., Zabot, G. L., Goldbeck, R., Mussatto, S. I., & Forster-Carneiro, T. (2023). Techno-economic assessment of subcritical water hydrolysis of brewer's spent grains to recover xylo-oligosaccharides. *The Journal of supercritical fluids*, 196, 105895. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2023.105895>
- Shi, L., Zhao, W., Yang, Z., Subbiah, V., & Suleria, H. A. R. (2022). Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(54), 81112-81129.
- Shin, H.-Y., Kim, S.-M., Lee, J. H., & Lim, S.-T. (2019). Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: Effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. *Food chemistry*, 272, 235-241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.174>
- Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters.

*Trends in food science & technology*, 78, 34-60.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018>

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sirohi, R., Tarafdar, A., Singh, S., Negi, T., Gaur, V. K., Gnansounou, E., & Bharathiraja, B. (2020). Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. *Bioresource Technology*, 314, 123771.
- Souto, E. B., & Severino, P. (2013). Using nanoparticles to get the most out of antioxidants in food. In (Vol. 4, pp. 1471-1473): Taylor & Francis.
- Stefanello, F. S., Dos Santos, C. O., Bochi, V. C., Fruet, A. P. B., Soquetta, M. B., Dörr, A. C., & Nörnberg, J. L. (2018). Analysis of polyphenols in brewer's spent grain and its comparison with corn silage and cereal brans commonly used for animal nutrition. *Food Chemistry*, 239, 385-401. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.130>
- Steiner, J., Procopio, S., & Becker, T. (2015). Brewer's spent grain: Source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *European Food Research and Technology*, 241, 303-315.
- Surh, Y.-J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 768-780.
- Vilar, V. J., Botelho, C. M., & Boaventura, R. A. (2006). Equilibrium and kinetic modelling of Cd (II) biosorption by algae Gelidium and agar extraction algal waste. *Water Research*, 40(2), 291-302.
- Wang, B., Luo, Y., Myung, K., & Liu, J. (2014). Effects of storage duration and temperature on the chemical composition, microorganism density, and in vitro rumen fermentation of wet brewers grains. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(6), 832.
- Wang, L., Lin, X., Zhang, J., Zhang, W., Hu, X., Li, W.,...Liu, S. (2019). Extraction methods for the releasing of bound phenolics from Rubus idaeus L. leaves and seeds. *Industrial Crops and Products*, 135, 1-9.
- Wang, S., Zhu, Z., Coomes, A., Haghseresht, F., & Lu, G. (2005). The physical and surface chemical characteristics of activated carbons and the adsorption of methylene blue from wastewater. *Journal of colloid and interface science*, 284(2), 440-446.
- Weiss, J., Takhistov, P., & McClements, D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of food science*, 71(9), R107-R116.
- Wierzba, S., & Kłos, A. (2019). Heavy metal sorption in biosorbents—Using spent grain from the brewing industry. *Journal of Cleaner production*, 225, 112-120.
- Yaashikaa, P., Kumar, P. S., & Varjani, S. (2022). Valorization of agro-industrial wastes for biorefinery process and circular bioeconomy: A critical review. *Bioresource Technology*, 343, 126126.
- Zago, E., Tillier, C., De Leener, G., Nandasiri, R., Delporte, C., Bernaerts, K. V., & Shavandi, A. (2022). Sustainable production of low molecular weight phenolic compounds from Belgian Brewers' spent grain. *Bioresource Technology Reports*, 17, 100964. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.100964>
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese medicine*, 13, 1-26.
- ŞAFAK, Ş., & ÇİFÇİ, D. İ. (2023). Treatment of industrial wastewater in the adsorption process by natural fibers. In *Development in Wastewater Treatment Research and Processes* (pp. 225-242). Elsevier.