



# **CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS PARA REMOÇÃO DE REBOCO DE POÇOS DE PETRÓLEO**

**Rafael Fonseca de Mesquita**

**Monografia em Engenharia Química**

## **Orientadores**

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.  
Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.  
Marta Antunes P. Langone, D.Sc.

**Junho de 2010**

# CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS PARA REMOÇÃO DE REBOCO DE POÇOS DE PETRÓLEO

***Rafael Fonseca de Mesquita***

Monografia em Engenharia Química submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

---

Ana Iraidy Santa Brígida, D.Sc.

---

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

---

Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.

Orientado por:

---

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

---

Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

---

Marta Antunes P. Langone, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ

Junho de 2010

Mesquita, Rafael Fonseca de.

Caracterização de enzimas para remoção de reboco de poços de petróleo / Rafael Fonseca de Mesquita. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2010.

xi, 41p., 29,7 cm.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2009.

Orientadores: Maria Alice Zarur Coelho e Andréa Medeiros Salgado e Marta Antunes P. Langone.

1.  $\alpha$ -amilase. 2. Cinética enzimática. 3. Completação de poços. 4. Remoção de reboco. 5. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 6. Maria Alice Zarur Coelho e Andréa Medeiros Salgado e Marta Antunes P. Langone. 7. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. I. Título.

**À minha querida família: Mário, Angélica, Daniel e Gabriel.  
Aos queridos avós: Raymundo e Maria; Geraldo e Odila, estes na  
companhia de Deus.  
Ao meu querido tio Antônio Carlos.  
À minha amada esposa Roberta.**

**“O fator decisivo para vencer o maior obstáculo é, invariavelmente,  
ultrapassar o obstáculo anterior.” (Henry Ford)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e especialmente à minha família querida, pela imensa paciência, compreensão, carinho, incentivo e puxões de orelha, pois sem eles não seria quem sou. É verdadeiramente a família que eu escolheria. Amo todos vocês, do fundo do meu coração.

Agradeço também à minha amada esposa que nos últimos anos foi uma das minhas maiores motivações. Por estar sempre ao meu lado, me apoiando e me incentivando.

Agradeço ainda a todos do laboratório 103, os que ainda estão e os que já não estão mais. Pelas conversas, conselhos e companheirismo diante de intermináveis cinéticas e em momentos de desânimo.

À Maria Alice que também teve muita paciência para me aturar. Agradeço também a Marta e a Andréia

À todos os amigos de faculdade que caminharam juntos comigo, apoiando-nos sempre.

Aos amigos do Rio e de Brasília que sempre presentes são companheiros de verdade.

## RESUMO

Mesquita, Rafael Fonseca de. **Caracterização de Enzimas para Remoção de Reboco de Poços de Petróleo**. Orientadores: Maria Alice Zarur Coelho, Andréa Medeiros Salgado e Marta Antunes P. Langone. Rio de Janeiro, 2010. Monografia apresentada à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro Químico.

### Rafael Fonseca de Mesquita

Um ponto importante na produção de petróleo de poços de geometria horizontal ou complexa é a remoção do reboco (*filter-cake*), formado a partir da deposição de polímeros naturais como amido e goma de xantana na parede do poço. Estes polímeros estão presentes nos fluidos de perfuração à base de água. Durante a perfuração, o contato do fluido de perfuração com a zona produtora pode reduzir a produtividade pela invasão destes fluidos na parede do poço. Inicialmente o reboco tem função de manutenção da estrutura da formação, mas sua posterior remoção é necessária para que se possa eliminar toda a obstrução que impeça o fluxo de petróleo na etapa de produção. Normalmente são utilizados ácidos ou oxidantes fortes para a remoção deste reboco. Porém, estes não possuem especificidade em relação ao substrato, reagindo com qualquer substância que seja passível de decomposição, e apresentam alta velocidade de reação, não degradando uniformemente todo o reboco. Em vista destes problemas, faz-se importante o estudo de enzimas para a remoção do reboco, já que estas apresentam alto grau de especificidade em relação a substratos e apresentam taxa de degradação mais lenta, portanto, mais uniforme que os ácidos e oxidantes usualmente empregados. O objetivo deste trabalho foi o estudo comparativo entre uma enzima comercial usualmente empregada em outros ramos da indústria frente a um quebrador enzimático disponível no mercado destinado à remoção de reboco nas condições do ambiente do poço. Para tal, analisaram-se os perfis de reação do quebrador enzimático de reboco comercial e do complexo enzimático termoestável comercial. Avaliou-se também a inibição do sistema, além de fazer uma comparação econômica do processo com ambos os catalisadores. Os perfis cinéticos da hidrólise de amido apresentados por ambas as amostras foram muito semelhantes, com  $V_{Máx}$  da  $\alpha$ -amilase comercial ligeiramente maior em fluido. Os estudos cinéticos a 50, 65 e a 80°C apresentaram inibição mista em salmoura, alterando os valores de  $K_m$  e  $V_{Máx}$  das duas preparações enzimáticas avaliadas. O tempo de meia-vida do quebrador de reboco apresentou-se maior, entretanto o custo da  $\alpha$ -amilase comercial é menor.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
2.1. Poços de petróleo	3
2.2. Fluidos de perfuração	4
2.3. Reboco	5
2.4. Amido	6
2.5. Remoção do reboco	8
2.6. $\alpha$ -amilase	11
2.7. Características das enzimas	14
2.8. Cinética enzimática	16
2.9. Inibição enzimática	20
2.10. Principais fatores que afetam as enzimas	23
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>26</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
<b>4.1. Equipamentos e Materiais</b>	<b>27</b>
<b>4.2. Metodologia analítica de determinação de atividade</b>	<b>28</b>
<b>4.3. Determinação dos Parâmetros Cinéticos</b>	<b>28</b>
4.3.1. Influência da temperatura de poço na atividade sob condições padrão (tampão)	28
4.3.2. Influência da força iônica (salmoura) nas temperaturas de poço	28
4.3.3. Estimação dos parâmetros cinéticos	29
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>38</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema dos poços horizontais - Maior contato com o reservatório/acompanha camadas finas _____	3
Figura 2.2. Invasão do fluido de perfuração e formação do reboco _____	6
Figura 2.3. Estrutura da amilose _____	7
Figura 2.4. Estrutura da amilopectina _____	7
Figura 2.5. Hidrólise do amido _____	8
Figura 2.6. Esquema de um tratamento com ácido/oxidante convencional _____	9
Figura 2.7. Esquema de um tratamento enzimático _____	10
Figura 2.8. Representação da ação das $\alpha$ -amilases sobre amidos _____	12
Figura 2.9. Diminuição da energia de ativação pelas enzimas _____	16
Figura 2.10. Orientação do substrato à enzima para formar produtos passando pelo complexo ES _____	17
Figura 2.11. Dependência da velocidade inicial com relação ao substrato _____	17
Figura 2.12. Representação gráfica da equação de Lineweaver-Burk _____	19
Figura 2.13. Representação do mecanismo de inibição competitiva. $K_I$ = constante de equilíbrio para ligação do inibidor à enzima; $K_s$ = constante de dissociação de ES e $k_p$ = constante de decomposição de ES em E + P _____	20
Figura 2.14. Representações gráficas de (a) $v$ versus [S] e de (b) Lineweaver-Burk no caso de inibição competitiva _____	21
Figura 2.15. Representação do mecanismo de inibição não competitiva. $K_I$ = constante de equilíbrio para ligação do inibidor ao complexo ES; $K_s$ = constante de dissociação de ES e $k_p$ = constante de decomposição de ES em E + P _____	21
Figura 2.16. Representações gráficas de (a) $v$ versus [S] e de (b) Lineweaver-Burk no caso de inibição não competitiva _____	22
Figura 2.17. Representação do mecanismo de inibição mista. $K_I$ = constante de formação de EI ou ESI; $K_s$ = constante de dissociação de ES ou ESI e $k_p$ = constante de decomposição de ES em E + P _____	22
Figura 2.18. Representações gráficas de (a) $v$ versus [S] e de (b) Lineweaver-Burk no caso de inibição mista _____	23
Figura 2.19. Efeito do pH na atividade enzimática _____	23
Figura 2.20. Efeito da temperatura na atividade enzimática _____	24

Figura 5.1. Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação catalisada pela amilase comercial em tampão a 50, 65 e 80°C _____	31
Figura 5.2. Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação catalisada pela amilase comercial em salmoura a 50, 65 e 80°C _____	32
Figura 5.3. Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação catalisada pelo quebrador enzimático em tampão a 50, 65 e 80°C _____	33
Figura 5.4. Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação catalisada pelo quebrador enzimático em salmoura a 50, 65 e 80°C _____	34
Figura 5.5. Representação de Lineweaver-Burk para a $\alpha$ -amilase comercial em salmoura e tampão a 50°C (a), 65°C (b) e 80°C (c) _____	36
Figura 5.6. Representação de Lineweaver-Burk para o quebrador enzimático em salmoura e tampão a 50°C (a), 65°C (b) e 80°C (c) _____	36

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1. Composição da salmoura _____	27
Tabela 5.1. Parâmetros cinéticos da $\alpha$ -amilase comercial _____	32
Tabela 5.2. Parâmetros cinéticos do quebrador enzimático de reboco _____	35

# 1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de perfuração de poços de petróleo, diferentes tipos de fluidos de perfuração são utilizados junto às brocas com a função de resfriar, lubrificar, levar os cascalhos à superfície e controlar a pressão do poço. Os fluidos a base de água normalmente contém polímeros naturais como amido e/ou goma xantana, além de carbonato de cálcio em uma solução altamente salina (Luyster *et al.*, 2000). Na perfuração, os polímeros presentes nesse fluido se depositam na parede formando um reboco (*filter-cake*). A remoção deste reboco é necessária para eliminar a obstrução que impede o fluxo do petróleo durante a produção ou a injeção de fluidos (Thomas, 2001).

O amido é um dos principais componentes do fluido de perfuração e do reboco (Queiroz, 2002). Este polímero natural é formado pela união de unidades de  $\alpha$ -D-glicose através de ligações glicosídicas. A hidrólise do amido envolve a quebra das ligações glicosídicas com concomitante adição de uma molécula de H<sub>2</sub>O por ligação rompida. Esta reação pode ser catalisada por ácidos ou enzimas.

Na indústria do petróleo são utilizados ácidos ou oxidantes fortes para remoção do reboco (Hodge *et al.*, 1996). Porém, esses compostos reagem com qualquer substância passível de degradação, incluindo as tubulações, os hidrocarbonetos e muitos dos componentes da formação (Luyster *et al.*, 2000; Suhy e Harris, 1998). Uma alternativa a estes reagentes é a aplicação de soluções enzimáticas que hidrolisem os polímeros presentes no reboco. A vantagem é que as enzimas atuam sobre substratos específicos, no caso os polímeros do reboco, não degradando a formação, nem os equipamentos ou mesmo o produto (Beall *et al.*, 1996).

As  $\alpha$ -amilases são enzimas que catalisam a hidrólise do amido de modo randômico. Estas enzimas agem no interior da cadeia do polissacarídeo e realizam a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4 do amido (Gupta *et al.*, 2003). Pouco se conhece sobre a atuação das  $\alpha$ -amilases ou qualquer outra enzima nos processos de remoção de reboco (Battistel *et al.*, 2005). Portanto, neste trabalho foi investigado o comportamento cinético de uma  $\alpha$ -amilase comercial e de um quebrador enzimático de reboco frente às condições de completação usualmente empregadas em poços das bacias brasileiras (altas salinidade e temperaturas) visando obter uma comparação entre os dois produtos a nível reacional. Foi feita ainda uma comparação dos custos de cada produto, comparando também suas atividades e meias-vidas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Poços de Petróleo

Para uma eficiente exploração e produção do petróleo, faz-se necessário o estudo e o entendimento dos diversos fatores que podem influenciar esta eficiência. Neste trabalho serão abordados apenas alguns fatores ligados a poços de petróleo, nas etapas de perfuração e produção dos mesmos. Existem diversos tipos de poços para a produção de petróleo. Durante muitos anos os poços verticais eram os únicos encontrados. Com o avanço da tecnologia de exploração do petróleo novas formas de perfuração foram surgindo. Hoje em dia, na exploração do petróleo *offshore* são encontrados os poços de geometria complexa que é o caso dos poços horizontais. Estes são mais comuns de serem encontrados pois apresentam maior produção devido à sua maior área de contato com a área produtora, ou seja, maior área de escoamento (Figura 2.1). Além disso, poços de trajetória horizontal conseguem acompanhar reservatórios mais estreitos (Figura 2.1) (Prado, 2003). Por isso a utilização deste tipo de poço vem aumentando cada vez mais, apresentando novos problemas como o surgimento do dano à formação gerado pela invasão do fluido de perfuração na parede do poço (Browne *et al.*, 1995).



**Figura 2.1.** Esquerma dos poços horizontais - Maior contato com o reservatório/acompanha camadas finas (modificado de Prado, 2003)

## 2.2. Fluidos de Perfuração

Os fluidos de perfuração são misturas complexas compostas de sólidos e de líquidos, podendo englobar inclusive gases. Estes são formulados especificamente para atender determinada etapa da operação, ou seja, em um único poço podem ser usados mais de um sistema de fluido. Os fluidos de perfuração são basicamente divididos em três tipos, de acordo com o material dispersante: a base de ar ou gás, a base de óleo e a base de água (Thomas *et al.*, 2001, Caenn e Chillingar, 1996). O mais utilizado é o fluido a base de água devido ao seu baixo custo e baixo grau de poluição. Os fluidos de perfuração a base de água, compostos exclusivamente por polímeros (amido ou celulose e/ou goma xantana), são amplamente utilizados (Suhy e Harris Jr., 1998).

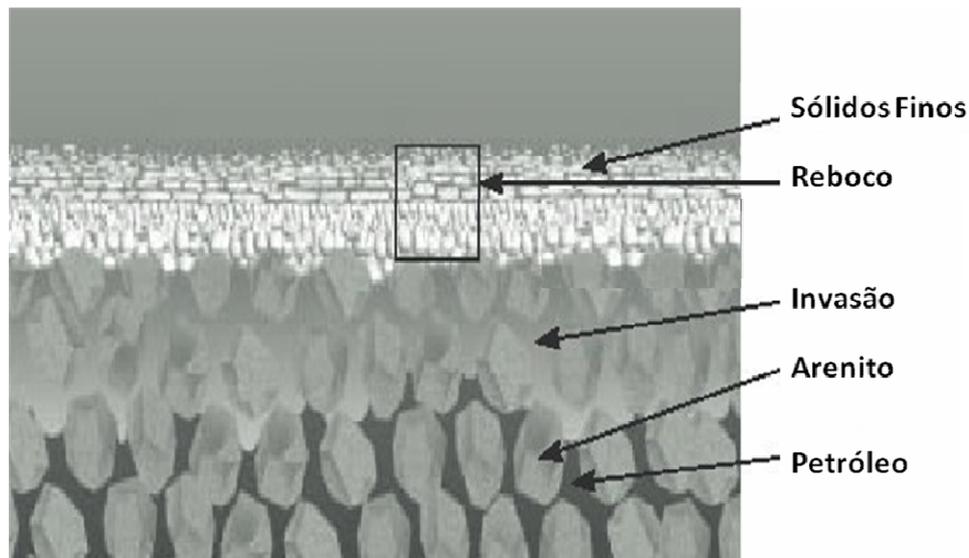
O fluido de perfuração tem suma importância tanto na etapa de perfuração quanto na etapa de produção. Na primeira etapa, o fluido apresenta diversas funções tais como (Lomba, 2002; Caenn e Chillingar, 1996):

- carrear o cascalho até a superfície;
- resfriar e limpar a broca;
- lubrificar a coluna de perfuração para diminuir o atrito entre esta e o poço;
- manter a estabilidade do poço;
- formar uma fina e impermeável camada de reboco (*filter cake*).

Previamente à etapa de produção, uma das principais funções do fluido é desobstruir o poço para que haja uma eficiente produção. A desobstrução incompleta do poço pode acarretar em prejuízo.

### **2.3. Reboco**

O reboco é um dos principais causadores de danos à formação pela redução da permeabilidade do reservatório de petróleo causado por vários processos adversos. O reboco apresenta várias funções durante a perfuração. Entretanto, a principal delas é selar a formação produtora permeável e controlar a invasão do fluido de perfuração à formação, pois o contato deste fluido com a zona produtora pode alterar as características permo-porosas do reservatório, reduzindo a sua produtividade. Inicialmente, forma-se um reboco nas paredes para prevenir a invasão dos fluidos da formação (óleo, gás ou água) para dentro do poço (Figura 2.2). Isto é possível devido à maior pressão da coluna do fluido em relação à pressão dos fluidos da formação produtora. Esta diferença de pressão entre a coluna do fluido e a formação faz com que o fluido seja empurrado contra a superfície permo-porosa da parede da formação (Nery & Macari, 2005). Primeiramente o fluido invade os poros da formação produtora (reboco interno). Com o tempo, há o depósito de sólidos do fluido nos poros, impedindo ou diminuindo uma maior invasão do fluido (reboco externo). Com isto há uma melhora na estabilidade do poço e previne problemas na fase de perfuração e produção.



**Figura 2.2.** Invasão do fluido de perfuração e formação do reboco

## 2.4. Amido

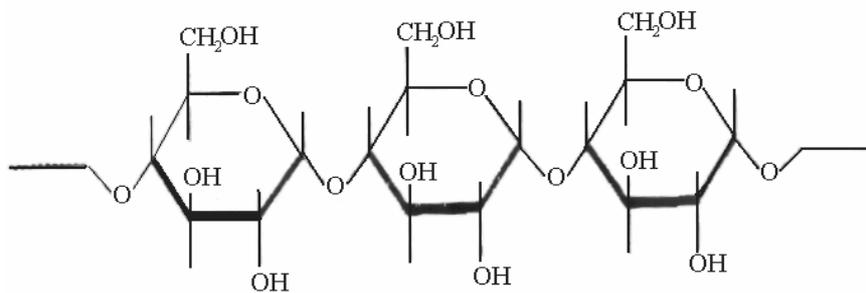
O reboco fixado na parede do poço é constituído basicamente de dois polímeros naturais (amido solúvel e goma de xantana) e sal, que são chamados de aditivos e de partículas sólidas. Os polímeros naturais são responsáveis por bloquear os poros do poço impedindo a invasão do fluido de perfuração.

A goma de xantana é um biopolímero oriundo da fermentação bacteriana, apresentando função reológica e ajudando no carregamento dos cascalhos até a superfície (Caenn *et al.*, 1996). Normalmente está presente nas composições dos fluidos em quantidades menores que a do amido sendo, portanto, o polímero que menos influencia na formação dos rebocos (Queiroz, 2002).

O amido pode ser utilizado em todos os tipos de fluido (a base de ar, água ou óleo), mas é particularmente usado em fluidos a base de água salgada ou salmoura. Este é o principal componente de fluidos de perfuração aplicados em poços de geometria horizontal (Queiroz, 2002). É formado por açúcares simples, ou monossacarídeos,

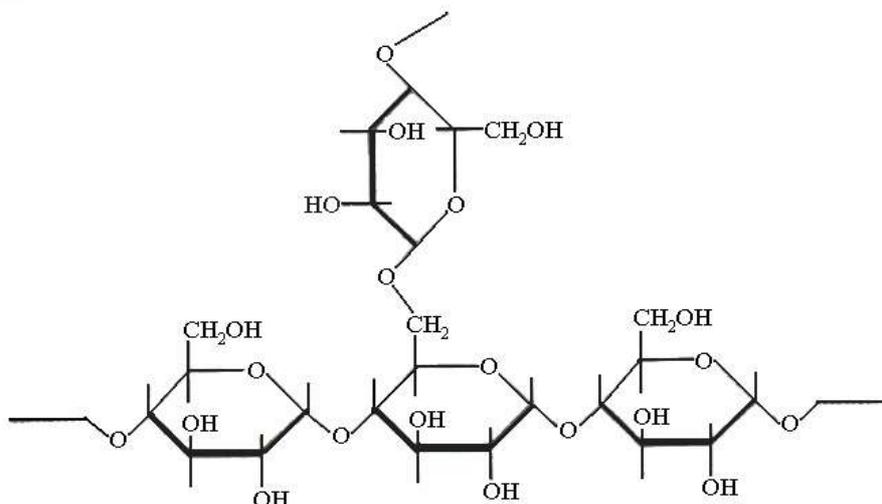
unidos através de ligações glicosídicas. A composição do amido apresenta uma mistura de dois polissacarídeos: a  $\alpha$ -amilose e a amilopectina.

A  $\alpha$ -amilose é uma molécula formada por uma cadeia linear de unidades (500-2000) de D-glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 (Figura 2.3), sendo a menor componente do amido (15-25%) (Pires, 2002).



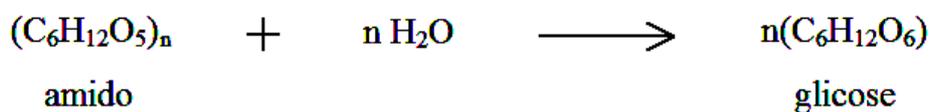
**Figura 2.3.** Estrutura da amilose.

Já a amilopectina é formada por uma estrutura ramificada constituída por cadeias de 20 a 25 unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranoses unidas em ligações  $\alpha$ -1,4 (cadeia linear). Essas cadeias estão unidas entre si através de ligações  $\alpha$ -1,6 (ramificações) e contém apenas uma extremidade redutora na cadeia (Figura 2.4), sendo o maior componente do amido (75-85%) (dos Reis, 1983).



**Figura 2.4.** Estrutura da amilopectina

A hidrólise do amido envolve a quebra das ligações glicosídicas com concomitante adição de uma molécula de H<sub>2</sub>O por ligação rompida (Figura 2.5).



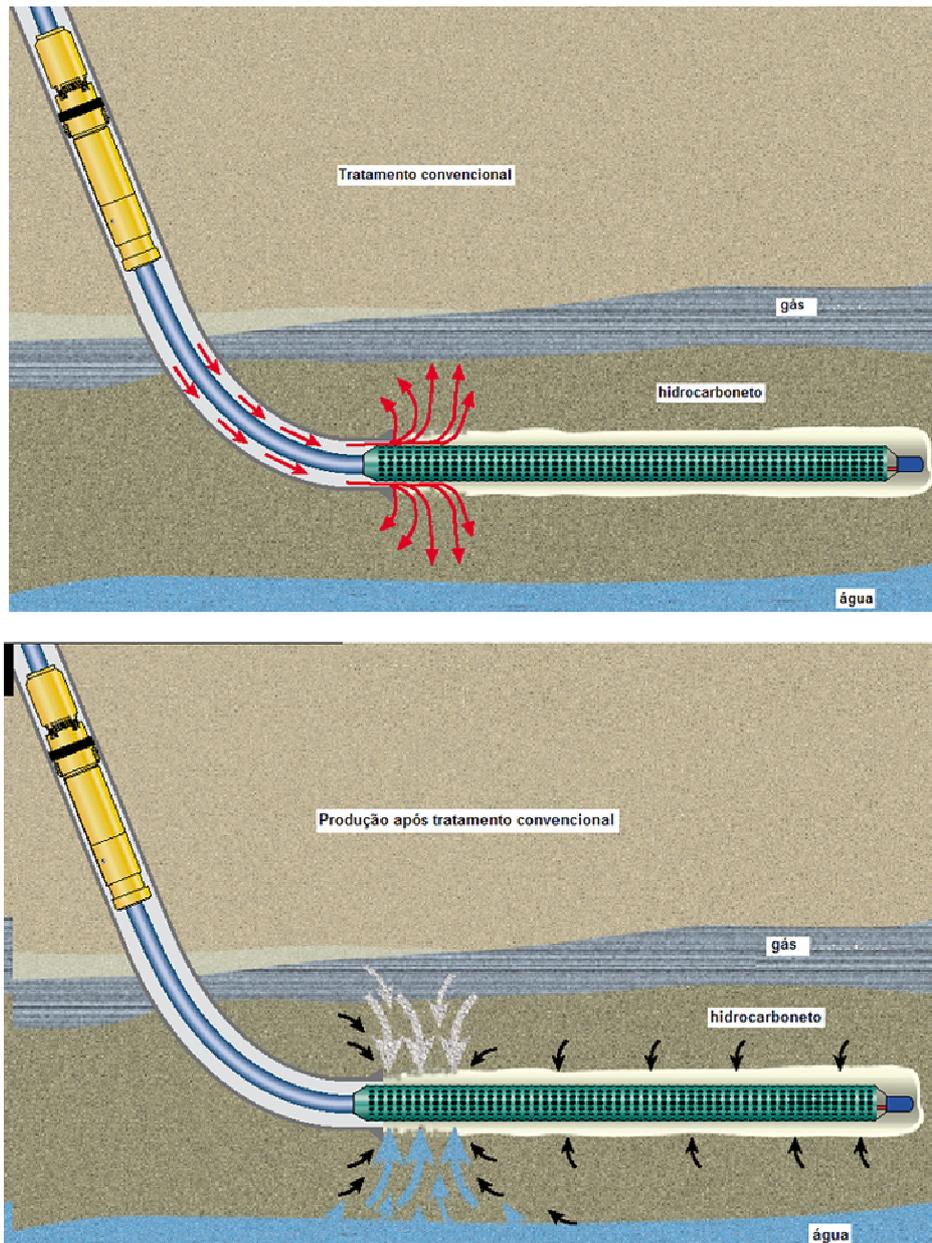
**Figura 2.5.** Hidrólise do amido (dos Reis, 1983).

## 2.5. Remoção do Reboco

Antes que a produção do petróleo se inicie, faz-se necessária a remoção total do reboco, diminuindo assim o dano à formação. A decomposição química é a mais importante forma de remoção. O amido representa uma grande fração na composição de muitos fluidos, de tal modo que só com a sua remoção pode haver uma redução do dano à formação (Al-Otaibi *et al.*, 2004). A remoção do reboco ocorre portanto quando há a hidrólise do amido por um quebrador. As soluções de quebradores de polímeros que são usualmente aplicadas são divididas em três grupos: ácidos, oxidantes e enzimas.

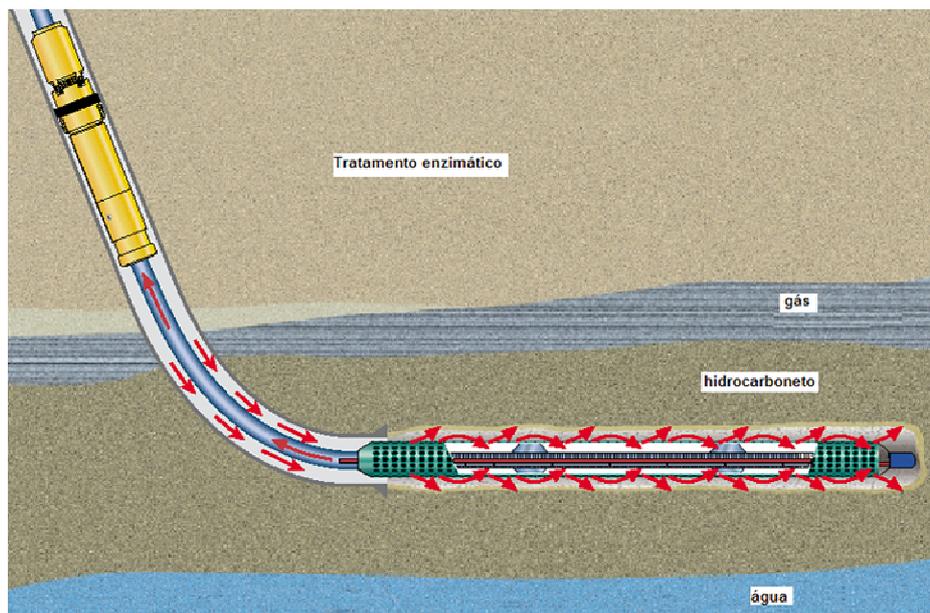
Os ácidos e oxidantes tem eficiente aplicação na degradação de polissacarídeos como amido e goma de xantana. Entretanto, em alguns casos, faz-se necessário um tempo de exposição maior ou reagente mais forte para uma degradação mais eficiente do reboco. Soma-se isso ao fato dos ácidos e oxidantes não terem especificidade ao reagirem, o que causa danos aos equipamentos, ao petróleo, a alguns componentes da formação e até mesmo a componentes do próprio fluido, gerando maior custo de produção. Além disso, a remoção do reboco por ácidos e oxidantes não é controlada, ocorrendo uma remoção maior do reboco no início do poço sem que na parte final do poço haja a remoção adequada. Se for injetada uma quantidade maior desses reagentes ou se houver um tempo maior de permanência desses reagentes no poço, estes reagentes

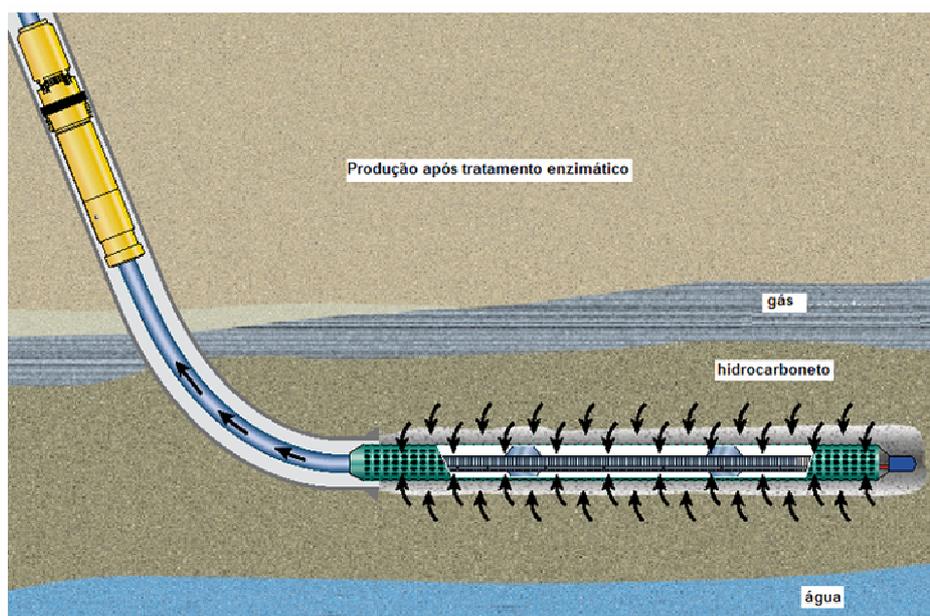
podem invadir a zona produtora no início do poço onde o reboco é primeiro removido, ocasionando uma produção ineficiente (baixa vazão de petróleo) e o contato desses reagentes com o óleo, o que não é desejável. Adicionalmente, em caso de acidente estes reagentes podem causar dano ao meio ambiente. A Figura 2.6 ilustra um tratamento com ácido/oxidante convencional.



**Figura 2.6.** Esquema de um tratamento com ácido/oxidante convencional (modificado de Schlumberger, 2007).

As enzimas são proteínas produzidas por células de organismos vivos que têm capacidade de atuar como catalisadores, ou seja, aumentam a velocidade da reação devido à diminuição da energia livre de ativação. São capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores, promovem reações específicas, ou seja, reagem apenas com um substrato específico, gerando produtos também específicos. No caso da remoção de reboco, as enzimas não reagem com outro composto senão o amido. As enzimas são lentas na degradação, porém neste caso não são consumidas durante a reação. Isto beneficia a remoção completa e homogênea do reboco em poços horizontais muito longos. As enzimas são quebradores ambientalmente corretos, não danificando assim o meio ambiente. A Figura 2.7 ilustra a aplicação direta de enzimas para degradar o polímero do reboco em um poço.





**Figura 2.7.** Esquema de um tratamento enzimático (modificado de Schlumberger, 2007).

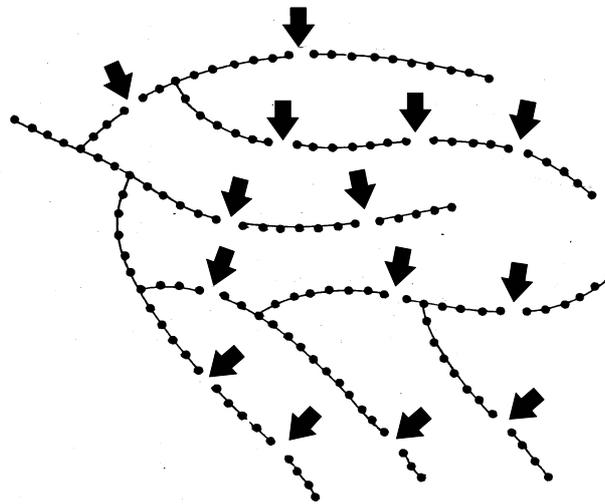
## 2.6. $\alpha$ -amilase

As fontes para obtenção de enzimas podem ser os vegetais, os animais e os microrganismos, sendo que grande parte das enzimas utilizadas industrialmente tem origem microbiana (Spier, 2005).

As enzimas responsáveis pela degradação do amido constituinte do reboco são as amilases. Recebem este nome pois as enzimas são classificadas em função do tipo de reação que catalisam (Stryer, 1992). São encontradas em diversas fontes (plantas, animais e microrganismos) sendo que as que atendem à demanda industrial são as produzidas por microrganismos, pois são economicamente mais vantajosas e por serem de manuseio facilitado (Gupta *et al.*, 2003).

Entre as amilases industriais, se destacam as  $\alpha$ -amilases ou 1,4- $\alpha$ -D-glucan glicanohidrolases (E.C. 3.2.1.1). As  $\alpha$ -amilases catalisam a hidrólise do amido de modo randômico agindo em ligações no interior da cadeia da molécula do amido, resultando

na formação de oligossacarídeos lineares e ramificados com cadeias de vários tamanhos (Gupta *et al.*, 2003). As  $\alpha$ -amilases hidrolisam somente as ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas do amido (Figura 2.8). A designação  $\alpha$ -amilase é devido ao fato dos produtos de degradação serem açúcares com a configuração óptica  $\alpha$  (Pires, 2002; Gerhartz *et al.*, 1990). Existem vários tipos de  $\alpha$ -amilases e estas diferem entre si pela especificidade ao substrato, pela variação da faixa de pH ótimo, estabilidade a temperatura e pela origem. A  $\alpha$ -amilase bacteriana degrada o amido gelatinizado 300 vezes mais rápido que a enzima fúngica (Uhlig, 1998).



**Figura 2.8.** Representação da ação das  $\alpha$ -amilases sobre amidos. (Modificado de da Cunha, 2002).

A presença de  $\text{Ca}^{+2}$  (co-fator de ativação) é essencial para estabilização da enzima. Sem este, a enzima torna-se inativa e mais susceptível à desnaturação térmica ou ácida. O cálcio não participa diretamente da formação do complexo enzima-substrato, mas mantém a molécula da enzima em ótima conformação para sua máxima atividade e estabilidade. Traços de cálcio presentes no amido são geralmente suficientes para compensar a ausência deste íon na enzima, mesmo no caso de enzimas livres de

cálcio. Entretanto, a adição de sais de cálcio é normalmente recomendada para ativar a proteção máxima da enzima contra a desnaturação térmica (Pires, 2002).

As amilases bacterianas comerciais normalmente são produzidas por culturas de *Bacillus amyloliquefaciens* e *B. licheniformis*. A  $\alpha$ -amilase das culturas de *Bacillus licheniformis* são as amilases termoestáveis comerciais mais utilizadas. Esta enzima possui um peso molecular de 28kDa. Tem como co-fatores de ativação os íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e como inibidores  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^-$ ,  $\text{MoO}_4^-$  e iodo acetato de sódio. A adição de 3,4 ppm de cálcio à amilase de *B. licheniformis* é o suficiente para estabilizar a enzima, contrastando com a  $\alpha$ -amilase de *B. amyloliquefaciens*, que necessita de 150 ppm de  $\text{Ca}^{2+}$  (Uhlig, 1998). A  $\alpha$ -amilase de *Bacillus licheniformis* termoestável ao hidrolisar o amido, gera como produto dextrinas solúveis e oligossacarídeos (Gupta *et al.*, 2003; van der Maarel *et al.*, 2002).

As enzimas são aplicadas na remoção de reboco normalmente em soluções salinas de KCl ou NaCl denominadas salmouras. Quando a salmoura é de NaCl, a própria água do mar pode ser utilizada.

Para uma melhor compreensão a respeito da remoção de reboco por enzimas faz-se necessário o conhecimento de algumas características das enzimas e de fatores que afetam a ação das mesmas. Para tanto será abordado, sucintamente, alguns conceitos de cinética enzimática, inibição enzimática e fatores ambientais.

## **2.7. Características das Enzimas**

Como referido anteriormente, as enzimas atuam como catalisadores aumentando a velocidade da reação. A velocidade com que ocorre uma reação enzimática é fator essencial para conhecer as características das enzimas. Pode-se definir se determinada

enzima é melhor empregada em determinada situação que outra, além de ser possível determinar o tempo de residência do fluido contendo a enzima no poço para uma completa remoção do reboco. Para tanto, é necessário conhecer a velocidade de reação de uma enzima e os fatores que a influenciam através da cinética enzimática, onde é avaliada a quantidade de produto formado ou quantidade de substrato consumido por unidade de tempo. Entre as variáveis mais importantes na cinética enzimática estão a concentração de enzima, de substratos e produtos (inibidores, ativadores), a força iônica, o pH e a temperatura (Voet *et al.*, 2002; Frontaura, 1994; Stryer, 1992). Portanto, é essencial o conhecimento do comportamento das enzimas na maioria dos processos industriais (Uhlig, 1998). Se levarmos em consideração que determinada enzima pode não estar totalmente ativa, ou seja, parte dela estar inativa, é mais apropriada a quantificação da real atividade de uma enzima com base em medidas cinéticas nas condições a serem empregadas no processo industrial em questão.

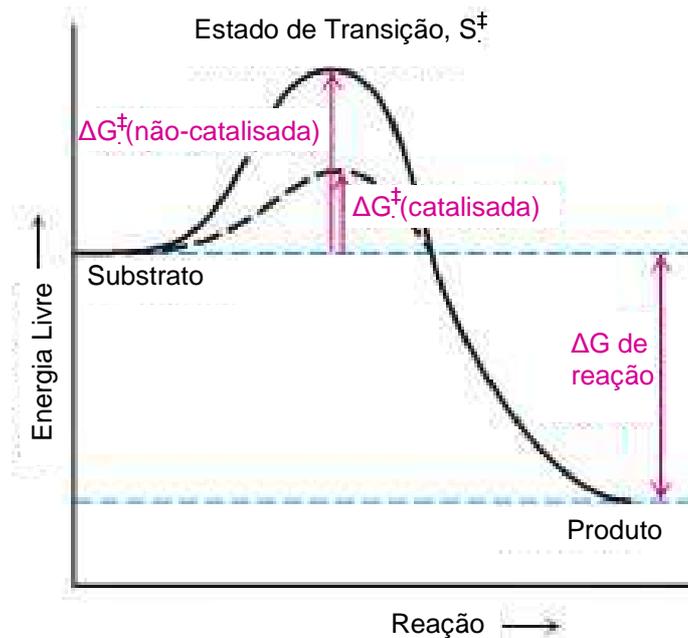
A atividade enzimática é um valor importante para a caracterização de uma enzima. A atividade depende da concentração da enzima e de substrato, sendo que sua quantificação se baseia na medida da velocidade inicial de reação, ou seja, sua atividade catalítica. A atividade enzimática assim definida representa o máximo potencial catalítico de uma enzima para um dado conjunto de condições ambientais. Mesmo que se pudesse quantificar uma determinada enzima em uma mistura, esta informação não necessariamente demonstraria sua capacidade catalítica (p.ex. a enzima poderia estar parcialmente inativada). Por isso, é mais adequado, do ponto de vista prático, a quantificação de uma enzima com base em medidas cinéticas. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida pela quantidade de enzima que produz 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto sob condições definidas de temperatura, pH, concentração de

substrato (Segel, 1993). A atividade específica é expressa em termos de atividades por miligrama de proteína (U/mg).

Para um bom entendimento de como as enzimas operam, é preciso considerar duas propriedades termodinâmicas da reação: (1) a diferença da energia livre ( $\Delta G$ ) entre produto e substrato e (2) a energia requerida para iniciar a conversão de reagente em produto. O primeiro determina se a reação é espontânea e o segundo determina a taxa de reação. As enzimas são capazes de alterar apenas a segunda propriedade. Uma reação apenas ocorrerá espontaneamente se o  $\Delta G$  for negativo. Se este for zero diz-se que a reação está em equilíbrio e se positivo a reação não ocorre espontaneamente.

Em uma reação enzimática o substrato não vai direto para o produto, mas passa primeiro por um estado de transição ( $S^\ddagger$ ). Este estado tem maior energia livre que os próprios substrato e produto. A diferença de energia livre entre o estado de transição e o substrato é chamado de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\ddagger$ ), como observado na figura 2.9. As enzimas têm a função de reduzir a energia de ativação, ou seja, as enzimas facilitam a formação do estado de transição diminuindo  $\Delta G^\ddagger$ . A combinação do substrato e enzima cria um novo caminho no qual a energia do estado de transição é menor que a requerida na reação na ausência da enzima (Figura 2.10) (Stryer, 1992).

Portanto, a enzima altera apenas a taxa de reação e não o equilíbrio reacional. Em outras palavras, enzimas aceleram apenas a chegada ao ponto final do equilíbrio não mudando a sua posição. A posição do equilíbrio é função apenas da energia livre entre o substrato e o produto.



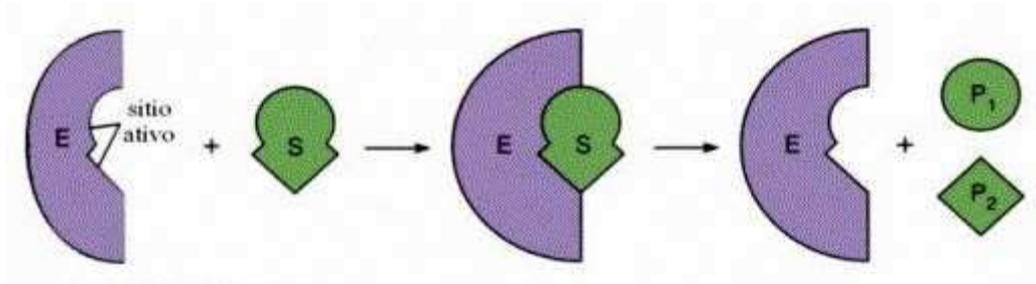
**Figura 2.9.** Diminuição da energia de ativação pelas enzimas (Modificado de Stryer, 1992).

## 2.8. Cinética Enzimática

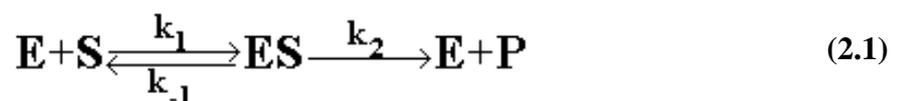
Muito do poder catalítico das enzimas é oriundo da ligação que é formada entre ela e o substrato promovendo o estado de transição: o complexo enzima-substrato (ES). O substrato é orientado a uma região específica da enzima (sítio ativo) para formar o complexo ES e então formar o produto ou produtos (Figura 2.10). A maioria das enzimas são seletivas ao substrato com qual se ligam. O sítio ativo é uma fissura tridimensional formada por grupos oriundos de diferentes partes de seqüência de aminoácidos (Stryer, 1992).

Para muitas enzimas, a velocidade inicial de reação,  $V_o$ , varia com a concentração de substrato [S] como mostrado na figura 2.11. Esta velocidade aumenta linearmente com a concentração de substrato e diminui até se aproximar de um máximo em altas concentrações de substrato. A dada concentração de enzima,  $V_o$  é quase linearmente proporcional com [S], quando [S] é baixa, e é independente de [S] quando

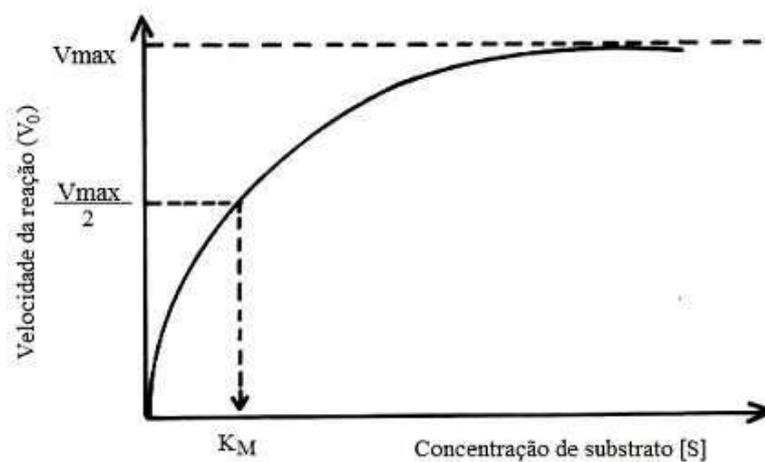
[S] é alta. Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Mentem propuseram um modelo simples para explicar estas características cinéticas. O modelo proposto, que é o mais simples que representa as propriedades cinéticas de muitas enzimas é representado na equação 2.1.



**Figura 2.10.** Orientação do substrato à enzima para formar produtos passando pelo complexo ES.



onde: E = enzima livre; S = substrato; ES = complexo enzima-substrato; e  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  = constantes de velocidades para formação de ES, dissociação de ES e da decomposição de ES em P, respectivamente.



**Figura 2.11.** Dependência da velocidade inicial com relação ao substrato.

A velocidade máxima,  $V_{max}$ , é atingida quando os sítios catalíticos das enzimas estão saturados com substrato. Ou seja,  $[ES] = [E]_T$ . A equação de Michaelis (Equação 2.2) mostra a relação que a velocidade inicial tem com a  $V_{max}$ ,  $[S]$  e  $K_M$ . E a equação 2.3 mostra a relação entre  $K_M$  e  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ .  $K_M$  é a constante de Michaelis e tem dois significados. Primeiro,  $K_M$  é a concentração de substrato na qual metade dos sítios ativos estão preenchidos. Segundo, o valor de  $K_M$  também é associado à afinidade da enzima pelo substrato. Assim, quanto menor seu valor numérico, maior sua afinidade pelo substrato (Segel, 1993, Voet *et al.*, 2002).

$$v = v_o = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.2)$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.3)$$

Podemos observar na equação 2.2 que se a concentração de substrato for muito baixa ou muito menor que  $K_M$ ,  $V_o = (V_{max}/K_M) [S]$ ; a velocidade inicial é diretamente proporcional à concentração de substrato. E para altas concentrações de substrato, quando  $[S]$  é muito maior que  $K_M$ ,  $V_o = V_{Max}$ ; isto é, a velocidade é máxima independente da concentração do substrato (Figura 2.11).

Manipulando algebricamente a equação de Michaelis-Mentem e linearizando-a podemos obter a equação 2.4. Esta é a equação de Lineweaver-Burk e é o método mais

utilizado para determinar os parâmetros cinéticos  $V_{max}$  e  $K_M$ , pois é um método gráfico, facilitando assim a visualização dos valores.

$$\frac{1}{v} = \left( \frac{K_M}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.3)$$

Nessa equação, os valores de velocidade inicial e concentrações de substrato obtidos na prática são colocados na forma de  $1/v_0$  e  $1/[S]$ . Assim é possível obter o gráfico de Lineweaver-Burk ou gráfico dos duplos-recíprocos (Figura 2.12), onde a inclinação da reta será  $K_M/V_{max}$ , a interseção do eixo  $1/v$  será  $1/V_{max}$ , e a interseção com o eixo  $1/[S]$  será  $1/K_M$ . Uma das desvantagens desse gráfico é que para valores pequenos de  $[S]$ , pequenos erros na determinação da velocidade provocam grandes erros em  $1/v$ , conseqüentemente levam a grandes desvios em  $K_M$  e  $V_{max}$ . É notório que existem outros métodos melhores para determinar  $K_M$  e  $V_{max}$ , entretanto o gráfico de Lineweaver-Burk é importante para visualização dos dados em relação a ação de inibidores (Segel, 1993, Voet *et al.*, 2002).

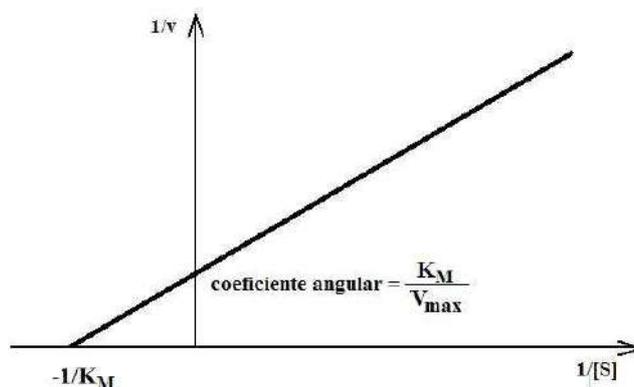
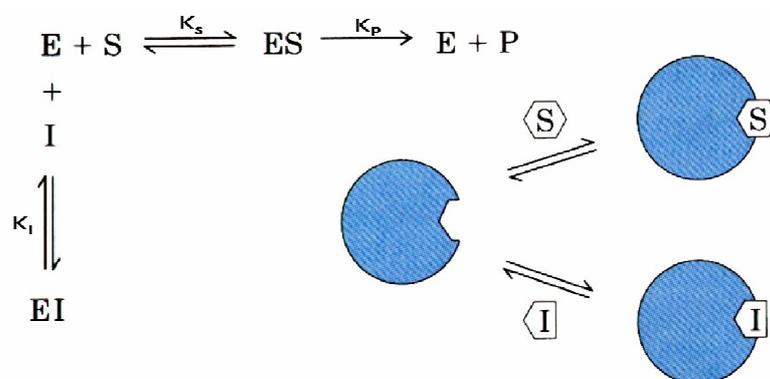


Figura 2.12. Representação gráfica da equação de Lineweaver-Burk

## 2.9. Inibição Enzimática

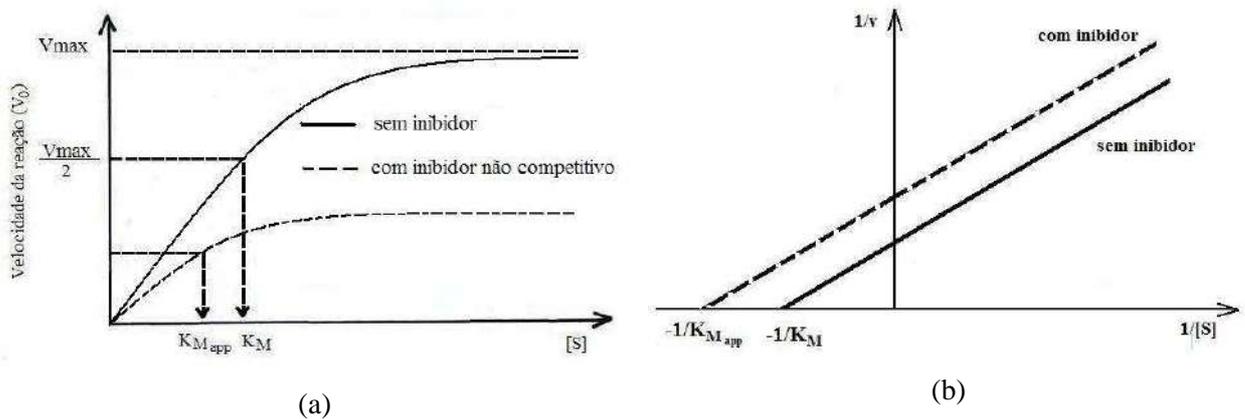
Os inibidores enzimáticos são agentes moleculares que interferem na catálise, tornando-a mais lenta. O inibidor também pode, em alguns casos, ser o próprio produto da reação enzimática e/ou seu substrato. Existem duas classes amplas de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis (Segel, 1993, Voet *et al.*, 2002). Os mais comuns de serem encontrados são os reversíveis cujo tipo de inibição se divide em três grupos: inibição competitiva, não-competitiva e mista. Na presente revisão apenas as inibições competitiva, não competitiva e mista em sistemas simples serão consideradas.

Um inibidor competitivo compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. O inibidor (I) ocupa o sítio ativo impedindo a fixação pelo substrato (Figura 2.13). Muitos inibidores competitivos são compostos que se parecem ao substrato e que se combinam com a enzima formando o complexo enzima-inibidor (EI). Devido ao inibidor se unir de maneira reversível à enzima, é possível mudar o sentido da competição em favor do substrato simplesmente com a adição de mais substrato. Quando a [S] excede muito a [I], a probabilidade da junção de uma molécula de inibidor é menor, motivo pelo qual a reação mostra o mesmo  $V_{max}$  que àquele obtido no sistema sem inibição. Esta inibição altera o valor de  $K_M$  afetando a afinidade da enzima pelo seu substrato, contudo sem alterar o valor de  $V_{max}$ . O  $K_M$  na presença do inibidor, ou  $K_M$  aparente, é maior do que o  $K_M$  sem o inibidor ( $K_{M,app} > K_M$ ) (Figura 2.14).



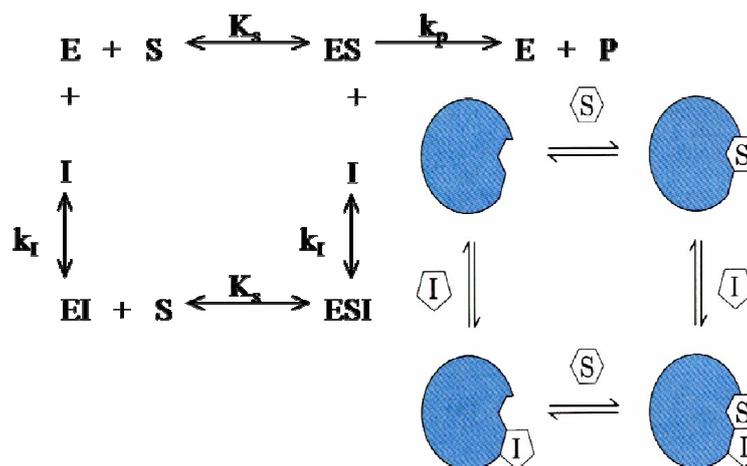
**Figura 2.13.** Representação do mecanismo de inibição competitiva.  $K_I$  = constante de equilíbrio



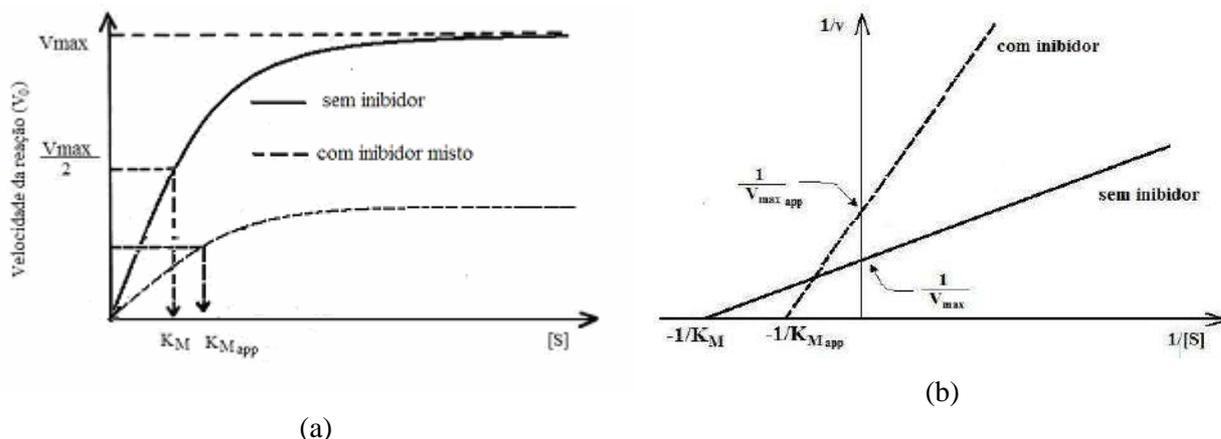


**Figura 2.16.** Representações gráficas de (a)  $v$  versus  $[S]$  e de (b) Lineweaver-Burk no caso de inibição não competitiva (modificado de Segel, 1993 e Voet *et al.*, 2002).

Um inibidor misto se liga a um sítio distinto ao do substrato, porém pode se ligar tanto a ES quanto a E (Figura 2.17), enquanto que o inibidor não competitivo só se liga ao ES. Nesse caso o valor de  $V_{max}$  diminui e o valor de  $K_M$  pode tanto diminuir como pode aumentar dependendo da enzima estudada. A figura 2.18 mostra o esquema de uma das possíveis representações gráficas que pode ocorrer na inibição mista (Voet *et al.*, 2002).



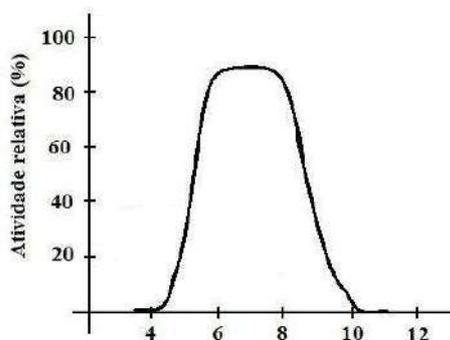
**Figura 2.17.** Representação do mecanismo de inibição mista.  $K_i$  = constante de formação de EI ou ESI;  $K_s$  = constante de dissociação de ES ou ESI e  $k_p$  = constante de decomposição de ES em E + P (Modificado de Segel, 1993).



**Figura 2.18.** Representações gráficas de (a)  $v$  versus  $[S]$  e de (b) Lineweaver-Burk no caso de inibição mista (modificado de Segel, 1993 e Voet *et al.*, 2002).

## 2.10. Principais fatores que afetam as enzimas

As enzimas são facilmente afetadas pelo meio onde elas estão. Fatores como pH, temperatura, força iônica, são alguns dos fatores que mais afetam as enzimas. As enzimas têm um pH ótimo, ou seja, um intervalo de pH no qual a sua atividade é máxima (Figura 2.19). Para valores inferiores ou superiores de pH a atividade diminui. O pH do meio afeta as cargas dos aminoácidos que compõem a enzima. A alteração dessas cargas afeta a conformação da molécula e, conseqüentemente, a sua atividade.

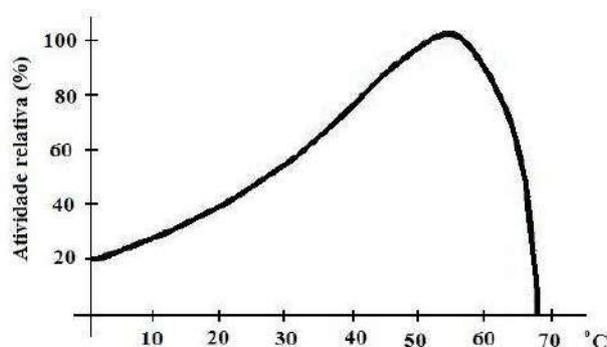


**Figura 2.19.** Efeito do pH na atividade enzimática.

A velocidade de uma reação química é também alterada pela temperatura por este parâmetro afetar as constantes cinéticas ( $K_M$  e  $V_{max}$ ). O efeito da temperatura na atividade enzimática pode ser explicado também pela teoria de Arrhenius que afirma que duas partículas devem se colidir na orientação correta e com energia suficiente para que os reagentes sejam transformados em produtos. Pode-se considerar que acontece o mesmo com reações catalisadas por enzimas. Em baixas temperaturas, as reações são mais lentas devido à queda da energia cinética do sistema. Porém, como as enzimas são proteínas, o aumento da temperatura não causa apenas o aumento da velocidade de reação, mas sim dois efeitos opostos:

- até determinada temperatura, ocorre um aumento da velocidade de reação;
- a partir de determinada temperatura, há uma diminuição na velocidade de reação por ocorrer a desnaturação da enzima, ou seja, à perda de sua estrutura nativa, catalítica, por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional.

Portanto, quando a temperatura está acima da temperatura de desnaturação há uma conseqüente queda na atividade enzimática (Figura 2.20) (Cabral *et al.*, 2003, Voet *et al.*, 2002, Lehninger *et al.*, 2002).



**Figura 2.20.** Efeito da temperatura na atividade enzimática.

A influência da força iônica sobre as enzimas está ligada a concentrações de sais no meio e afeta a solubilidade da enzima, ou seja, uma quantidade muito grande de sais faz com que ocorra a coagulação e a precipitação da proteína. Isso faz com que a quantidade de enzima solubilizada no meio seja menor, diminuindo, portanto, a quantidade de enzima que se liga ao substrato. Isso não significa que a enzima perde sua atividade por estar precipitada, tanto é que a precipitação utilizando soluções salinas é uma técnica usualmente empregada na extração e na concentração de preparações enzimáticas.

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi o estudo comparativo entre uma enzima comercial usualmente empregada em outros ramos da indústria frente a um quebrador enzimático disponível no mercado destinado especificamente para a remoção de reboco nas condições do ambiente do poço. Para alcançar tal objetivo, foram realizadas seguintes etapas:

- avaliação cinética do quebrador enzimático frente a variações na concentração de amido, de força iônica e de temperatura;
- avaliação cinética da enzima comercial enzimático frente a variações na concentração de amido, de força iônica e de temperatura;
- avaliação da inibição do sistema;
- comparação da economicidade do processo com ambos os catalisadores.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Equipamentos e Materiais

Os equipamentos utilizados nos experimentos, nas análises e no preparo de soluções foram:

- > Espectrofotômetro Hach DR/4000 UV;
- > Banho termostático Temp-Therm modelo BM60;
- > Placa Aquecedora em Cerâmica com Agitação IKA WORKS modelo C-MAG HS 4.

O preparado enzimático comercial de  $\alpha$ -amilase de *Bacillus licheniformis*, Termamyl, foi gentilmente doado pela Novozyme S/A. O quebrador enzimático de reboco e a salmoura de completação 9,4ppg ( $1,126 \text{ g/cm}^3$ ) foram cedidos pelo CENPES/Petrobrás (RJ). O amido solúvel (Reagen) foi utilizado como substrato nos ensaios.

A salmoura 9,4 ppg (*pounds per gallon*) ( $1,126 \text{ g/cm}^3$ ) foi utilizada como fluido de completação e/ou veículo para os preparados enzimáticos. A composição da salmoura utilizada é apresentada na Tabela 4.1 sendo a concentração salina deste fluido igual a 204 g/L (204000 ppm) (3,5 M) de NaCl.

Tabela 4.1. Composição da salmoura (CENPES/PETROBRAS).

Reagente	Função	Quantidades
Água destilada	Dispersante	350 mL
Cloreto de sódio		71,25g
Bissulfito de sódio	Seqüestrar oxigênio	0,07g
Ultrawet 70 (polietoxilado)	Prevenir emulsão	1050 $\mu$ L
Hidróxido de sódio	Manter pH entre 8-9	-----

## **4.2. Metodologia analítica de determinação de atividade**

A concentração de produtos formados, ou seja, a concentração de açúcares redutores liberados na hidrólise foi determinada através do método do DNS (Miller, 1959). A concentração da  $\alpha$ -amilase comercial e do quebrador de reboco no tampão foi de 0,01% (v/v). A absorvância obtida foi quantificada a 540nm em espectrofotômetro Hach DR/4000UV, frente a uma curva-padrão realizada com glicose (0,5 a 10  $\mu$ moles/mL). Uma unidade de atividade enzimática (U) equivale a quantidade de enzima que libera 1 $\mu$ mol de açúcar redutor (produto) por minuto nas condições do ensaio (tampão fosfato de sódio - 0,02M com NaCl 0,05M e pH= 6,9, a 30°C). As reações foram realizadas utilizando amido solúvel em sete concentrações distintas (1,25; 2,50; 3,75; 5,00; 6,25; 7,50; e 8,75mg/mL). Para cada concentração de substrato foram adicionados em cada tubo de ensaio em banho-maria 0,5 mL de solução de substrato diluído em salmoura ou em tampão e 0,5 mL de solução enzimática diluída em salmoura ou em tampão. Foram retirados cada tubo e adicionado 1 mL de solução de DNS para cessar a reação, de minuto em minuto até 20 minutos de reação e de 5 em 5 minutos até 1,5 horas, para então aquecer a temperatura de 100°C por 10 minutos. Foi então adicionado 10 ml de água destilada. Por fim, a concentração de glicose formada foi lido em espectrofotômetro.

## **4.3. Determinação dos Parâmetros Cinéticos**

### **4.3.1. Influência da temperatura de poço na atividade sob condições padrão (tampão)**

O quebrador enzimático e a  $\alpha$ -amilase comercial foram diluídos em solução tampão fosfato de sódio 0,02 M com NaCl 0,005 M (pH 6,9). A solução diluída de cada

produto foi mantida em banho-maria nas temperaturas de 50, 65 e 80°C. Após a reação nestas temperaturas, amostras foram retiradas e a atividade amilolítica foi determinada de acordo com o item 4.2.

### **4.3.2. Influência da força iônica (salmoura) nas temperaturas de poço**

A influência da força iônica foi analisada de acordo com o item 4.2. sendo porém os dois complexos enzimáticos diluídos em salmoura 9,4 ppg com concentração salina em torno de 204000 ppm de NaCl (pH 8-9).

### **4.3.3. Estimação dos parâmetros cinéticos**

Os parâmetros cinéticos ( $V_{\max}$  e  $K_M$ ) da  $\alpha$ -amilase comercial e do quebrador enzimático foram determinados através da equação de Lineweaver-Burk, obtida por meio da linearização da equação de Michaelis-Mentem. Para tanto foi utilizado o software Microsoft Excel. O valor de  $K_M$  foi calculado pela intercessão da reta linearizada com o eixo das abscissas e o  $V_{M\acute{a}x}$  pela intercessão com o eixo das ordenadas.

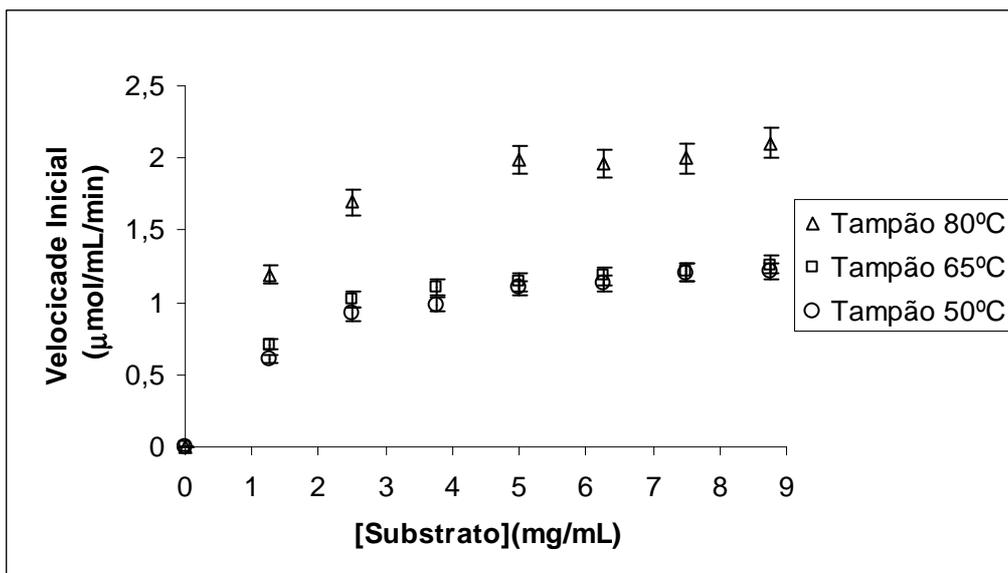
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à escassa quantidade de dados sobre o quebrador enzimático, usualmente vendido para operações de completação em poços de petróleo, ambos os produtos (quebrador enzimático e enzima comercial) foram caracterizados de forma comparativa.

As temperaturas utilizadas para a determinação dos parâmetros cinéticos das preparações enzimáticas foram 50, 65 e 80°C, sendo que as duas últimas temperaturas são as mais encontradas em poços petrolíferos na bacia de Campos (RJ). Em trabalho anterior (Kameda, 2007) foi verificado que, nas primeiras horas de reação, tanto a  $\alpha$ -amilase comercial como o quebrador enzimático mantiveram a atividade amilolítica nas temperaturas de 65 e 80°C tanto em salmoura como em meio controle (tampão fosfato). O tampão fosfato de sódio foi utilizado como meio controle por ser o mesmo empregado nas análises de atividade amilolítica, onde as enzimas normalmente apresentam seu maior poder catalítico.

O mecanismo cinético de Michaelis-Menten descreve o comportamento cinético da maioria das enzimas (Lehninger, 2002). Como já havia sido relatado na literatura (Li *et al.*, 2007, Toledo *et al.*, 2007, Lopez *et al.*, 2006, Aguiar *et al.*, 2000), a  $\alpha$ -amilase comercial seguiu esse comportamento cinético em meio tamponado e em salmoura e para todas as temperaturas testadas, conforme mostram as Figuras 5.1 e 5.2.

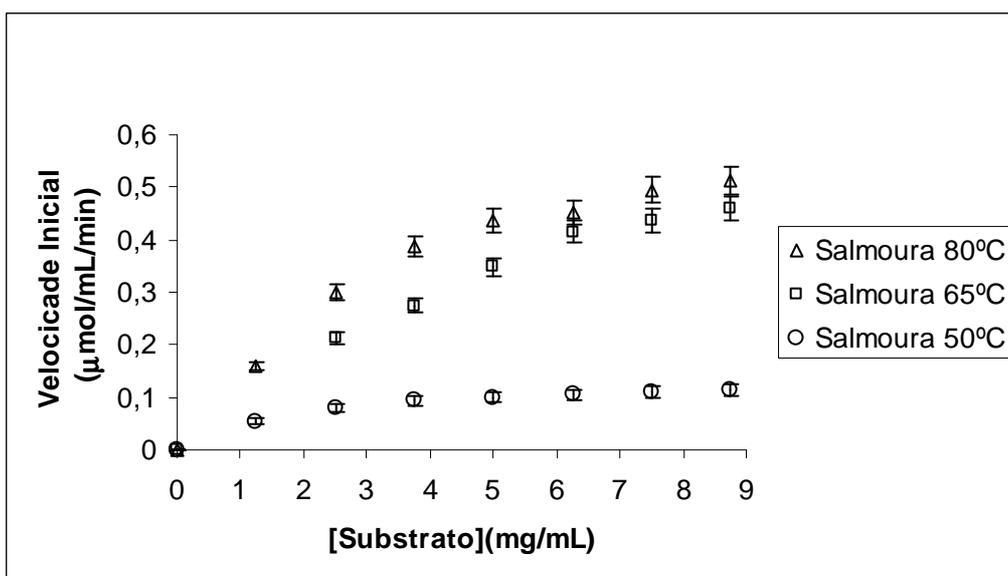
Podemos observar na Figura 5.1 que a 80°C a velocidade inicial de reação é maior que a 50 e 65°C. Isso porque aquela temperatura é a que mais se aproxima da temperatura ótima de atuação da  $\alpha$ -amilase de cultura de *Bacillus licheniformis* que é de 90 à 105°C (Gerhartz *et al.*, 1990).



**Figura 5.1** – Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação catalisada pela amilase comercial em tampão a 50, 65 e 80°C.

Em solução de alta força iônica observamos que há uma abrupta queda na velocidade inicial de reação, quando comparada à condição padrão (tampão), devido à alta concentração salina que não permite a ótima ação da enzima sobre o amido (Figura 5.2). Observamos também que a temperatura tem influência diferente em relação à solução tampão. Em salmoura, as velocidades iniciais das temperaturas 65 e 80°C são muito próximas e maiores que a 50°C. Pode estar acontecendo o abaixamento da temperatura ótima da enzima em salmoura, entre 65 e 80°C, já que esta temperatura depende do meio em que a enzima se encontra.

Os valores de  $K_m$  e  $V_{máx}$  foram calculados para todas as condições testadas através da linearização de Lineweaver-Burk (Tabela 5.1). Em meio tamponado, a  $\alpha$ -amilase comercial apresentou uma velocidade máxima de reação ( $V_{Máx}$ ) maior a 80°C do que a 65 e a 50°C, o que era esperado, já que 80°C é mais próximo da temperatura ótima desta amilase que varia entre 90 e 105°C.



**Figura 5.2** – Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação catalisada pela amilase comercial em salmoura a 50, 65 e 80°C.

**Tabela 5.1.** Parâmetros cinéticos da  $\alpha$ -amilase comercial.

Temperatura	Meio	$K_M$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	$V_{Máx}$ ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )	$R^2$
50°C	Tampão	2,02	1,62	0,96
	Salmoura	1,94	0,14	0,99
65°C	Tampão	1,26	1,45	0,98
	Salmoura	8,50	0,93	0,99
80°C	Tampão	1,24	2,41	0,98
	Salmoura	5,70	0,91	0,99

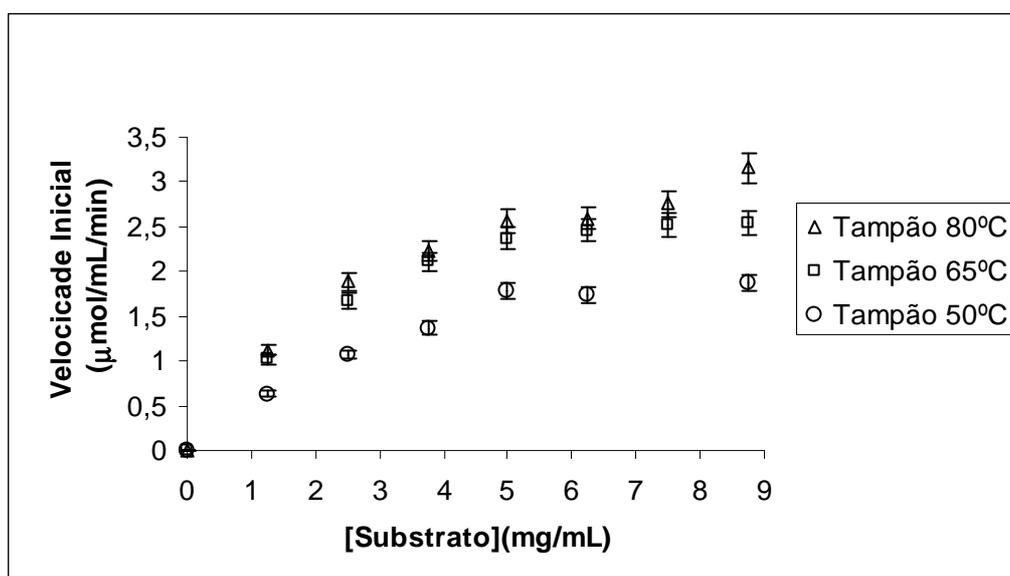
A velocidade máxima de reação,  $V_{Máx}$ , em salmoura caiu abruptamente para todas as temperaturas testadas quando comparadas com o meio tamponado (Tabela 5.1). Esses valores indicam que a elevada concentração salina pode ser o fator responsável pela queda de desempenho na reação de hidrólise.

Ao observarmos os valores da constante de Michaelis em tampão, observamos que com o aumento da temperatura,  $K_M$  diminui, como era esperado, já que quanto

menor o valor de  $K_M$ , mais eficiente é a ação da enzima e, portanto, mais rápido a enzima alcança sua velocidade máxima de reação. Já em salmoura, não podemos confirmar tal fato. De 50 para 65°C o valor de  $K_M$  aumenta para então diminuir a 80°C. Como a temperatura ótima de reação dessa enzima nessas condições deve estar entre 65 e 80°C, o valor de  $K_M$  a 50°C é muito menor, pois  $K_M$  está relacionado ao tempo que leva para alcançar a velocidade máxima, que neste caso é muito menor, como pode ser observado. Portanto, esse valor de  $K_M$  confirmar que  $V_{Máx}$  a 50°C é muito menor que a 65 e 80°C.

O quebrador enzimático também parece seguir uma cinética de Michaelis-Menten em tampão e em salmoura (Figuras 5.3 e 5.4).

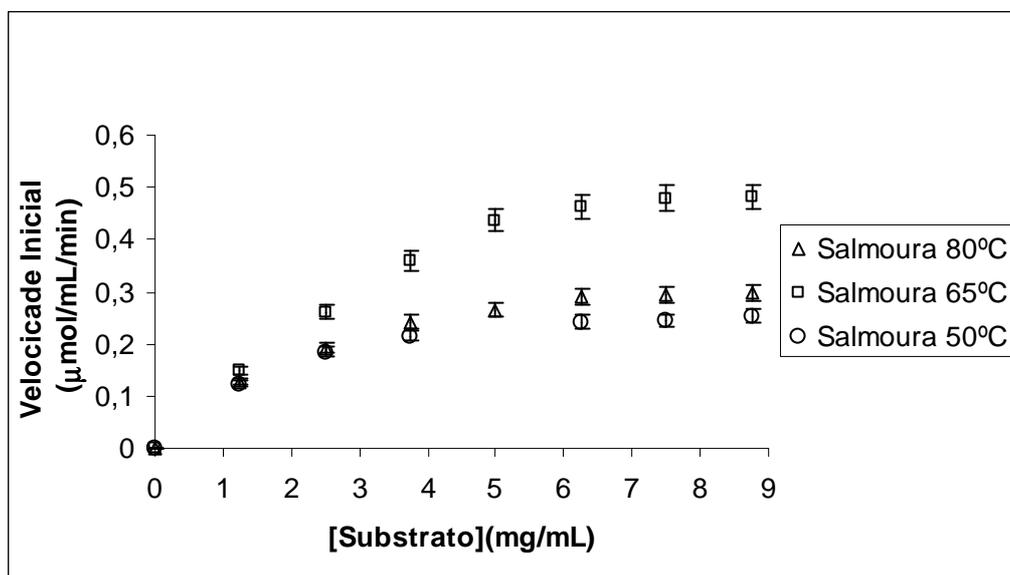
Assim como ocorreu com a  $\alpha$ -amilase comercial, o aumento da temperatura levou ao aumento da velocidade inicial de reação (Figura 5.3), o que era esperado.



**Figura 5.3** – Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação catalisada pelo quebrador enzimático em tampão a 50, 65 e 80°C.  $\text{mL}^{-1}$

A velocidade máxima da reação do quebrador sofreu um declínio acentuado no meio de salmoura de completação, Neste meio, a temperatura não agiu da mesma forma que em solução tampão. Como podemos observar na figura 5.4, a maior velocidade

inicial é a 65°C. Isso pode indicar que a força iônica abaixa a temperatura ótima de atuação da enzima.



**Figura 5.4** – Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação catalisada pelo quebrador enzimático em salmoura a 50, 65 e 80°C.

Os valores de  $K_M$  e  $V_{Máx}$  do quebrador calculados estão apresentados na Tabela 5.2. Em salmoura, o quebrador apresentou maior  $V_{Máx}$  à temperatura de 65°C. O esperado era que a 80°C,  $V_{Máx}$  atingisse o maior valor. Porém estes valores podem estar indicando que, em condições de alta salinidade, a 80°C a enzima do quebrador esteja em temperatura de desnaturação. Este fato pode ser percebido também ao observarmos os valores de  $K_M$  (afinidade entre enzima e substrato) que deveria diminuir, mas de 50 para 65°C aumenta para então cair a 80°C.

Normalmente, aumentos na temperatura provocam aumentos na velocidade de reação. Assim, a energia de ativação pode ser calculada através da equação de Arrhenius. Contudo, os valores de  $V_{Máx}$  obtidos para a  $\alpha$ -amilase comercial e para o quebrador enzimático apresentados nas Tabelas 5.1 e 5.2, respectivamente, estão muito

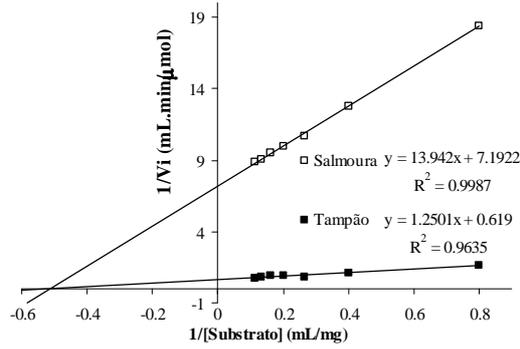
próximos e não descrevem uma fase ascendente de  $V_{Máx}$  em relação ao aumento da temperatura. Portanto, é possível que a faixa de temperatura estudada esteja promovendo alguma desnaturação térmica de ambos os produtos enzimáticos (Bracht *et al.*, 2003). Além da temperatura, o meio de salmoura de completação parece ser um dos principais responsáveis pela queda na capacidade catalítica dos produtos enzimáticos.

**Tabela 5.2.** Parâmetros cinéticos do quebrador enzimático de reboco.

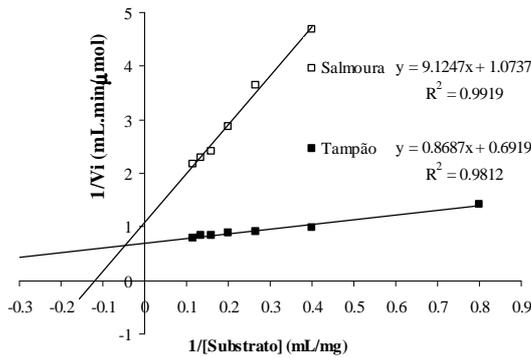
Temperatura	Meio	$K_M$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	$V_{Máx}$ ( $\mu$ mol.mL <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
50°C	Tampão	5,20	3,28	0,99
	Salmoura	1,92	0,32	0,99
65°C	Tampão	3,36	3,80	0,99
	Salmoura	6,54	0,94	0,99
80°C	Tampão	3,42	4,23	0,99
	Salmoura	2,75	0,40	0,99

Os dados experimentais das reações de hidrólise de ambos os produtos enzimáticos foram linearizados através da representação Lineweaver-Burk. As Figuras 5.5 e 5.6 indicam que há a ocorrência de inibição do tipo mista (Lehninger, 2002; Segel, 1993) quando a salmoura é utilizada para os dois produtos em todas as temperaturas testadas.

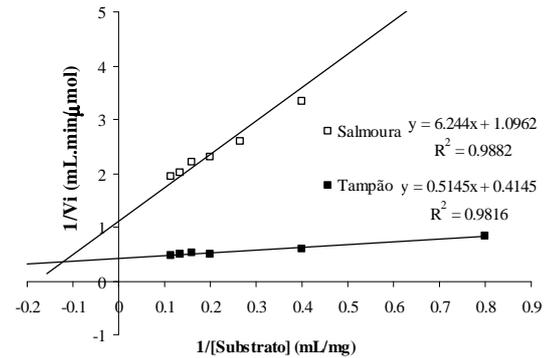
Na inibição do tipo mista, a enzima (E) e/ou o complexo enzima-substrato (ES) se ligam com um inibidor levando a formação de um complexo estável EI ou EIS. Nesse tipo de inibição ocorre a alteração tanto dos valores de  $K_m$  como os de  $V_{Máx}$ , como pode ser observado nas Tabelas 5.1 e 5.2. Deste modo, é provável que algum componente presente na salmoura esteja funcionando como um inibidor do tipo misto ou que a alta força iônica da salmoura (3,5M de NaCl) acarrete tal inibição.



(a)

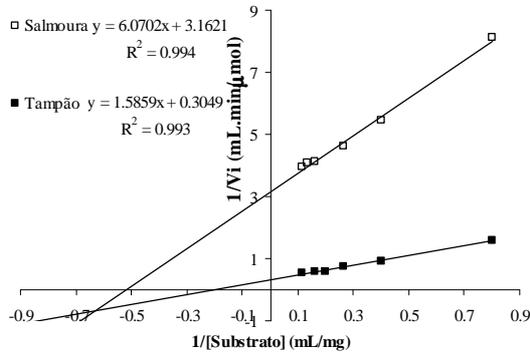


(b)

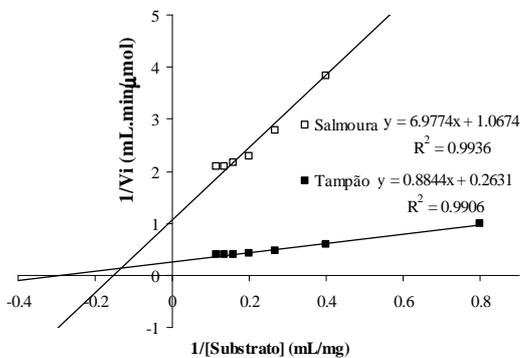


(c)

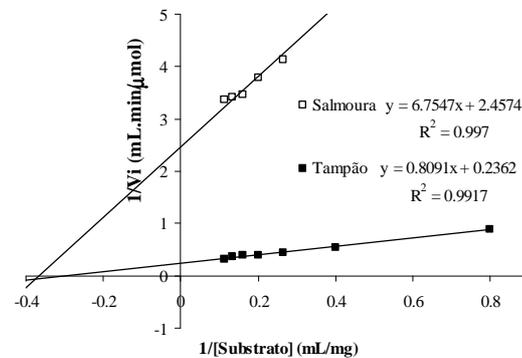
**Figura 5.5.** Representação de Lineweaver-Burk para a  $\alpha$ -amilase comercial em salmoura e tampão a 50°C (a), 65°C (b) e 80°C (c).



(a)



(b)



(c)

**Figura 5.6.** Representação de Lineweaver-Burk para o quebrador enzimático em salmoura e tampão a 50°C (a), 65°C (b) e 80°C (c).

Kameda (2007) determinou a atividade amilolítica de ambos os produtos, e os valores obtidos foram muito próximos: a  $\alpha$ -amilase comercial Termamyl apresentou atividade de 16822 U.mL<sup>-1</sup> e o quebrador enzimático de 17168 U.mL<sup>-1</sup>. Verificou ainda a atividade enzimática em condições de alta salinidade e constatou que ambos os preparados enzimáticos apresentaram, em todas as temperaturas testadas, uma queda acentuada na atividade amilolítica (entre 70 a 80%) em relação à condição controle, apresentando mesmo assim valores muito próximos de atividade (aproximadamente 6000 U.mL<sup>-1</sup> para  $\alpha$ -amilase comercial e 5000 U.mL<sup>-1</sup> para o quebrador enzimático).

Por ter observado que a estabilidade dos produtos enzimáticos na concentração de 1% (v/v) em salmoura a 80°C de ambos os produtos enzimáticos segue um decaimento, Kameda (2007) calculou o tempo de meia-vida dos dois preparos enzimáticos, encontrando; 1,46h para  $\alpha$ -amilase comercial e 3,91h para o quebrador enzimático. Ou seja, o tempo de meia-vida do quebrador enzimático é 2,68 vezes a meia-vida da  $\alpha$ -amilase comercial.

Para uma comparação econômica entre os dois preparados enzimáticos foi verificado junto a representantes da  $\alpha$ -amilase comercial o seu custo: US\$ 0.46/Kg. Verificou-se também, junto ao Cenpes – Petrobras, o custo do quebrador enzimático de reboco utilizado pelo mesmo US\$ 60.00/Kg. Portanto, o custo do quebrador enzimático é 130 vezes maior que o da  $\alpha$ -amilase comercial.

## 6. CONCLUSÕES

Com os resultados do estudo cinético, a  $\alpha$ -amilase comercial apresentou melhores resultados na conversão do amido frente ao quebrador enzimático, já que a  $V_{Máx}$  foi igual ou superior à  $V_{Máx}$  do quebrador enzimático em salmoura e em condições de poço (65 e 80°C).

Fazendo um paralelo entre o custo da enzima, a atividade amilolítica e a meia-vida dos preparos, a  $\alpha$ -amilase comercial apresentou-se muito mais vantajosa economicamente pois, apesar do tempo de meia-vida do quebrador enzimático ser 2,68 vezes à da amilase comercial, esta apresenta custo 130 vezes menor que o custo do quebrador.

Ambos os concentrados enzimáticos apresentaram inibição do tipo mista, devido à presença de algum componente do fluido ou à alta concentração salina do mesmo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUIAR, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B., Guyot, J. P. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010<sup>T</sup>, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme Microb. Technol.* V 27, PP 406-413, 2000.
2. Al-Otaibi, M. B.; Nasr-El-Din, H. A.; Siddiqui, M. A. Chemical treatment to enhance productivity of horizontal and multilateral wells: lab studies and case histories. *SPE 89467* In: *Fourteenth Symposium on Improved Oil Recovery*, Tulsa, EUA, 2004.
3. Battistel, E. ; Bianchi, D. ; Fornaroli, M. ; Guglielmetti, G. ; Europa, P. ; Cobianco S. in European Formation Damage Conference, Sheveningen, Holanda, 2005, SPE 94702.
4. Beall, B.B.; Brannon, H. D.; Tjon-Joe-Pin, R. M.; O'Driscoll, K. in SPE Annual Technical Conference & Exhibition, Denver, USA, 1996, SPE 36429.
5. Browne, S. V.; Ryan, D. F.; Chambers, B. D.; Gilchrist, J. M.; Bamfort, S. A. Simple approach to the clean-up of horizontal wells with pre-packed screen completions. *SPE 30116* In: *SPE European Formation Damage Conference*, The Hague, Holanda, 1995.
6. Browne, S. V.; Smith, P. S. Mudcake cleanup to enhance productivity of high-angle wells. *SPE 27350* In: *International Symposium on Formation Damage Control*, Lafayette, EUA, 1994.
7. Caenn, R.; Chillingar, G. V. Drilling fluids: state of art. *Journal of Petroleum Science and Engineering* v. 14, pp. 221-230, 1996.

8. da Cunha, R. T. Avaliação do emprego da celulase de *Myceliophthora thermophila* no processamento têxtil. Tese de Mestrado, *Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, Brasil, 2002.
9. dos Reis, R. F. Imobilização da amiloglicosidase e seu emprego na sacarificação de amido de mandioca. Tese de Mestrado, *Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, Brasil, 1983.
10. Frontaura, A. I. *Biotecnología de enzimas*. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, 1994.
11. Gerhartz, W. et al. *Enzymes in industry – Production and Applications*. VHC. 1990. 321p.
12. Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V. K.; Chauhan B. *Proc. Biochem.* 2003.
13. Hodge, R. M.; Augustine B. G.; Burton R. C.; Sanders W. W.; Stomp D. A. in *International Symposium on Formation Damage Control*, Lafayette, EUA, 1996, SPE 31082.
14. Kameda, E.; Utilização de preparações amilolíticas na remoção de reboco em operações de completação. Tese de Doutorado, *Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.
15. Lehninger, A. L. *Princípios de Bioquímica*, Nelson D. L. e Cox M. M. (Ed) 3<sup>a</sup> ed., 2002.
16. Li, H.; Chi, Z.; Wang, X.; Duan, X.; Ma, L.; Gao, L. Purification and characterization of extracellular amylase from marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raws potato starch digestion. *Enzyme Microb. Technol.* v. 40, pp. 1006-1012, 2007.
17. Lomba, R. Curso de Nivelamento TEP: Fluidos de Perfuração. *Petrobrás*, 2002.

18. LOPEZ, C.; Torrado, A.; Fuciños, P.; Guerra, N. P.; Pastrana, L. Enzymatic inhibition and thermal inactivation in hydrolysis of chestnut purée with an amylase mixture. *Enzyme Microb. Technol.* v. 39, pp. 252-258, 2006.
19. Luyster, M. R.; Ali, S. A. in International Symposium on Formation Damage Control, Lafayette, EUA, 2000, SPE 58749.
20. Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, PP. 426-428. 1959.
21. Nery, G. G.; Macari, R., Os fluidos de perfuração usados na indústria da água subterrânea e sua influência sobre os perfis geofísicos de princípio elétrico. *Águas Subterrâneas* v. 16, n.1, pp. 49-60, 2005.
22. Pires, T. da C. R. Identificação e caracterização de enzimas amilolíticas de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Tese de mestrado, *Faculdade Engenharia Mecânica, Universidade de São Paulo*, São Paulo, Brasil, 2002.
23. Prado, R. P. S. Comparação entre estratégias de produção utilizando poços verticais e horizontais. Tese de mestrado, *Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas*, Campinas, Brasil, 2003.
24. Queiroz, J. C de, in International Symposium on Formation Damage Control, Lafayette, EUA, 2002, SPE 73713.
25. Segel, I. H. Enzyme kinetics – Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzymes systems. A Wiley-Interscience Publication. 1993.
26. Spier, Michele Rigon. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido, 2005. 178f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

27. Stryer, L. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 3<sup>a</sup> edição, 1992.
28. Thomas, J. E. Fundamentos da engenharia de petróleo. Interciência, PETROBRAS, Rio de Janeiro, 2001.
29. Toledo, A. L.; Severo Jr., J. B.; Souza, R. R.; Campos, E. S.; Santana, J. C. C.; Tambourgi, E. B. Purification by expanded bed adsorption and characterization of an  $\alpha$ -amylase FORILASE NTL from *A. niger*. *J. Cromatogr. B* v. 846, pp. 51-56, 2007.
30. Suhy, T. E.; Harris Jr.; R. P. Application of polymer specific enzymes to clean up drill-in fluids SPE 51094 In: *SPE Eastern Regional Meeting*, Pittsburgh, 1998.
31. Uhlig, H. Industrial enzymes and their applications. John Wiley & Sons, Inc. 1998.
32. Voet *et al.* Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre, Artmed, 2000.