



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 102014030303-0 B1



(22) Data do Depósito: 04/12/2014

(45) Data de Concessão: 10/01/2023

(54) Título: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PENAS MAGNÉTICAS E APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE

(51) Int.Cl.: C12N 13/00.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): MARILIA RIBEIRO SALES CADENA; PABYTON GONÇALVES CADENA; ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO; LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR.

(57) Resumo: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PENAS MAGNÉTICAS E APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE. A Presente invenção refere-se a um processo de limpeza, retirada de gordura e magnetização de penas por reação com ferro em meio alcalino. A pena é um resíduo da indústria avícola com boa resistência mecânica. Estas características permitem a aplicação em biocatálise como suporte magnético para a imobilização de biomoléculas. Adicionalmente a presente invenção também descreve a aplicação da pena magnética na imobilização de α -galactosidase, enzima utilizada para a remoção de lactose em produtos lácteos, e sua estabilidade operacional.

PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PENAS MAGNÉTICAS E APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se a um processo de tratamento e magnetização de penas avícolas, um material rico em queratina e resíduo industrial que apresenta boa resistência mecânica. Adicionalmente, a pena magnética pode ser utilizada como suporte em biocatálise, por exemplo, na imobilização de enzimas como a β -galactosidase.

Antecedentes da Invenção

[002] Catalisadores são amplamente utilizados na indústria para reduzir o tempo de produção, mas muitos deles se apresentam em tamanho incompatível com a fácil separação dos produtos de reação. Como solução, eles são imobilizados por ligações físicas e/ou químicas em suportes sólidos para facilitar a separação. Adicionalmente, a adição de propriedades físicas a estes suportes, como a magnetização, permite uma melhor aderência dos mesmos a superfícies metálicas. Em reatores existe a possibilidade de adesão seletiva onde campos magnéticos são ativados durante o processo de catálise, prendendo o suporte a uma superfície metálica, e desativado diante da necessidade de manutenção do sistema. Muitos materiais vêm sendo utilizados como suportes destacando-se as matrizes poliméricas plásticas ou derivados celulósicos. A utilização de resíduos como suportes para catalisadores pode apresentar-se como uma alternativa na redução de custos para estes processos e solução para uma série de problemas ambientais. Diante disto, a presente invenção propõe um novo processo de obtenção de penas magnéticas cuja matéria prima é resíduo da indústria avícola, como suporte para imobilização de biomoléculas.

[003] Vários suportes são descritos na literatura para a imobilização de biomoléculas e microrganismos, devido às propriedades físico-químicas de cada suporte e aos diferentes processos de imobilização, pode ocorrer modificações na atividade catalítica

sendo necessária uma nova caracterização físico-química do derivado imobilizado para cada tratamento.

[004] A pena é uma estrutura anatômica característica das aves, que constitui o material queratinoso mais abundante no mundo, devido à criação de aves em geral para o consumo humano (BERTSCH e COELLO, *Bioresource Technology* 96, 15, 1703-1708, 2005). Considerando-se que o peso das penas em relação ao peso total da ave é de aproximadamente 6 ou 7% (SAID e PIETRO, *Enzimas como agentes biotecnológicos*, 2004) e que foram produzidos no Brasil 82,32 mil toneladas de carne de frango no mundo em 2012 . O montante gerou aproximadamente 5.76 mil toneladas de penas como resíduo. A composição química destas é 91% queratina, 1.3% de lipídios e 7.9% de água (ORNITHOLOGY, 2007). Ou seja, próximo de 767 milhões de toneladas de queratina foram produzidas em 2004 apenas nesse resíduo.

[005] A queratina da pena possui aminoácidos essenciais como glicina, leucina, glutamina, prolina, alanina e cisteína, possuindo também metionina, lisina e histidina (SAID e PIETRO, *Enzimas como agentes biotecnológicos*, 2004). No entanto, esses aminoácidos não são de fácil acesso, pois essa proteína é resistente à degradação por proteases microbianas comuns como a tripsina e a papaína e por esse motivo as penas são consideradas um problema ecológico. Essa resistência presente na pena contra a degradação microbiana torna-se vantajosa a partir do momento que a mesma serve como matéria prima para o desenvolvimento de produtos que necessitem de resistência quanto ao ataque microbiano como, por exemplo, suportes para aplicação em biocatálise. A pena é um subproduto gerado pelo abate das aves para alimentação humana com o potencial acumulativo no meio ambiente (GUPTA e RAMNANI, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 1, 21-33, 2006). Por outro lado, possui uma aplicabilidade na indústria biotecnológica, como a produção de ração animal e de fertilizante agrícola orgânico (SAID e PIETRO, *Enzimas como agentes biotecnológicos*, 2004).

[006] Considerando a pena como um suporte para a imobilização de biomoléculas, certas patentes e artigos científicos apresentam a aplicação de penas em biocatálise, normalmente a pena é utilizada como substrato (matéria prima) para reação

enzimática ou não apresenta um processo de magnetização como relatado nos documentos abaixo:

[007] A patente PI 0900748-2 A2 (2009) descreve o processo para fabricação de preparados enzimáticos obtidos a partir de penas de aves e sua adição em ração animal ou agente de transformação capilar. A pena, neste caso, é utilizada como matéria prima para ação microbiana para produção de enzimas. O documento difere da presente invenção, pois a pena utilizada não passa por processos químicos de ativação ou magnetização para servir de suporte para a imobilização de células e/ou biomoléculas.

[008] A patente CN 101302506 A (2008) apresenta um método de imobilização de microrganismos em suporte para a degradação de queratina oriunda de pena. O documento difere da presente invenção por não utilizar a pena como suporte e sim como substrato para a reação enzimática.

[009] O artigo científico publicado por Schrooyen et al. (Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 221-230, 2001) descreve um método para a produção de filmes a partir de pena de galinha contendo grupos tióis livres de resíduos de cisteína. A solução com pena teve o resíduo de cisteína parcialmente carboximetilado com ácido iodoacético. O documento difere da presente invenção por utilizar reações químicas para produção de um filme com grupos cisteína livres para a imobilização de biomoléculas. Na presente invenção, a pena sofre processos de modificação por reações químicas sem comprometer sua estrutura física para a funcionalização do processo de magnetização e posterior utilização como suporte.

[010] A patente US 5354679 (1994) descreve um método de formação de gel contendo beta-quitina e diferentes microrganismos para a formação de um filme ou membrana. A preparação do gel utiliza como matéria prima pena. A patente US 4096106 (1978) apresenta um método para a imobilização de enzimas em material contendo queratina reduzida. Este material modificado pode ter como matéria prima a pena. Os documentos diferem da presente invenção, por não apresentarem processos de magnetização da pena.

[011] Para adição de propriedades físicas a suportes contendo biomoléculas imobilizadas, a magnetização apresenta vantagens como adesão seletiva em superfícies metálicas quando exposta a campos magnéticos temporários ou permanentes, isto facilita a separação do suporte aos produtos de reação em biorreatores e também permite a miniaturização destes suportes aumentando consideravelmente a área catalítica.

[012] Materiais magnéticos tem recebido grande atenção devido à sua aplicação em áreas como biologia, medicina e meio ambiente. Estes materiais são compostos de um núcleo de ferro que revestem moléculas orgânicas ou inorgânicas. As partículas magnéticas respondem a um campo magnético externo, porém não interagem entre elas em ausência do mesmo (JORDÃO, Tese de Doutorado, CCB-UFPE, 2010). O ferrimagnetismo é propriedade desses materiais magnéticos em estado óxido que possuem moléculas de ferro (Fe) em sua composição e são conhecidos como ferrita. Essa é o mineral que possui fórmula química Fe_3O_4 , é chamada magnetita mineral ou pedra imã (GONTIJO, 2007, Dissertação de Mestrado, ICE-UNIFEI, 2007).

[013] Os usos de partículas magnéticas são diversos e incluem: como matriz de afinidade para purificação de biomoléculas (ANGELI et al., *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009, 2009.), imunoenensaio (TANG et al., *Analytical Chemistry* 80, 5, 1582-1588, 2008), isolamento e purificação de proteínas e peptídeos (FRANZREB et al., *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 5, 505-516, 2006; SAFARIK e SAFARIKOVA, *BioMagnetic Research and Technology* 2, 1, 7, 2004), isolamento e purificação de ácidos nucleicos (BERENSMEIER, *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 3, 495-504, 2006), liberação controlada de drogas no organismo (ARRUEBO et al., *Nano Today* 2, 3, 22-32, 2007) imobilização de enzimas (NERI et al., *Catalysis Communications* 9, 14, 2334-2339, 2008) e imobilização (LIBERTI e WANG, US 6.013.532, 2000) e isolamento de células (MILTENYI et al., *Cytometry* 11, 2, 231-238, 1990).

[014] Certas patentes e artigos científicos descrevem processos de imobilização em suportes magnéticos, estes documentos diferem da presente invenção por não utilizarem a pena como matéria prima para o processo de magnetização e por esse

processo não se dar como o descrito nesta invenção. A pena por apresentar estrutura microscópica com grande quantidade de poros necessita de alta concentração de cloretos férrico (Fe_2Cl_3) e ferroso (FeCl_2) e isto já se caracteriza como uma diferença em relação a utilização de outros suportes sejam orgânicos ou inorgânicos.

[015] A patente CN103045666 A (2013) apresenta um método de produção de microesferas magnéticas contendo glutamato descarboxilase imobilizada para produzir ácido gama amino-butírico (GABA). O documento difere da presente invenção por utilizar materiais à base de carboidrato, podendo sofrer fácil contaminação microbiana, como suporte para a imobilização e magnetização e por não ser um processo de obtenção de partículas magnéticas.

[016] A patente CN103012815 A (2013) descreve um processo para preparação de partículas magnéticas de quitosana contendo nanocristais coloidais esféricos de óxido ferroso (Fe_3O_4). O documento difere da presente invenção por não utilizar resíduo a base de pena e cloreto férrico (Fe_2Cl_3) e ferroso (FeCl_2) no processo de magnetização.

[017] A patente CN102329438 A (2012) apresenta produção de partículas de quitosana magnéticas contendo terras raras e óxido de ferro (Fe_3O_4). O documento difere da presente invenção pelo suporte usado no processo e pelo método de magnetização não ser baseado em cloretos férrico e ferroso.

[018] O artigo científico publicado por Neri et al. (Catalysis Communications, 9, 2334-2339, 2008) descrevem método de magnetizar Dacron e citam o uso de um grama de suporte para 100 mL de água e adição de 10 mL de solução de cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e cloreto ferroso ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) na proporção de 1:1. O documento difere da presente invenção, pois as proporções não são compatíveis com a natureza física das penas devido à alta porosidade do suporte orgânico. Para que haja a magnetização delas é necessário que estejam bem distribuídas em meio aquoso, preferencialmente um grama para 200 mL de água e uma quantidade superior de cloretos férrico e ferroso, preferencialmente 20 mL da solução de cloretos para que ocorra o processo de magnetização. Além disso, no artigo de Neri et al. (Catalysis Communications, 9, 2334-2339, 2008) também é citado o processo de gotejamento para que haja a magnetização.

[019] O artigo científico publicado por Bayramoglu et al. (Catalysis Communications 8, 1094-101, 2007) descreve um método de imobilização de β -galactosidase em pérolas de poli-glicidil-metacrilato-metil-metacrilato (GMA-MMA) magnético. O documento difere da presente invenção por magnetizar o suporte de GMA-MMA em duas etapas sequenciais e em atmosfera de nitrogênio. Na presente invenção, o suporte é magnetizado em única etapa em atmosfera ambiente o que diminui os custos do processo.

[020] Os artigos científicos publicados por Amaral et al (Process Biochemistry 41, 1213-1216, 2006) e Carneiro-Leão et al. (Applied Biochemistry and Biotechnology 53, 53-58, 1991) descrevem um método de magnetizar Dacron utilizando cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e cloreto ferroso tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). O documento difere da presente invenção pelos compostos que contém ferro serem adicionados por gotejamento e na presente invenção verte-se às soluções simultaneamente, o que reduz o tempo de reação. Além disso, são citadas as temperaturas de 60 e 80 °C para que a reação ocorra após adição da solução que contenha amônia, como também é o caso de Maciel et al. (Journal of Magnetism and Magnetic Materials 324 1312-1316, 2012) que descrevem método de magnetizar levana. Para a magnetização de penas é necessária uma temperatura superior, do contrário o processo de magnetização não é eficiente.

[021] O artigo científico publicado por Jiang et al. (Biochemical Engineering Journal, 25, 15-23, 2005) cita o processo de magnetização de quitosana. O documento difere da presente invenção pelo fato de ser realizado em solução aquosa de ácido acético, com partículas de óxido férrico (Fe_3O_4) e parafina. A presente invenção propõe um método de magnetização por reação com cloretos e não por óxidos.

[022] O artigo científico publicado por Guo et al. (Enzyme and Microbial Technology, 32, 776-782, 2003) cita a produção de microesferas magnéticas de polivinil acetato-vinil benzeno. A microesfera pelas seguintes etapas: solução de magnetita produzida por solução de sulfato ferroso (FeSO_4) e cloreto férrico (FeCl_3) aquecido a 90 °C e adição de amônia; gotejamento de ácido oleico e adição a mistura de ácido clorídrico (HCl) até o pH 2 para precipitar os coloides magnéticos, estes coloides são

neutralizados e utilizados na reação de polimerização. O documento difere da presente invenção pelo suporte ser produzido com o processo de magnetização que ocorre por sulfato e cloreto e não por cloreto. No caso da pena a magnetização ocorre no suporte já preparado para o processo.

[023] O artigo científico publicado por Bahar e Çelebi (Journal of Applied Polymer Science, 72, 69-73, 1999) descreve a imobilização de enzimas em partículas magnéticas de poliestireno. O documento difere da presente invenção por utilizar clorofórmio em sua reação com magnetita e evaporá-lo em temperatura ambiente por 20 horas. Na presente invenção, não há uso do citado reagente no processo de magnetização e o suporte é peneirado para a remoção de maior quantidade de água possível e posteriormente, seco por aquecimento.

[024] A patente WO8100575 A1 (1981) descreve um processo para a imobilização de microrganismos em suporte polimérico magnetizado. O material polimérico é constituído de alginato de sódio e solução contendo o microrganismo a ser enclausurado e óxido de ferro (FeO). O alginato de sódio é um polímero orgânico com baixa resistência as forças erosivas dentro de reatores e também apresenta baixa resistência mecânica. O documento difere da presente invenção, pois o alginato ao ser misturado ao sódio forma uma malha para enclausurar as moléculas de óxido de ferro (FeO) e do microrganismo não ocorrendo reação química para a esta ligação.

[025] Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados patentes antecipando ou sugerindo ensinamentos sobre o processo para obtenção de penas magnéticas e sua aplicação em biocatálise, descrito na presente invenção. Desta forma, a invenção aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Descrição da Invenção

[026] Para os fins desta invenção, o “suporte”, uma unidade ou conjunto, pode ser qualquer material onde um catalisador ou biocatalisador pode ser ligado (imobilizado) por forças químicas e / ou físicas. Para fins desta invenção, “Derivado imobilizado” é o produto formado pelo catalisador ou biocatalisador ligado ao suporte.

[027] Para fins desta invenção, a unidade de atividade catalítica de uma enzima é expressa em unidades internacionais "U" que é definida como a concentração de enzima capaz de produzir 1 μmol de produto por minuto em pH e temperatura definidos. Entretanto, pode-se atribuir um valor de unidade por moléculas ou biomoléculas imobilizada por suporte, quando for usado para separações ou purificações.

[028] Os inventores têm identificado um novo processo para obtenção de penas magnéticas e sua aplicação em biocatálise. Seguem abaixo descrições da invenção, em suas modalidades preferidas.

[029] Seguem abaixo descrições da invenção, em algumas de suas modalidades preferidas, em relação às figuras de 1 e 2.

[030] Figura 1: Pena - A, limpa e desengordurada – B e magnética – C.

[031] Figura 2: Pena magnética (2) sendo atraída por material polimérico revestindo um ímã (1).

[032] Na primeira modalidade preferida é descrito o processo de limpeza e retirada da gordura das penas pelo seguinte método: as penas foram lavadas com água aquecida entre 30 - 90 °C, preferencialmente a 60 °C e secas por leve aquecimento (acima de 30 °C), posteriormente cortadas em pedaços pequenos. Para desengordurar, foi utilizada uma mistura de clorofórmio e metanol, onde permaneceram por, pelo menos, 20 minutos sob aquecimento 30 – 50 °C. Posteriormente, foram lavadas com água abundante e deixadas em repouso em uma solução de detergente neutro por, pelo menos, 12 horas sob aquecimento (acima de 30 °C). Depois desse período, foram lavadas com água e secas sob aquecimento (acima de 30 °C). A figura 1a e 1b compara a pena antes e após a lavagem.

[033] Na segunda modalidade preferida é descrito o processo de magnetização das penas pelo seguinte protocolo: a pena limpa e desengordurada como descrito na modalidade 1 ou a pena sem tratamento, é misturada com grande quantidade de água para hidratação preferencialmente na proporção de 1 g para 200 mL. Após isto, é adicionado à pena úmida uma solução de cloreto férrico (Fe_2Cl_3) entre 0,6 e 2,0 M, preferencialmente 1,1 M e 10 mL por grama de pena e outra solução de cloreto

ferroso (FeCl_2) entre 0,2 e 2,0 M, preferencialmente 0,6 M e 10 mL por grama de pena, simultaneamente e homogeneizado. A pena por apresentar grande quantidade de poros, necessita de uma grande quantidade desta mistura para um bom processo de magnetização. Adicionalmente, foi adicionado hidróxido de amônio para alcalinização do meio, preferencialmente em pH 11. Em seguida, a mistura foi aquecida, preferencialmente a 100 °C e 30 minutos e agitada. Por fim, a pena magnética foi submetida a sucessivas lavagens para neutralização do pH e secas sob leve aquecimento (acima de 30 °C). A figura 1b e 1c compara a pena limpa e desengordurada com a pena magnética. A figura 2 mostra a pena magnética sendo atraída por um ímã.

Exemplo

Imobilização covalente de β -galactosidase em pena magnética

[034] A β -galactosidase (EC 3.2.1.23) ou a lactase é uma enzima que tem ampla aplicação na hidrólise de β -D-galactosídeos e α -L-arabinosídeos (RICHMOND et al., 1981). Inclui-se nesse conjunto de moléculas a da lactose, um dissacarídeo constituído por uma molécula de glicose e uma de galactose (AEHLE, 2007). β -galactosidasas são encontradas em diversos organismos, como plantas e mamíferos. No entanto, as de microrganismos são um dos grupos mais estudados de enzimas, e na literatura são descritas diversas espécies de bactérias, leveduras e bolores que produzem essa enzima (WATANABE et al., 1979).

[035] Estas enzimas têm duas aplicações principais: a remoção de lactose a partir de produtos lácteos para poderem ser consumidos por pessoas intolerantes à lactose e produção de produtos galactosilados, como os galactooligosacarídeos (HUSAIN, 2010). Diversos métodos têm sido propostos para a imobilização de β -galactosidasas como a adsorção física, aprisionamento de gel e ligação covalente sobre diferentes suportes e diversos sistemas de enzimas imobilizadas foram investigados para a hidrólise da lactose do leite e do soro do leite (PANESAR et al., 2006). A tecnologia de imobilização enzimática promove várias vantagens como: melhora a estabilidade da enzima, torna

possível a operação contínua e reutilização, e evita a necessidade de separar as células do produto final na sequência de processamento (PANESAR et al., 2006).

[036] Para a imobilização da β -galactosidase, 25 mg de partículas de pena magnética seca foram incubadas com glutaraldeído (5% p/v) por 2 h, sob agitação a 25 °C. As partículas ativadas foram sucessivamente lavadas com água destilada e solução tampão citrato fostato (pH 4,5, 0,1 M) e após, incubadas por 16 horas com 4 mL de β -galactosidase (4 mg de sólido por mL) de *A. oryzae* (Sigma-Aldrich). Após o processo de imobilização, o derivado imobilizado foi sucessivamente lavado até que não se encontrasse mais proteínas no sobrenadante. A quantidade de proteína imobilizada foi calculada pela diferença entre a quantidade de proteína ofertada e a encontrada nos lavados após o processo de imobilização. Os ensaios foram realizados em triplicada e estatística descritiva realizada.

[037] Após o processo de imobilização da enzima, 130 mg de pena magnética úmida foram incubadas com 900 μ L de solução de o-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) a 30 °C. Após 10 minutos, uma alíquota de 500 μ L foi retirada e a ela adicionada 500 μ L de solução de tetraborato de sódio (10 mM). Uma unidade enzimática foi determinada como a quantidade necessária para produzir 1 μ mol do produto (o-nitrofenol) por minuto de reação nas condições ensaiadas. Os ensaios foram realizados em triplicada e estatística descritiva realizada.

[038] Para a determinação da atividade da enzima livre, 200 μ L de solução enzimática (4 mg de sólido por mL) foram incubados com 900 μ L de solução de o-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) a 30 °C. Após 10 minutos uma alíquota de 500 μ L foi retirada e a ela adicionada 500 μ L de solução de tetraborato de sódio (10 mM). Uma unidade enzimática foi determinada como a quantidade necessária para produzir 1 μ mol do produto (o-nitrofenol) por minuto de reação nas condições ensaiadas. Os ensaios foram realizados em triplicada e estatística descritiva realizada.

[039] Para a determinação das proteínas totais foi utilizado o método de Warburg-Christian (1942).

[040] Como resultados, para a imobilização foram ofertadas 4,73 mg de proteínas e foi obtido rendimento de $43,5\% \pm 12,3\%$ no processo de imobilização o que corresponde a

2,06 ± 0,58 mg de proteína imobilizada. A enzima livre apresentou atividade de 1,76 ± 0,07 U/mg de proteína enquanto que a enzima imobilizada apresentou 5,77 ± 0,086 U/mg após 6 reutilizações o que corresponde a 327,29 ± 94,93% de retenção de atividade. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

[041] Após os ensaios em batelada, o derivado imobilizado magnético foi separado dos produtos de reação pela ligação temporária ao reservatório devido à atração por um ímã enquanto os produtos da reação eram removidos.

[042] Tabela 1: Retenção de atividade da enzima β-galactosidase solúvel em relação à imobilizada e sua estabilidade operacional.

	U/mg de proteína	U/mg de suporte úmido	% da atividade da enzima livre	% atividade retida após 6º reuso
Enzima livre	1,76 ± 0,07	-	-	-
Enzima Imobilizada (1º uso)	6,43 ± 1,76	0,96 ± 0.002	364,88 ± 99,60	-
Enzima Imobilizada (6º reuso)	5,77 ± 1,67	0,86 ± 0,001	327,29 ± 94,93	89,44 ± 1,60

REIVINDICAÇÕES

1. “PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PENAS MAGNÉTICAS E APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE” **caracterizado por** um processo em que as penas foram lavadas com água aquecida entre 30 e 90 °C e secas por leve aquecimento, preferencialmente a 30 °C, posteriormente cortadas em pedaços, desengorduradas, preferencialmente em mistura de clorofórmio e metanol sob suave aquecimento entre 30 e 50 °C, em seguida, lavadas com água abundante e deixadas em repouso em uma solução de detergente neutro por 12 horas sob aquecimento acima de 30 °C, depois, foram novamente lavadas com água e secas sob aquecimento acima de 30 °C, sendo este chamado de suporte a ser magnetizado, em seguida, o suporte foi misturado com grande quantidade de água para hidratação, preferencialmente na proporção de 1:200 de pena e água, após isto, foi adicionado ao suporte úmido duas soluções na proporção de 1:10 de pena e solução, sendo uma de cloreto férrico (Fe_2Cl_3), preferencialmente entre 0,6 e 2,0 M e outra de cloreto ferroso (FeCl_2), preferencialmente entre 0,2 e 2,0 M, e homogeneizados, finalmente o suporte foi alcalinizado compreendendo pH 11 e aquecido sob agitação a 100 °C, incubado com glutaraldeído preferencialmente a 5% (p/v), por 2 h, sob agitação a 25 °C, lavado e incubado novamente com biomoléculas de interesse a serem imobilizadas.
2. “PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PENAS MAGNÉTICAS E APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** alcalinização ocorrer preferencialmente em pH 11 alcalino utilizando solução de hidróxido de amônio.
3. “PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PENAS MAGNÉTICAS E APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** suporte magnético a base de pena de galinha poder ser utilizado para a imobilização de biomoléculas.

Figura 1

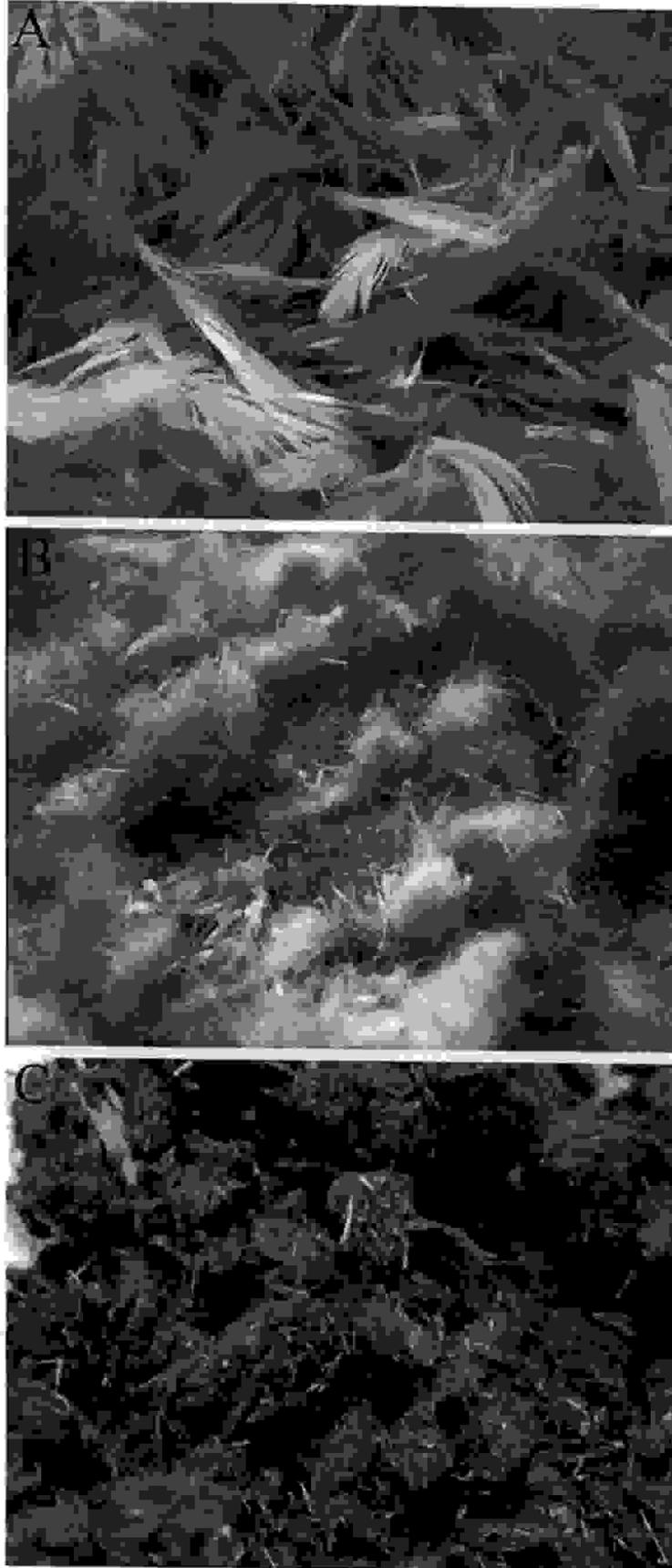


Figura 2

