Avaliação do comportamento de amilases na remoção de reboco em poços *off-shore*

NATTASCHA KYAW

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS

Orientadores:

Maria Alice Zarur Coelho
D.Sc.

Marta Antunes Pereira Langone
D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Julho de 2011

Avaliação do comportamento de amilases na remoção de reboco em poços *off-shore*

NATTASCHA KYAW

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS.

Aprovada por:

_____

Prof[a]. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.
Orientador

_____

Prof[a]. Marta Antunes Pereira Langone, D.Sc.
Orientador

_____

Dra. Aline Machado de Castro

_____

Dr. João Crisósthomo de Queiroz Neto

_____

Prof[a]. Maria Helena Miguez da Rocha-Leão

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Julho de 2011

K991a Kyaw, Nattascha.

Avaliação do comportamento de amilases na remoção de reboco em poços *off-shore* / Nattascha Kyaw. – Rio de Janeiro, 2011.

xv, 93 f.: il., 31 cm.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2011.

Orientador: Maria Alice Zarur Coelho.
Marta Antunes Pereira Langone.

1. Amilase. 2. Fluido de completação. 3. Amido. 4. poços *off-shore.* I. Coelho, Maria Alice Zarur. II. Langone, Marta Antunes Pereira (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. IV. Título.

CDD: 572.756

À minha mãe, meu pai e a Deus!

“Sempre que pensamos ter todas as respostas
vem a vida e muda todas as perguntas”.
(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por nunca terem me deixado desistir de nada e por terem me apoiado em todas as minhas escolhas. Agradeço aos vários dias que minha mãe dormiu em pé ao meu lado esperando que eu terminasse.

Agradeço a minha amiga Maíra por ter me escutado, me ajudado e ter estado sempre presente quando precisei.

Agradeço a minha orientadora Maria Alice por ter me ajudado nestes anos, desde o momento que me escolheu para trabalhar neste projeto.

Agradeço a minha orientadora Marta Langone por toda a ajuda no laboratório, nos resumos e trabalhos e é claro nesta tese.

Agradeço as minhas amigas das letrinhas, entre elas Amanda, Fabiana e Luisa, pela força para realizar esta tese.

Agradeço aos meus amigos Gabriel, Gabriel (Xuxu), Gustavo e Leonardo por toda ajuda. Obrigada Xuxu pela ajuda com a formatação. Obrigada Leleo pelos livros.

Agradeço a Marly que me ajudou muito dando suportes que tornaram o trabalho mais fácil e com as conversas que faziam o tempo das reações passarem mais rápido.

Agradeço ao Otávio pela ajuda com os problemas técnicos do laboratório.

Agradeço as minhas amigas do laboratório da UFRJ Roberta e Gisele pela ajuda, preocupação, carinho e apoio no laboratório. Agradeço ao Diego por todo o carinho e o sorriso que sempre tinha no rosto.

Agradeço ao Rafael que me ensinou e me ajudou com tudo o que pode e que esteve por um tempo ao meu lado na bancada dividindo as enzimas.

Agradeço a Etel que me ensinou e orientou no laboratório, ajudando também na convivência, no dia a dia.

Agradeço a todos os amigos e companheiros do Lab 103 que estiveram presentes no dia a dia. Colocando uma música boa ou fazendo companhia na bancada.

Agradeço as minhas amigas do laboratório da UERJ Érika, Susana, Natalia e Julia, que com as conversas faziam as oito horas de reação parecerem pouco tempo, e tornavam nosso pouco tempo de almoço muito melhor e divertido.

Agradeço ao Igor, único menino do lab da UERJ, por toda a ajuda, por sempre fazer nossa água (tive que aprender quando você saiu), por me escutar quando precisei, sempre ajudar e estar sempre feliz.

RESUMO

KYAW, Nattascha. **Avaliação do comportamento de amilases na remoção de reboco em poços *off-shore*** Orientadoras: Maria Alice Zarur Coelho e Marta Antunes Pereira Langone. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

NATTASCHA KYAW

Nas perfurações de poços de petróleo, os fluidos de perfuração são utilizados para lubrificar as brocas, retirar os cascalhos, manter a estabilidade do poço e também para formar o reboco. Esta camada de reboco, apesar de necessária, pode impedir significativamente a capacidade de escoamento nas zonas produtoras de poços horizontais, resultando na redução da produtividade dos mesmos. Para aumentar esta produtividade, preparados enzimáticos estão sendo atualmente utilizados para a degradação dos polímeros presentes nos rebocos depositados, em detrimento da utilização de ácidos e de agentes oxidantes. Os polímeros, tais como o amido, são importantes para fornecer a viscosidade e o controle de filtrado, necessários aos fluidos de perfuração. O amido é amplamente utilizado nos fluidos a base de água; isto ocorre por conta da capacidade deste polímero de diminuir a permeabilidade dos poros reduzindo a invasão do fluido na formação, sendo utilizado como um agente de controle de perda de fluido. Preparados enzimáticos específicos são capazes de catalisar a hidrolise do amido presente no reboco permitindo um melhor escoamento do petróleo. Essas enzimas são adicionadas ao fluido de completação a base de água que em sua maioria contém componentes como cloreto de sódio (NaCl), bissulfito de sódio ($NaHSO_3$) e Ultrawet (éter etoxilado). Neste trabalho, são estudados quatro preparados amilolíticos comerciais - Liquozyme, Termamyl, Mi-Swaco e GBW. Estes preparados foram caracterizados frente às condições encontradas nos poços da Bacia de Campos (RJ) em termos de temperatura (30, 50, 65, 80 e 95°C), salinidade (204 g/L de NaCl) e diferencial de pressão no poço (100, 500 e 1000 psi). Avaliou-se, através do comportamento cinético apresentado pelos quatro preparados enzimáticos, o componente do fluido de completação que provocou inibição enzimática, sendo estudados os componentes NaCl (204 g/L), $NaHSO_3$ (0,14 g/L) e o Ultrawet (0,3%v/v). O melhor preparado estudado foi o da Liquozyme, pois apresentou altas atividades nas temperaturas estudadas e a maior atividade residual após oito horas de reação a 95°C, em condições de alta salinidade e pressão. O componente do fluido de completação que provocou maior inibição foi o NaCl, sendo sua inibição provocada pela alta força iônica. Todas as quatro preparações enzimáticas apresentaram perfis cinéticos muito semelhantes nas condições estudadas.

ABSTRACT

KYAW, Nattascha. **Amylases behavior in filter cake removal in petroleum off-shore operation.** Supervisors: Maria Alice Zarur Coelho and Marta Antunes Pereira Langone. Rio de Janeiro, 2011. Master in Chemical and Biochemical Process Technology.

NATTASCHA KYAW

In the drilling of oil wells, drilling fluids are used for drill-pipe lubrication, carrying cuttings from the hole, maintaining wellbore stability, and filter cake formation. This filter cake can significantly decrease the flow capacity at the wellbore, resulting in reduced productivity. To increase productivity, enzymes are being used for polymer degradation as an alternative to organic acids and oxidant agents in production areas of horizontal wells. The polymers are important to provide the necessary viscosity and the filtrate control to the drill-in fluids. Starch is the most utilized polymer in the water-salt-base fluid, because of its ability in reducing permeability pores and avoiding fluid invasion in the formation. Thus, it is used as a control agent of fluid loss. Specific enzymatic preparations are capable to catalyses the hydrolysis the starch present in the filter cake, increasing its permeabilization and allowing a better flow of the oil. These enzymes are added to the completion fluid, which contains sodium chloride (NaCl), sodium bisulfite ($NaHSO_3$) and Ultrawet (ether ethoxylate). In this work, four commercial amylolytic preparations – Liquozyme, Termamyl, Mi-Swaco and GBW - were evaluated. Such preparations were characterized according to some of the conditions found in Bacia de Campos (RJ) wells - temperature (30, 50, 65, 80 and 95°C), salinity (204 g/L) and wellbore pressure (100, 500 and 1000 psi). Components of the completion fluid, NaCl (204 g/L), $NaHSO_3$ (0.14 g/L) and Ultrawet (0.3% v/v), which resulted in inhibition, were observed in the enzymatic reactions. Also the kinetic behavior was displayed for all enzyme preparations. Liquozyme was the best studied preparation, since it showed higher activities in the studied temperatures and higher residual activity after eight hours of reaction at 95°C, higher salinity and pressure. The component of the completion fluid that caused significant inhibition was NaCl, being a result of high ionic strength. All enzyme preparations showed very similar kinetic profiles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Poços *on-shore* e poço *off-shore* 3

Figura 2. Comparação de área de contato de poços verticais e poços horizontais....4

Figura 3. Perfuração multidirecional.....6

Figura 4. Estrutura da amilose e da amilopectina 10

Figura 5. Métodos de completação de poços de petróleo.....12

Figura 6. Reboco externo e interno 14

Figura 7. Esquema de injeção de ácido no poço horizontal 16

Figura 8. Esquema de injeção de enzima no poço horizontal 19

Figura 9. Mecanismo de estabilização das enzimas pela pressão.....20

Figura 10. Estrutura da amilose com indicação da ação da α-amilase 23

Figura 11. Estrutura 3D da α-amilase derivada de Bacillus licheniformis.....23

Figura 12. Gráfico de Michaelis-Menten.....25

Figura 13. Gráfico dos inversos de Lineweaver-Burk.....26

Figura 14. Gráfico de Lineweaver-Burk no caso de inibição competitiva 27

Figura 15. Gráfico de Lineweaver-Burk no caso de inibição acompetitiva 27

Figura 16. Gráfico de Lineweaver-Burk no caso de inibição mista não competitiva 28

Figura 17. Reator Parr 4843.....39

Figura 18. Eletroforese das preparações enzimáticas 42

Figura 19. Efeito da temperatura e do fluido de completação na atividade enzimática 47

Figura 20. Estabilidade das preparações enzimáticas a 65°C 49

Figura 21. Estabilidade das preparações enzimáticas a 80°C 50

Figura 22. Estabilidade das preparações enzimáticas a 95°C 51

Figura 23. Estabilidade da preparação Liquozyme após 8 horas de reação.....53

Figura 24. Gráfico de Michaelis-Menten para as preparações enzimáticas.....55

Figura 25. Efeito dos componentes do fluido de completação na atividade enzimática.....58

Figura 26. Gráfico de Lineweaver-Burk na presença de inibidor (NaCl) 61

Figura 27. Comparação dos efeitos do NaCl e do KF na atividade enzimática....64

Figura 28. Influência da agitação na produção de açúcares redutores.....66

Figura 29. Efeito da pressão na atividade amilolítica do preparado enzimático Liquozyme.....68

Figura 30. Efeito da pressão na atividade amilolítica do preparado enzimático Termamyl 69

Figura 31. Efeito da pressão na atividade amilolítica do preparado enzimático Mi-Swaco.....70

Figura 32. Efeito da pressão na atividade amilolítica do preparado enzimático GBW.....71

Figura 33. Efeito da pressão na estabilidade da Liquozyme 74

Figura 34. Efeito da pressão na estabilidade da Termamyl 76

Figura 35. Efeito da pressão na estabilidade da Mi-Swaco.....78

Figura 36. Efeito da pressão na estabilidade da GBW.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$) das preparações enzimáticas.....56

Tabela 2. Efeito dos componentes do fluido de completação na atividade das preparações enzimáticas 59

Tabela 3. Valores de K_m e $V_{máx}$ das preparações enzimáticas na presença de inibidor.....62

Tabela 4. Valores de condutividade e força iônica para as preparações enzimáticas 63

Tabela 5. Resumo das atividades enzimáticas residuais após os ensaios de estabilidade 81

LISTA DE ABREVIATURAS

CE ..... Condutividade elétrica

DNS..... Solução de ácido dinitrosalicilico

FI ..... Força iônica

g/L .....grama por litro

IE .....Índice de emulsificação

kDa ..... Kilodalton

ppm .....parte por milhão

ppg ..... pounds per gallon

psi ..... pounds per square inch

V_o .....Velocidade inicial

$V_{máx}$ .....Velocidade máxima

V .....Volts

µA ..... Microamperes

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3

2.1. Poços de petróleo 3

2.1.1. Poços *On-shore* e poços *Off-shore* 3

2.1.2. Tipos de poços de petróleo 4

2.1.3. Condições da perfuração (temperatura, pressão e salinidade) 6

2.2. Fluidos de perfuração 7

2.3. Amido 9

2.4. Fluido de completação 11

2.5. Formação do reboco polimérico 13

2.6. Remoção do reboco 14

2.6.1. Utilização de ácidos e oxidantes na remoção do reboco 15

2.6.2. Utilização de enzimas na remoção do reboco 17

2.7. Parâmetros reacionais 20

2.8. α-amilases 22

2.9. Cinética enzimática 24

2.10. Inibição enzimática 26

3. OBJETIVOS 30

4. MATERIAIS E MÉTODOS 31

4.1. Materiais 31

4.2. Eletroforese 31

4.3. Determinação do teor de proteína 32

4.4. Índice de emulsificação 32

4.5. Tensão superficial 33

4.6. Atividade hidrolítica de lipase 33
4.7. Determinação da força iônica 34
4.8. Atividade amilolítica 35
4.9. Efeito da temperatura e da concentração de sal na atividade amilolítica 36
4.10. Estabilidade dos preparados enzimáticos a temperatura 37
4.11. Determinação dos parâmetros cinéticos dos preparados enzimáticos 37
4.12. Efeito dos componentes do flluido de completação na atividade enzimática 38
4.13. Determinação de parâmetros cinéticos dos preparados enzimáticos na presença de inibidor 38
4.14. Efeito da agitação na atividade das preparações anzimáticas no Reator Parr 39
4.15. Efeito da pressão na atividade dos preparados enzimáticos 40
4.16. Efeito da pressão na estabilidade dos preparados enzimáticos 41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42
5.1. Caracterização dos preparados enzimáticos 42
5.1.1. Massa molecular 43
5.1.2. Concentração de proteína 44
5.1.3. Índice de emulsificação 44
5.1.4. Tensão superficial 44
5.1.5. Atividade lipolítica 45
5.1.6. Atividade amilolítica 46
5.2. Efeito da temperatura e do fluido de completação na atividade amilolítica 46
5.3. Efeito da temperatura e da salinidade na estabilidade das amilases 49
5.4. Determinação dos parâmetros cinéticos para as preparações enzimáticas ...55

5.5. Efeito dos componentes do flluido de completação na atividade enzimática .58

5.6. Determinação dos parâmetros cinéticos na presença de inibidor 60

5.7. Determinação da força iônica.....63

5.8. Pressão 65

5.8.1. Efeito da velocidade de agitação no Reator Parr 66

5.8.2. Efeito da pressão na atividade das amilases 67

5.8.3. Efeito da pressão na estabilidade das amilases.....73

6. CONCLUSÕES 84

6.1. Caracterização 84

6.2. Atividade e estabilidade.....84

6.3. Parâmetros cinéticos.....85

7. SUGESTÕES.....87

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 88

1. INTRODUÇÃO

Na perfuração dos poços de petróleo são utilizados fluidos de perfuração. Estes fluidos são importantes para reduzir o atrito entre a broca e a parede do poço, lubrificar as brocas perfurantes, retirar os cascalhos, manter a estabilidade do poço e formar uma camada fina e pouco permeável de reboco (torta formada pelos sólidos presentes nos fluidos e mais os restos de formação cortados) que mantém a estabilidade do poço perfurado (BEALL *et al.*, 1996; CAENN e CHILLINGAR, 1996).

No momento de colocar o poço em operação, o reboco formado nos poros adjacente a parede do poço precisa ser removido para que haja o escoamento do petróleo. Uma inadequada remoção do reboco diminui a produtividade do poço (HANSSEN e JIANG, 1999; NASR-EL-DIN *et al.*, 2006, 2007; ALOTAIBI *et al.*, 2007).

Muitos métodos são utilizados para a remoção do reboco, como a utilização dos ácidos fortes (HCl), ácidos orgânicos e dos agentes oxidantes (HANSSEN e JIANG, 1999; BEALL *et al.*, 1996). No entanto, atualmente, o uso de enzimas vem sendo investigado como alternativa a esses processos. As vantagens do tratamento com enzimas estão relacionadas à tentativa de aumentar a produção do petróleo utilizando um agente específico, sendo assim, que não interage com outros componentes do poço, com os equipamentos utilizados e com a formação, e que possui uma ação homogênea ao longo de todo o poço de petróleo, além de ser um processo ambientalmente limpo.

O amido é um dos polímeros mais utilizados nos fluidos de perfuração aquosos, sendo utilizado especificamente no controle da propriedade de filtração do fluido de perfuração, promovendo a formação do reboco e o controle da perda de

fluido (BATTISTEL *et al.*, 2005). Secundariamente, por ser utilizado em concentração elevada atua na viscosidade, na reologia do fluido. Esta viscosidade obtida no fluido de perfuração com a adição da alta concentração do amido reduz o atrito da broca com o poço e confere a lubrificação da mesma (BEALL *et al.*, 1996).

Sendo o amido um dos principais polímeros utilizados nos fluidos de perfuração aquosos, este é um dos principais componentes do reboco formado. As α-amilases são enzimas que vêm sendo utilizadas na fase de completação do intervalo produtor de poços horizontais ou multidirecionais não revestidos, por atuarem apenas sobre este polímero constituinte do reboco. A α-amilase é uma enzima específica que não reage com outros componentes do fluido utilizado ou do poço perfurado, atuando apenas sobre o amido presente no reboco resultando assim em um aumento da produtividade do poço (KAMEDA *et al.*, 2007; BATTISTEL *et al.*, 2005; BEALL *et al.*, 1996).

Aos fluidos de completação são adicionados a enzima α-amilase, que é utilizada para degradar o reboco presente nos poços de petróleo, e outros componentes como cloreto de sódio (NaCl), bissulfito de sódio ($NaHSO_3$) e *ultrawet* (éter etoxilado) (NASR-EL-DIN *et al.*, 2006; BRANNON *et al.*, 2003; CAENN e CHILLINGAR, 1996).

Apesar das vantagens da utilização de enzimas para esse processo as severidades nas condições nos poços de petróleo podem impedir ou dificultar a sua ação. A elevada temperatura dos poços pode ser um fator de inativação das enzimas, bem como a alta salinidade presente nos fluidos e a elevada pressão nos poços perfurados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Poços de petróleo

2.1.1. Poços On-shore e Poços Off-shore

A classificação dos poços de petróleo está relacionada com a localização destes, quando em terra ou costeiros são denominados *on-shore* ou *in-shore* (Figura 1a) e quando localizados em águas profundas são denominados *off-shore* (Figura 1b).

No Brasil a maioria dos poços perfurados está localizada em plataformas oceânicas, por isso esse trabalho focou as condições de fundo de poço freqüentes nos poços com essas geometrias nas bacias produtoras brasileiras.

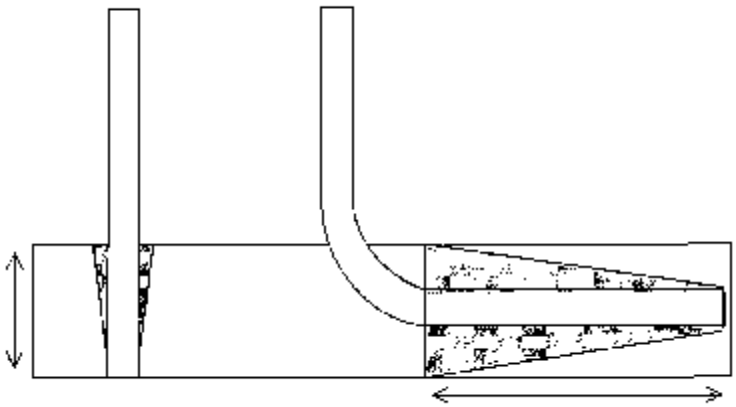
(a)

(b)

Figura 1: (a) poço *on-shore* (http://petroleosegtec.blogspot.com/2010_08_01_archive.html, 25/08/11) e (b) poço *off-shore* (http://tecnopeg.blogspot.com/2011/01/diario-offshore-n-11-quero-trabalhar_07.html, 25/08/11).

2.1.2. Tipos de poços de petróleo

Os poços horizontais apresentam muitas vantagens com relação aos poços verticais. A principal vantagem está relacionada ao fato de oferecer maior área de contato com o reservatório, como apresentado na Figura 2. Além disso, para uma mesma vazão de fluido, a variação da pressão no poço horizontal é menor do que no poço vertical, tornando o poço horizontal mais atrativo em aplicações de recuperação de óleo (PRADO, 2003). A otimização da produção e melhoria na recuperação final do petróleo alavancou os poços horizontais face aos poços verticais em muitos reservatórios marginais, que são poços de baixo volume de petróleo (TABATABAEI e GHALAMBOR, 2011). No entanto, é mais caro para perfurar e completar um poço horizontal do que um vertical (TABATABAEI e GHALAMBOR, 2011; PRADO, 2003). Apesar do custo maior para perfurar e completar um poço horizontal, se a remoção do reboco for perfeita o investimento compensa, pois o valor investido será recuperado rapidamente.



(a) (b)

Figura 2: Comparação de área de contato de (a) poços verticais e (b) poços horizontais (modificado de SUHY *et al.,* 1998).

A perfuração multilateral ou multidirecional (Figura 3) é uma nova tecnologia desenvolvida depois da perfuração direcional, da horizontal e da vertical. Muitas melhorias foram recentemente introduzidas nos sistemas de conclusão multilateral ou multidirecional, não apenas como resultado dos avanços na tecnologia, mas também por causa de mudanças nos conceitos de desenvolvimento de completação que têm sido fundamentais para alcançar muitos êxitos do sistema.

Um fator primordial para o aumento do interesse na tecnologia de completação multilateral tem sido o seu impacto no reforço da economia do desenvolvimento do campo. Sistemas multilaterais podem reduzir os custos de desenvolvimento do campo por aumentar a área de óleo drenada, melhorando a produção do poço, pois aumenta o contato com o reservatório e melhora a eficiência de varredura proporcionando assim maior produtividade por poço perfurado com exposição à zona mais viável em cada poço.

Comparando-se então com várias perfurações horizontais, a perfuração multilateral acarreta na redução do tamanho da plataforma, do peso, dos custos de eliminação de lama e das dimensões da superfície, do total da metragem perfurada e, assim, do tempo de perfuração. Reduz-se, então, o custo de desenvolvimento do reservatório através de apenas uma perfuração vertical, utilizando apenas um poço mãe comum, a partir dos quais são perfurados vários laterais. Mas, o desenvolvimento tecnológico multilateral depende, principalmente, do avanço das técnicas de completação (HOANG *et al.*, 2010; YANPING *et al.*, 2009; AL-BANI *et al.*, 2007; ALOTAIBI *et al.*, 2007; YILDIZ, 2005; LONGBOTTOM, 1998; LONGBOTTOM *et al.*, 1997).

LONGBOTTOM *et al.* (1997) verificaram que em alguns poços da área de Austin Chalk nos EUA, as mudanças de sistemas de poço vertical para poço

horizontal e depois para os sistemas multilaterais têm levado a reduções de custos de desenvolvimento dos poços perfurados. Estes resultados corroboram com o que é descrito na literatura.

Figura 3: Perfuração multidirecional (http://knol.google.com/k/po%C3%A7os-horizontais-na-engenharia-de-petr%C3%B3leo#, 25/08/11)

2.1.3. Condições nas perfurações (temperatura, pressão, salinidade)

Os poços *off-shore* apresentam condições extremas de temperatura, pressão e salinidade. Os fluidos de perfuração são adicionados a uma alta temperatura (50 - 163°C) necessária para o desenvolvimento da perfuração. A alta pressão (500 - 12.500psi) na perfuração e, posteriormente, na manutenção do poço é necessária para que não ocorra o influxo da formação para o poço. Por fim, a alta salinidade (5000 - 40000ppm NaCl) é decorrente da utilização da água do mar ou de salmoura

artificial para compor os fluidos utilizados ou devido à adição de sal na sua composição (ALOTAIBI *et al.*, 2010; SIDDIQUI *et al.*, 2006; BRANNON *et al.*, 2003; LONGBOTTOM *et al.*, 1997; YANG e FLIPPEN, 1997; NYLAND *et al.*, 1988).

SUHY *et al.* (1998) realizaram testes em laboratório simulando as condições de poço com temperaturas variando de 30 a 121°C e concluíram que a enzima em estudo parece desempenhar com maior eficiência a limpeza do reboco quando a temperatura aumenta de 79°C para 121°C. Realizaram testes de indicação de presença de amido residual não degradado e quando a enzima específica era utilizada observavam uma indicação de ausência do amido.

BEALL *et al.* (1996) utilizaram um sistema com enzimas específicas para degradar o amido nas temperaturas de 60°C e 104°C, onde observaram 94% de eficiência em testes realizados durante 24 horas a 60°C; 85% de eficiência em testes realizados durante 12 horas a 60°C e, na temperatura de 104°C, obtiveram 95% de eficiência de degradação após 12 horas.

2.2. Fluidos de perfuração

O fluido de perfuração é utilizado no processo de perfuração para:

1- limpeza dos fragmentos de rocha abaixo da broca e o transporte do cascalho para a superfície,
2- exercer suficiente pressão hidrostática na superfície da formação, prevenindo o influxo de fluido da formação para dentro do poço,
3- manter o poço recém perfurado estável,
4- resfriar e lubrificar a coluna de perfuração e a broca,
5- reduzir o atrito entre a broca e o poço,
6- formar uma fina e pouco permeável camada de reboco.

Para serem utilizados em perfuração, os fluidos não devem apresentar as seguintes características:

1- ter propriedades prejudiciais para o uso de técnicas de avaliação previstas na formação,
2- causar efeito adverso sobre a formação penetrada,
3- provocar corrosão no equipamento de perfuração ou nas tubulações,
4- ser perigoso para o ambiente e para as pessoas (BOURGOYNE *et al.*, 1986; CAENN e CHILLINGAR, 1996).

O tipo de fluido de perfuração é determinado pela fase contínua e não pelo componente solubilizado encontrado em maior concentração. Os fluidos podem ser de base ar (aerados com linha de nitrogênio, com espuma), de base água ou de base óleo (CAENN e CHILLINGAR, 1996). Fluidos de base água são os mais comumente utilizados (BOURGOYNE *et al.*, 1986; PETRI e QUEIROZ, 2010; CAENN e CHILLINGAR, 1996).

Os fluidos de base óleo são geralmente mais caros e requerem um controle mais rigoroso da poluição nos processos comparados aos que são feitos de base água. O uso de fluidos aerados e espumas como fluido de perfuração é limitado a áreas onde a formação é impermeável (BOURGOYNE *et al.*, 1986).

Fluidos de base água são compostos basicamente por água, sais e polímeros dissolvidos. Muitos poços são iniciados utilizando a água natural disponível na área. Como os sólidos perfurados são arrastados na água, uma lama natural é formada. Alguns polímeros, como o amido e a goma xantana, promovem um aumento na viscosidade, aumentam a habilidade do fluido de perfuração de transportar o cascalho para a superfície e são responsáveis pela formação do reboco, pois se depositam na parede da formação permeável, havendo com isso redução da entrada

de fluido na formação e prevenção de desabamento do poço (BOURGOYNE *et al.*, 1986; PETRI e QUEIROZ, 2010; BEALL *et al.*, 1996; BAST *et al.*, 2000).

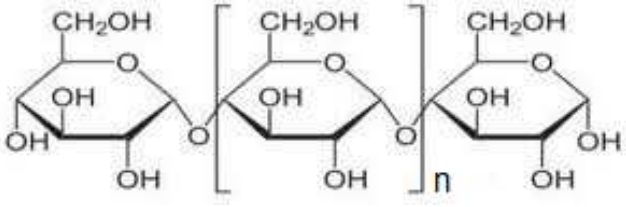
Um grande número de fluidos são formulados com adição de sal, podendo ser formulados com salmoura comercial ou com salmoura natural, ou ainda utilizando a água do mar (CAEN e CHILLINGAR, 1996). A água do mar é utilizada para a composição do fluido em áreas marítimas onde a fonte de água não está prontamente disponível. A salinidade da água do mar é usualmente expressa como equivalente da concentração de NaCl. O equivalente de NaCl na água do mar é de 35.000 ppm ou 35 g/L, mas existem muitos outros sais presentes em concentração significativa, o que acarreta em uma alta salinidade do fluido de perfuração e, consequentemente, do reboco formado (BOURGOYNE *et al.*, 1986).

PETRI e QUEIROZ (2010) utilizaram fluidos de perfuração contendo polímeros com adição de 40.000 ppm de NaCl e soluções contendo de 5.000 até 50.000 ppm de NaCl em seus experimentos de estudo de remoção de reboco polimérico.

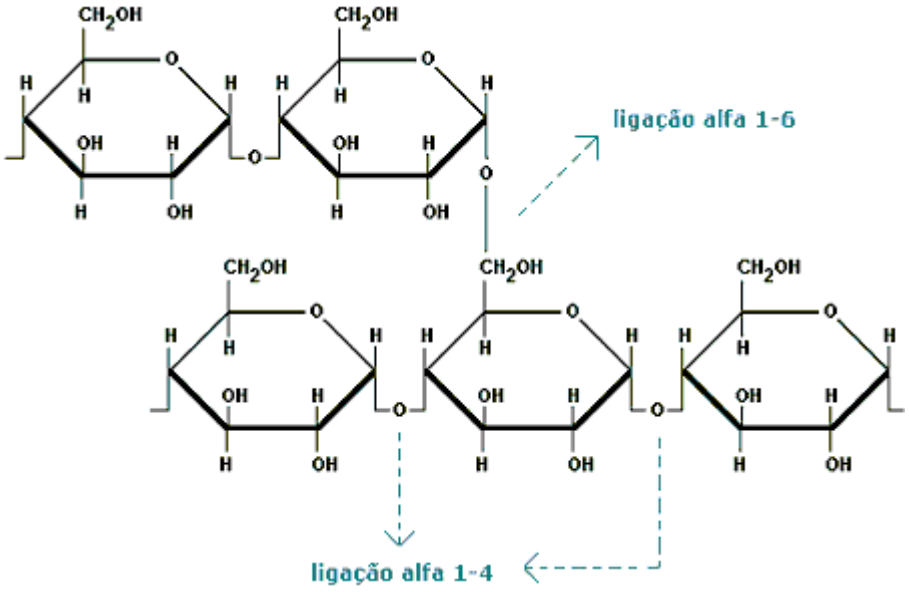
2.3. Amido

O Amido é um polissacarídeo sintetizado pelos vegetais e utilizado como reserva energética. Este polímero natural possui um alto peso molecular consistindo em sua estrutura de dois polissacarídeos estruturalmente diferentes, a amilose e a amilopectina. A amilose é uma molécula formada por uma cadeia linear de unidades de glicose, possuindo monômeros de glicose unidos por ligações α-1,4 (Figura 4a). A amilopectina possui uma estrutura ramificada (Figura 4b) constituída por cadeias de 20 a 30 moleculas de glicose unidas por ligações α-1,4 e estas cadeias são

unidas entre si por ligações α-1,6 (PETRI e QUEIROZ, 2010; KAMEDA, 2007; HANSSEN e JIANG, 1999; CAEN e CHILLINGAR, 1996).



(a)



(b)

Figura 4: Estrutura da (a) amilose (http://dbpedia.org/page/Amylose) e da (b) amilopectina (http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_ch/teste_amido.htm)

O amido é amplamente utilizados em fluidos de perfuração de base água, particularmente em sistemas com água salgada. Sua utilização está ligada principalmente a formação do reboco mais impermeável possível e, secundariamente, à capacidade do amido de, por ser utilizado em alta concentração,

dar propriedade de gel ao fluido promovendo a redução do atrito, a lubrificação das brocas e o controle do fluido. O amido então reduz rapidamente a permeabilidade, resultando na formação do reboco e, reduzindo assim, a invasão do fluido que contém danosos polímeros dissolvidos em água e sólidos na formação. No entanto, o amido pode causar significante prejuízo no desempenho do poço pela formação do reboco (NARS-EL-DIN *et al.*, 2007; KAMEDA *et al.*, 2007; QUEIROZ, 2002; CAEN e CHILLINGAR, 1996; BATISTEL *et al.*, 2005; BEALL *et al.*, 1996; SUHY *et al.*, 1998; LUYSTER *et al.*, 2000).

No Brasil o amido utilizado nos fluidos é proveniente de mandioca que é economicamente mais favorável, e contém proporcionalmente muito mais amilose do que amilopectina em sua constituição.

2.4. Fluidos de completação

Após o término da perfuração do poço de petróleo, é necessário deixá-lo em condições de operação durante toda a vida produtiva do poço. Denomina-se fase de completação o conjunto de operações necessárias para iniciar a produção do poço.

Nesta fase é realizado o revestimento do poço. A etapa de revestimento é realizada para prover a sustentação das paredes do poço e tem função de promover vedação hidráulica entre os diversos intervalos permeáveis, impedindo a migração de fluidos (MCRAE *et al.*, 2008).

Existem três tipos de revestimento: a poço aberto, com *liner* rasgado e revestimento canhoneado (Figura 5). Nos poços verticais são utilizados os revestimentos canhoneados, onde o revestimento é descido até o fundo do poço, sendo o revestimento com *liner* rasgado muito pouco utilizado.

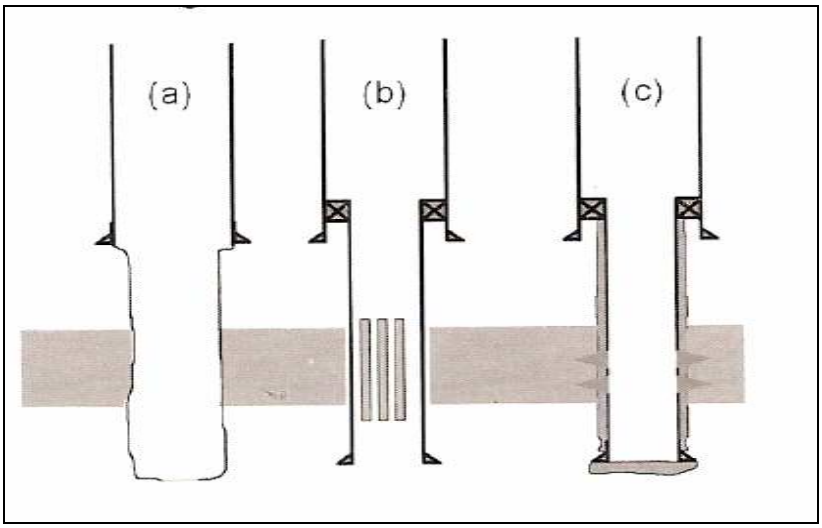


Figura 5: Métodos de completação de poços de petróleo. Revestimento: (a) poço aberto, (b) *Liner* rasgado e (c) canhoneado (Thomas *et al.*, 2001).

Nos poços horizontais e multidirecionais são utilizados poços abertos, onde não ocorre a etapa de revestimento, não é realizada a cimentação, com isso o reboco formado pelo fluido de perfuração é a camada impermeável que impede o influxo do óleo.

Nesta fase, o fluido que se encontra no interior do poço é substituído por um fluido de completação. Este fluido geralmente é composto por uma solução salina, cuja composição deve ser compatível com o reservatório e com os fluidos nele contidos para evitar danos à formação, ou seja, originar obstruções que possam restringir a vazão do poço. Este fluido de completação é utilizado para remover o reboco presente no poço aberto (MCRAE *et al.*, 2008; BRADSHAW, *et al.* 2006).

Os fluidos de completação podem ser compostos por salmoura, ácidos, oxidantes ou quebradores enzimáticos. Quando compostos por salmoura, ácidos e oxidantes os fluidos são inespecíficos, além disso, os ácidos e oxidantes são muito reativos. (ALOTAIBI *et al.*, 2007; NASR-EL-DIN *et al.*, 2007).

2.5. Formação de Reboco Polimérico

Dano à formação é uma terminologia genérica que se refere ao prejuízo na permeabilidade do reservatório de petróleo causado por vários processos adversos. O dano à formação é um problema operacional e econômico que pode ocorrer durante as várias fases da recuperação de óleo e de gás, incluindo a produção e a perfuração. A maior parte dos danos à formação ocorre nas proximidades do poço e resulta, na maioria dos casos, no entupimento dos poros com detritos. Entretanto, o entupimento dos poros não é o único mecanismo de redução de permeabilidade, existem processos como a formação de emulsões e inchamento de argila que também podem ser responsáveis por outro tipo de dano à formação (comunicação técnica PETROBRAS; Kameda *et al.*, 2007; ISCAN *et al.*, 2007). Este estudo destaca apenas um tipo de dano à formação: o reboco (*filter-cake*) formado pelos fluidos de perfuração, especificamente pelos fluidos a base de água contendo polímeros naturais, como o amido.

Durante a perfuração, o diferencial de pressão entre o fluido e a formação é o responsável por pressionar o fluido contra a superfície das paredes das camadas perfuradas. Este diferencial de pressão origina um processo de filtração, denominado de invasão, constando de duas etapas: a invasão do filtrado e a retenção das partículas sólidas, material adensante, restos da rocha perfurada cortados, que se depositam na parede, formando o reboco (NERY e MACARI, 2005), sendo este constituído de um reboco interno e um reboco externo (Figura 6). Algumas técnicas mecânicas removem apenas o reboco externo, sendo necessário utilizar fluidos de completação para realizar a retirada do reboco externo e do reboco interno, a maior barreira à permeabilidade. (PETRI e QUEIROZ, 2010; ALOTAIBI *et al.*, 2007; COBIANCO *et al.*, 2007).

Estes fluidos de perfuração usualmente contêm polímeros naturais como o amido e a goma xantana, que são depositados formando o reboco na parede do poço durante a perfuração (PETRI e QUEIROZ, 2010; BAST *et al.*, 2000).

O contato dos fluidos de perfuração com a zona de produção de poços horizontais e complexos pode reduzir significativamente a capacidade de fluxo do poço pela invasão de fluido na parede do poço perfurado, reduzindo a produtividade do poço, pois os materiais poliméricos formam uma barreira diminuindo a permeabilidade dos poros (PETRI e QUEIROZ, 2010; ALOTAIBI *et al.,* 2007; BAST *et al.*, 2000; SUHY *et al.*, 1998; BEALL *et al.*, 1996).

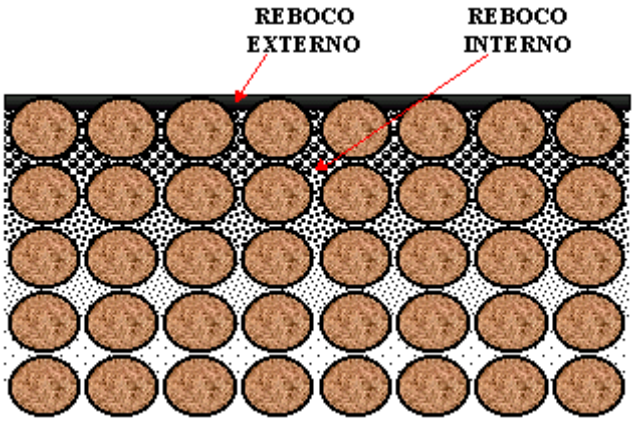


Figura 6: Reboco externo e interno (KAMEDA, 2007).

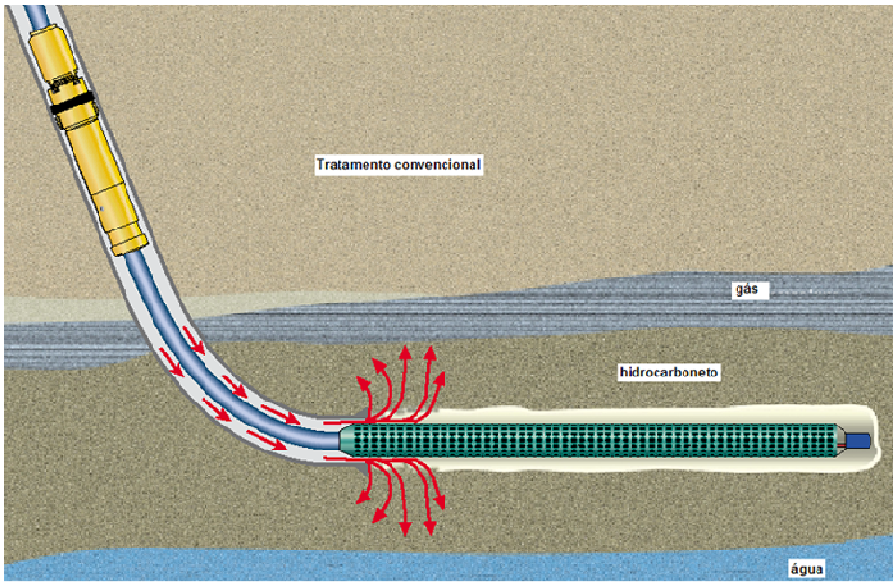
2.6. Remoção do Reboco

A remoção do reboco formado e depositado nas longas seções horizontais do poço é um problema permanente (ALOTAIBI *et al.*, 2007). No tratamento do dano à formação, a remoção do reboco é necessária para re-estabilizar a permeabilidade

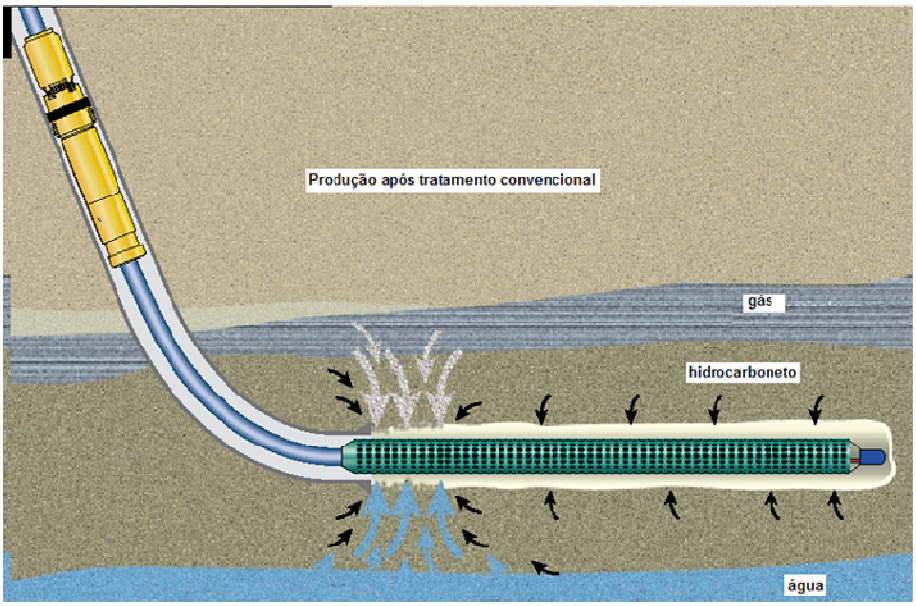
natural da área do poço perfurado, permitindo o influxo da formação. Para tal, são empregadas algumas soluções, sendo o uso de ácidos e agentes oxidantes o procedimento mais comumente adotado (PETRI e QUEIROZ, 2010; NASR-EL-DIN *et al.*, 2007; COBIANCO *et al.*, 2007).

2.6.1. Utilização de ácidos e oxidantes na remoção do reboco

Os tratamentos convencionais com ácidos fortes (como HCl e HF) e agentes oxidantes promovem uma reação rápida e localizada de remoção do reboco, resultando em uma parcial e não uniforme remoção do reboco (COBIANCO *et al.*, 2007; NARS-EL-DIN *et al.*, 2007). A distribuição desigual do ácido pela seção horizontal ocorre por não haver uma cobertura completa do poço devido à heterogeneidade da formação e esta rápida remoção do reboco pode criar vazamentos localizados do fluido de tratamento (ALOTAIBI *et al.*, 2007). A penetração do ácido na formação pode causar migração do fluido e formação de dano, como demonstrado na Figura 7 (NARS-EL-DIN *et al.*, 2007).



(a)



(b)

Figura 7: Esquema de um tratamento ácido. (a) injeção do fluido de completação com ácidos fortes com reação rápida e localizada, (b) influxo de água e gás junto com a formação (KAMEDA, 2007).

Estes agentes são extremamente reativos, mas não são específicos (COBIANCO *et al.*, 2007; NARS-EL-DIN *et al.*, 2007; LUYSTER *et al.*, 2000). Por não serem específicos, podem reagir com qualquer elemento que possa ser oxidado,

incluindo tubulações, hidrocarbonetos e alguns componentes da formação (BEALL *et al.*, 1996; BAST *et al.*, 2000; SUHY *et al.*, 1998; LUYSTER *et al.*, 2000). Devido a alta reatividade destes agentes químicos, estes podem atacar qualquer sítio disponível na cadeia polimérica do amido e/ou qualquer outro material com o qual entrem em contato em um poço (COBIANCO *et al.*, 2007). Assim, em muitos casos, ácidos e oxidantes não reagem no ponto correto de ligação do amido, podendo promover a quebra em um sítio diferente e produzir produtos insolúveis que re-precipitam, tendo assim um grande potencial para causar danos (COBIANCO *et al.*, 2007; HANSSEN e JIANG, 1999).

Oxidantes podem ser usados para degradar os polímeros presentes no reboco formado a partir de fluido de perfuração de base água. Os oxidantes geram radicais livres que atacam ligações entre os monômeros do polímero. A goma xantana e o amido são exemplos de componentes poliméricos que podem ser degradados pelos oxidantes. No entanto, a eficácia dos oxidantes é limitada pelo pH e sua eficiência é dependente da temperatura (ALOTAIBI *et al.*, 2007), além de ser corrosivo.

Além disso, cada vez mais regulamentações restritivas impulsionam para encontrar opções de limpeza menos corrosivas e mais ambientalmente seguras, incluindo agentes oxidantes menos tóxicos e quebradores enzimáticos (COBIANCO *et al.*, 2007).

2.6.2. Utilização de enzimas na remoção do reboco

As enzimas são proteínas altamente específicas produzidas por células de organismos vivos que possuem a habilidade de promover reações catalíticas específicas (BAST *et al.*, 2000; LUYSTER *et al.*, 2000).

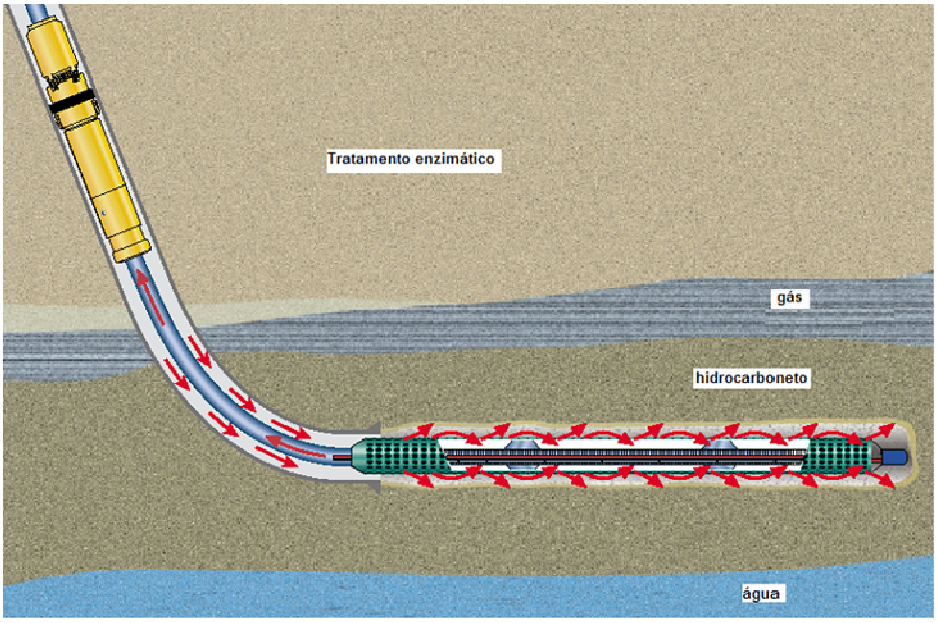
Historicamente, as aplicações enzimáticas são limitadas pela temperatura, pH e salinidade. Recentemente, enzimas termoestáveis têm sido isoladas e investigadas para degradar os polissacarídeos (amidos e agentes viscosificantes) comumente utilizados em fluidos de perfuração. O desenvolvimento biotecnológico contribui para a implementação de novos quebradores enzimáticos para a remoção do dano polimérico. Melhorias significativas na produtividade dos poços têm sido obtidas principalmente em poços horizontais e multilaterais (COBIANCO *et al.*, 2007).

Estudos em laboratório têm demonstrado que o reboco formado pelo fluido de perfuração pode ser efetivamente removido pela aplicação de um sistema enzimático para degradação dos polímeros (BEALL *et al.*, 1996). Deste modo, as enzimas oferecem uma alternativa segura aos métodos de remoção convencionais que consistem primariamente de oxidantes e ácidos.

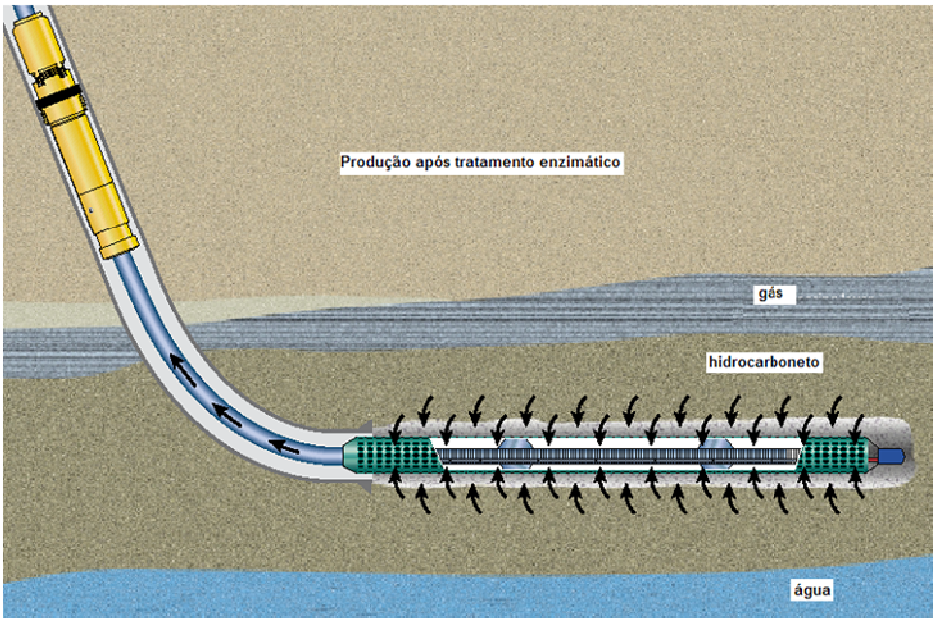
A utilização destas enzimas não possui nenhum dos efeitos associados à não especificidade dos reagentes, como reações prematuras, danos de corrosão para as ferramentas e tubulações utilizadas e problemas de descarte, pois não são reativas com outras substâncias além do polímero alvo, não reagindo também com outros componentes do fluido (BATTISTEL *et al.*, 2005; SUHY *et al.*, 1998).

O uso de um quebrador enzimático adequado pode conduzir a uma degradação eficiente do material polimérico, prevenindo um grande comprometimento da permeabilidade, pois estas enzimas quebram ligações específicas através de um processo catalítico, sendo a degradação do polímero muito efetiva e gerando pequenos açúcares que são solúveis em fluido aquoso não prejudicial para o reservatório, pois não causa dano a formação (COBIANCO *et al.*, 2007; BATTISTEL *et al.*, 2005) (Figura 8). Quebradores enzimáticos específicos

foram primeiramente introduzidos neste tipo de aplicação em 1992 (BAST *et al.*, 2000).



(a)



(b)

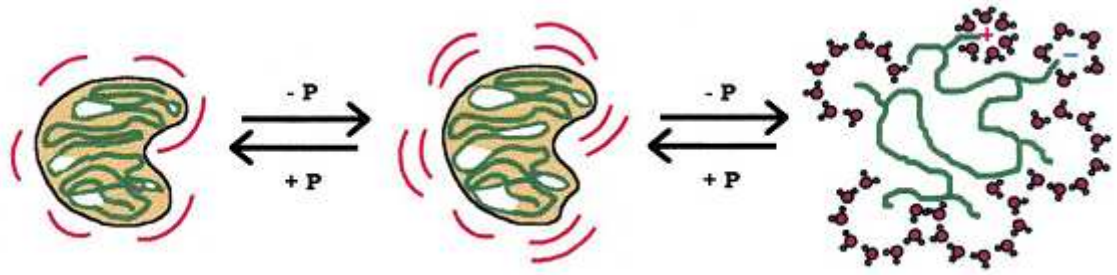
Figura 8: Esquema de um sistema enzimático. (a) Injeção de enzimas (b) degradação uniforme do reboco, obtendo alta produtividade (KAMEDA, 2007).

2.7 Parâmetros reacionais – temperatura, pressão e salinidade

A atividade das enzimas é afetada por condições ambientais, como temperatura, pressão e salinidade. Estas condições são drásticas nos poços de petróleo, como já foi descrito anteriormente.

A **temperatura** influencia a atividade das enzimas: a baixa temperatura torna as reações mais lentas e com isso diminui a atividade; já o aumento da temperatura provoca o aumento da energia presente no meio, com isso o aumento das colisões e assim o aumento da atividade. Este aumento de atividade ocorre apenas até uma temperatura específica, a temperatura ótima da enzima, onde é alcançada atividade máxima, e posteriormente a atividade diminui com o aumento da temperatura, diminuição ocasionada pela desnaturação enzimática (LEHNINGER, 2002).

Com relação à **pressão**, em algumas enzimas o aumento da pressão provoca a inativação, em outras enzimas provoca primeiramente maior estabilização ou ativação, podendo ocasionar também o aumento da atividade. Mas posteriormente com o aumento progressivo da pressão, esta provoca a desestabilização da enzima, perdendo assim seu poder catalítico (Figura 9).



(a) (b) (c)

Figura 9: Mecanismo de estabilização das enzimas pela pressão. (a) enzima estabilizada pela pressão, (b) enzima em estado nativo e (c) enzima em estado desnaturado. (Moficada de BOONYARATANAKORNKIT *et al., 2002)*

Os mecanismos para ativação das enzimas pela pressão podem ser: pela mudança na estrutura da enzima, na conformação, ou pela mudança nas propriedades físicas do substrato ou do solvente.

A pressão também está relacionada a termo-estabilização. Esta ocorre, pois a temperatura e a pressão são forças opostas com relação a entropia. Com isso, aumentos na temperatura levam a desordem enquanto o aumento da pressão leva a ordem. (EISENMENGER e REYS-DE-CORCUERA, 2009; BOONYARATANAKORNKIT *et al.,2002*). Havendo então um aumento nos dois parâmetros, como o que ocorre normalmente em poços perfurados as enzimas não seriam inativadas.

A alta **salinidade** comumente observada em fluidos se deve a vários fatores, como a necessidade de utilização de água do mar por ser a de mais fácil acesso nos poços *off-shore* e também pode ser um componente adicionado para melhorar os fluidos agindo como um estabilizador térmico. A alta salinidade provoca o efeito conhecido como *salting-out* onde o aumento da concentração iônica resulta no decréscimo na atividade da água, resultando na redução das interações entre a água e os grupos polares das proteínas, com isso as proteínas ficam mais susceptíveis a aglomeração, diminui a solubilidade da molécula em água, diminuindo sua atividade. No efeito *salting-in* ocorrem forças de atração entre os íons da proteína e os íons do sal, que estão muito hidratados, esta hidratação contribui para o aumento da camada de hidratação da molécula favorecendo o aumento da solubilidade. Uma concentração salina intermediária, similar a do sangue humano (9 g/L de sal), é a concentração ótima para a maioria das enzimas ficar ativa (SAMUEL *et al.*, 2009).

A habilidade das enzimas utilizadas na remoção do reboco em degradar os polímeros é muito influenciada pelo tipo de salmoura utilizada (COBIANCO *et al.*, 2007). O aumento na concentração de sais eleva a força iônica do fluido, o que pode acarretar na diminuição da atividade devido ao efeito *salting-out*.

2.8 α-amilases

As α-amilases são universalmente distribuídas, estando presente em animais, plantas e micro-organismos. As α-amilases produzidas pelos micro-organismos são as mais comumente utilizadas (GUPTA *et al.*, 2003). O peso molecular das α-amilases na natureza varia de 10 kDa (*Bacillus caldolyticus*) a 210 kDa (*Chloroflexus aurantiacus*), mas as α-amilases de microorganismos possuem normalmente de 50 a 60 kDa (GUPTA *et al.*, 2003).

Devido à elevada temperatura existente nos poços de petróleo, α-amilases termoestáveis são alvo de estudos. Estas são usualmente obtidas de *Bacillus licheniformis* (ASGHER *et al.*, 2007). As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise de moléculas de amido gerando diversos produtos incluindo dextrinas, polímeros (oligossacarídeos) progressivamente menores compostos de várias unidades de glicose e também o monômero de glicose (ASGHER *et al.*, 2007; GUPTA *et al.*, 2003). Essas enzimas catalisam a hidrólise randomicamente as ligações α-1,4 glicosídicas do amido (Figura 10) (AL-OTAIBI *et al.,2004)*.

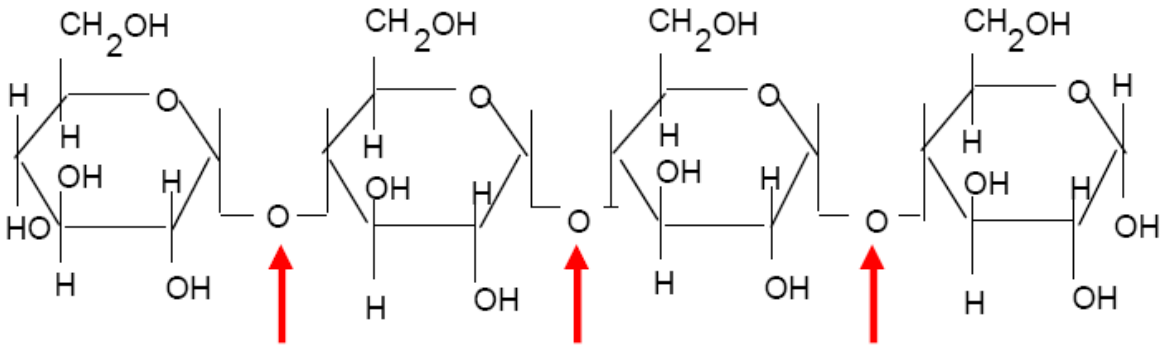


Figura 10: Estrutura da amilose com indicação da ação da α-amilase. (Moficada de AL-OTAIBI *et al., 2004)*

As α-amilases bacterianas são metaloenzimas, que quando contendo ao menos um íon de Ca^{2+} se tornam estáveis. A afinidade da α-amilases pelo íon Ca^{2+} é muito forte, sendo este um íon importante para a estabilidade da enzima. Na presença deste íon Ca^{2+}, a α-amilase é muito mais termoestável quando comparada a ausência deste íon (Figura 11).

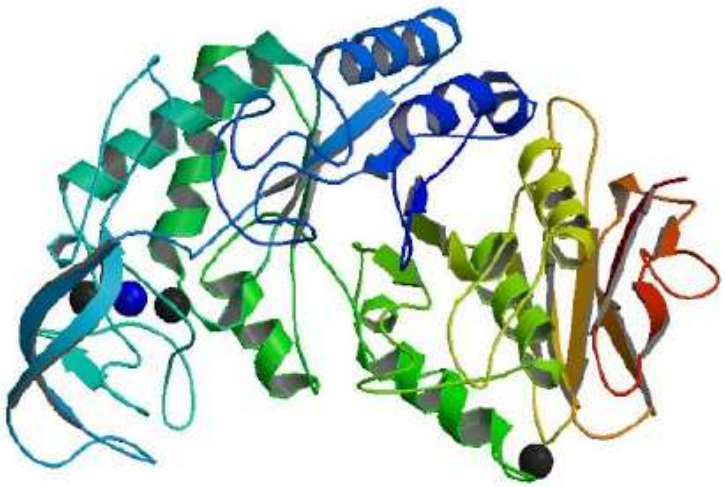


Figura 11: Estrutura 3D da α-amilase derivada de *Bacillus licheniformis.* Íon Ca^{2+} (●) estabiliza a estrutura secundária e é responsável pela alta estabilidade à temperatura (SAMUEL *et al.*, 2009).

2.9 Cinética Enzimática

A curva que expressa a relação entre a concentração de substrato e V_o tem a mesma forma geral para a maioria das enzimas que pode ser expressa algebricamente pela equação de Michaelis-Menten (Equação 1), a equação da velocidade para uma reação catalisada enzimaticamente e com um único substrato. $V_{máx}$ é um parâmetro significativo na cinética enzimática, que representa a velocidade inicial máxima atingida quando praticamente todas as moléculas da enzima estão na forma de complexo enzima-substrato. K_m é igual a concentração de substrato onde V_o é igual à metade de $V_{máx}$ (K_m = [S] quando V_o = ½ $V_{máx}$) (LEHNINGER, 2002).

$$V_o = \frac{V_{máx}\,[S]}{K_m + [S]}$$

Equação 1

A degradação do amido existente no reboco é uma reação catalisada por α-amilases cujas atuações são influenciadas pelas condições existentes nos poços de petróleo, tais como a temperatura e a salinidade. Deste modo, a determinação da velocidade da reação deve ser realizada nas diferentes condições ambientais, pois as reações catalisadas por α-amilases obedecem à equação de Michaelis-Menten (LEHNINGER, 2002).

Um dos principais fatores que afetam a velocidade de uma reação é a concentração de substrato; porém o estudo dos efeitos da concentração de substrato é dificultado pelo fato desta variar durante a reação à medida que o produto é formado. Uma abordagem simplificada em experimentos cinéticos é medir a velocidade inicial da reação (V_o) quando a concentração de substrato é geralmente

muito maior do que a concentração da enzima. Dessa maneira, se o tempo for suficientemente curto, as mudanças na concentração de substrato serão desprezíveis, podendo ser considerada constante (LEHNINGER, 2002).

Em concentrações relativamente baixas de substrato, a V_o aumenta linearmente com o aumento da concentração de substrato e esta velocidade, V_o, aumenta cada vez menos em resposta ao aumento da concentração de substrato. Finalmente, atinge-se um patamar, onde o aumento de V_o é insignificante com o aumento da concentração de substrato. Este é muito próximo da velocidade máxima de reação ($V_{máx}$) (Figura 12). A velocidade máxima da reação ($V_{máx}$) será atingida quando praticamente todas as moléculas de enzima estiverem ligadas ao substrato, na forma de complexo enzima-substrato e a concentração de enzima livre for significantemente pequena (LEHNINGER, 2002).

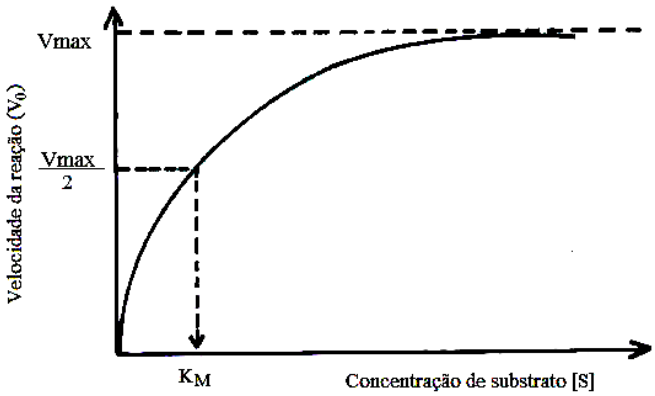


Figura 12: Gráfico de Michaelis-Menten

O gráfico dos inversos de Lineweaver-Burk (Figura 13) é um dos métodos utilizados para enzimas que obedecem à equação de Michaelis-Menten. Esta representação é muito útil na análise de inibidores enzimáticos, pois nesta representação os valores de K_m e $V_{máx}$ são mais facilmente encontrados e com isso

se torna mais fácil verificar o efeito do inibidor nas reações e também comparar as reações com e sem inibidor (LEHNINGER, 2002).

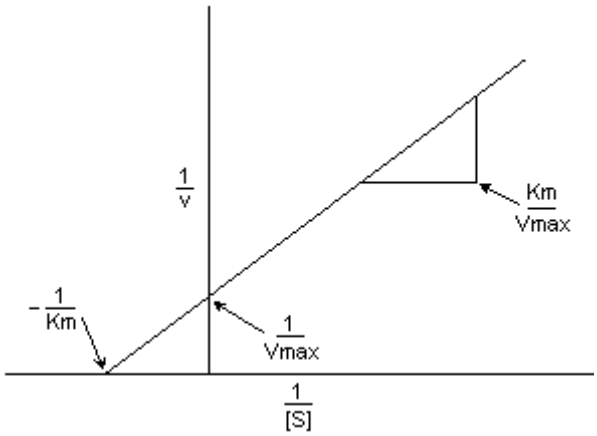


Figura 13: Gráfico dos inversos de Lineweaver-Burk

2.10 Inibição enzimática

Os inibidores das enzimas são agentes moleculares que interferem na catálise, diminuindo ou interrompendo as reações enzimáticas. As inibições podem ser reversíveis ou irreversíveis. Existem três importantes mecanismos de inibição reversível: a inibição competitiva, a acompetitiva ou não competitiva e a inibição mista não competitiva.

Na inibição competitiva o inibidor compete com o substrato pelo mesmo sítio de ligação da enzima, impedindo a ligação do substrato. Observa-se que a $V_{máx}$ permanece inalterada na presença de um inibidor competitivo. O valor de K_m aparente, valor observado na presença do inibidor, é maior do que o K_m sem a presença do inibidor, diminuindo a inclinação da reta, logo a afinidade é menor (Figura 14).

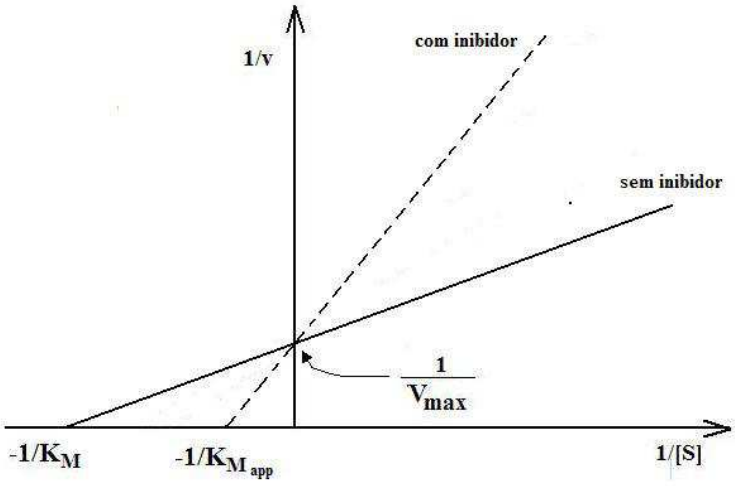


Figura 14: Gráfico de Lineweaver-Burk no caso de inibição competitiva

A inibição acompetitiva é caracterizada por ter seus inibidores se ligando em regiões diferentes do sítio ativo da enzima, mas se ligando ao complexo enzima-substrato (ES). Um inibidor acompetitivo diminui a $V_{máx}$ e também o valor de K_m aparente (Figura 15).

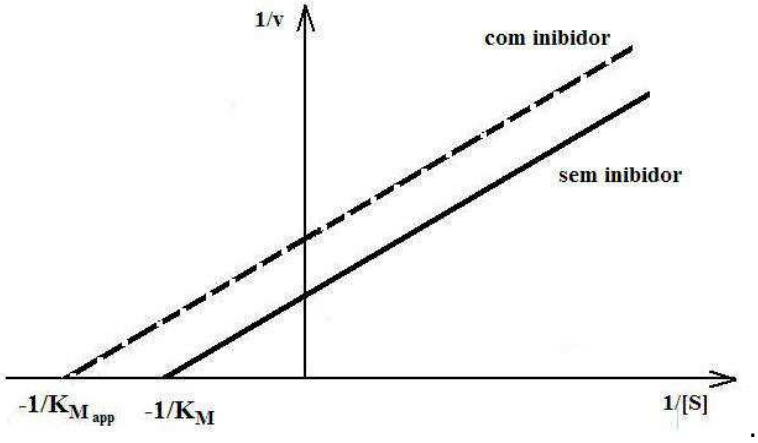


Figura 15: Gráfico de Lineweaver-Burk no caso de inibição acompetitiva

Um inibidor misto não competitivo também se liga a um sítio diferente do sítio ativo do substrato, mas ele pode se ligar tanto à enzima como ao complexo ES. Um inibidor misto não competitivo afeta tanto a $V_{máx}$ como o K_m (Figura 16).

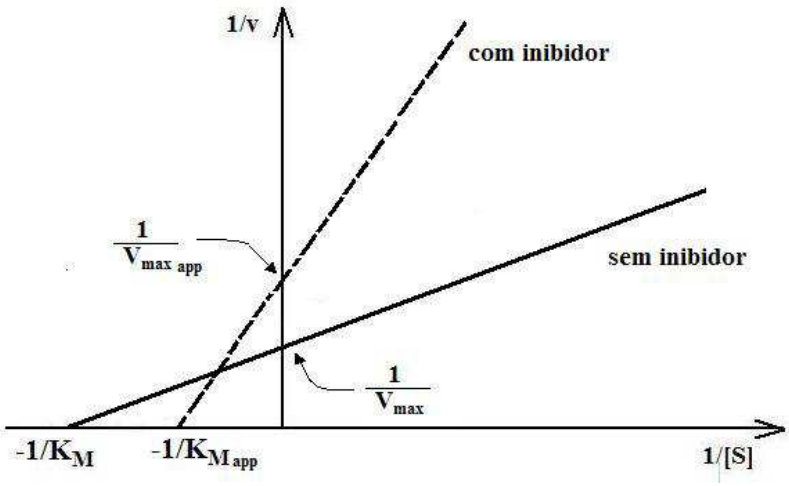


Figura 16: Gráfico de Lineweaver-Burk no caso de inibição mista não competitiva

COBIANCO *et al.* (2007) realizaram estudos com cinco salmouras e três enzimas termofílicas diferentes, sendo uma dessas enzimas uma amilase, para a qual um tempo de quatro horas foi suficiente para a completa quebra do amido presente no reboco, enquanto para as outras duas enzimas em estudo foram necessárias de 15 a 20 horas para completa remoção dos polímeros presentes no reboco. As três enzimas estudas mostraram resistência ao sal, apesar disso é relatado que as condições do meio podem resultar no efeito *salting-out* e a proteína pode ser inativada devido a desnaturação. Estes estudos são importantes, pois utilizamos alta concentração salina no fluido utilizado neste trabalho.

BATTISTEL *et al.* (2005) testaram o efeito de duas preparações a base de amilases e observaram modificações no comportamento da filtração do reboco com

saída de fluido, sugerindo uma mudança na estrutura do reboco a qual pode ser atribuída unicamente a degradação de um componente, o amido. Os testes de saída de fluido mostraram que as amilases são eficientes quebradoras de reboco. A recuperação de fluido pode ser observada em pouco tempo e com a utilização de uma baixa concentração de enzima, mas o tempo requerido depende do quebrador enzimático utilizado e também do amido.

KAMEDA *et al.* (2007) utilizaram duas preparações enzimáticas em seus estudos, Termamyl (comercializada pela Novozymes Latin America Ltda) e GBW (fornecida pelo Cenpes/Petrobras), e verificaram que a faixa de temperatura na qual se obteve maior atividade foi de 65 a 95°C e que a alta salinidade provoca uma diminuição da atividade. Os autores observaram também que há perda de atividade catalítica nas temperaturas mais elevadas de 80 e 95°C. Na análise cinética foi observada uma inibição do tipo mista provocada pelo fluido de completação.

MESQUITA *et al.* (2010) realizaram estudos cinéticos com as mesmas preparações enzimáticas empregadas por KAMEDA *et al.* (2007), Termamyl e GBW, onde verificaram que a α-amilase Termamyl apresentou melhores resultados na conversão do amido comparado ao quebrador enzimático GBW, pois a $V_{máx}$ obtida foi igual ou superior à $V_{máx}$ do quebrador enzimático em fluido de completação.

As mesmas enzimas utilizadas por KAMEDA *et al.* (2007) e MESQUITA *et al.* (2010) são usadas neste trabalho juntamente com as outras duas novas enzimas. Os resultados obtidos por eles nos experimentos de estabilidade e nos experimentos de cinética também são utilizados como modo de comparação.

3 OBJETIVOS

Nas perfurações de poços de petróleo são realizadas perfurações horizontais, ou multidirecionais, em detrimento dos poços verticais garantindo assim uma maior produtividade. Mas apesar da maior produtividade, estes poços horizontais apresentam dificuldades relacionadas a remoção do reboco posterior à perfuração, na fase de completação, necessária para que ocorra a retirada do petróleo da formação.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar quatro preparações enzimáticas comerciais (Liquozyme, Termamyl, Mi-Swaco e GBW) para a utilização em perfurações de poços de petróleo *off-shore*, avaliando o efeito das condições do poço, como temperatura (30, 50, 65, 80 e 95°C), salinidade (204 g/L de NaCl) e diferencial de pressão (100, 500 e 1000 psi) na atividade e na estabilidade das amilases presentes nesses preparados.

Os objetivos específicos relacionam-se com:

- Efeito da temperatura (30 a 95°C), salinidade (204 g/L de NaCl) e pressão (100, 500 e 1000 psi) na atividade amilolítica dos preparados enzimáticos.
- Efeito da temperatura (65 a 95°C), salinidade (204 g/L de NaCl) e pressão (100, 500 e 1000 psi) na estabilidade dos preparados enzimáticos.
- Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$) dos preparados enzimáticos.
- Avaliação da inibição provocada por cada componente do fluido de completação (NaCl, Bissulfito e *Ultrawet*) nos preparados enzimáticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os equipamentos utilizados foram:

- ⇨ Espectrofotômetro Hach DR/4000 UV;
- ⇨ Agitador de tubos MS1 Minishaker IKA;
- ⇨ Banho termostático Cole-Parmer Polystat H6L;
- ⇨ Placa de aquecimento e agitação IKA C-MA;
- ⇨ Condutivímetro METTLER TOLEDO;
- ⇨ Reator Parr 4843 de aço inoxidável Parr Instrument Company Ltda.

Neste trabalho foram empregadas duas preparações enzimáticas a base de α-amilases (Liquozyme e Termamyl) gentilmente doadas pela Novozymes Latin America Ltda (Paraná, Brasil) e dois quebradores comerciais (Mi-Swaco e GBW) cedidos pelo Cenpes/Petrobras.

O tampão fosfato era constituído de 22,5 ml de uma solução fosfato de sódio monobásico 0,4 M, 27,5 ml de uma solução fosfato de sódio dibásico 0,4 M, 2,925 g/L de NaCl em pH 6,9.

O fluido de completação (9,4 ppg) também foi cedido pelo Cenpes/Petrobras (RJ). O fluido era constituído de 204 g/L de NaCl, 0,2 g/L de bissulfito de sódio e 0,3 % v/v de Ultrawet (éter etoxilado) 70 em pH= 8-9.

4.2 *Eletroforese*

Os perfis eletroforéticos das preparações enzimáticas foram realizados empregando gel de poliacrilamida a 12% (m/v) como gel de separação, sendo as

amostras previamente diluídas 20 vezes e inativadas com alta temperatura (100°C). A corrida eletroforética se realizou a 150 V e 500µA por 1 hora e 30 minutos. A revelação do gel foi feita com corante *Comassie Coloidal Brilliant Blue*. As análises foram realizadas no Departamento de Bioquímica Médica, ICB/UFRJ. (as análises foram realizadas em duplicata)

4.3 *Determinação do teor de proteína*

O método de Lowry foi utilizado para determinar o teor de proteína das preparações amilolíticas comerciais (LOWRY, 1951). Consistiu inicialmente em juntar 0,5 ml da amostra previamente diluída 100 vezes (ou água destilada, no caso do ensaio em branco) com 2 ml de Reagente A (composto por 1 ml de $CuSO_4$ 1% (m/v); 1 ml de solução de tartarato duplo de Na e K 2% (m/v) e 98 ml de solução de $NaCO_3$ 2% (m/v) em NaOH (0,1 g/L)). Após 10 minutos de repouso a temperatura ambiente, adicionou-se 0,2 ml do Reagente B (solução de Folin-Ciocalteau diluída 2 vezes em água destilada). Depois de 30 minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro Hach DR/4000 UV a 660 nm. Uma curva com diferentes concentrações de albumina de soro bovino (BSA) (0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; e 0,1 mg/mL) foi utilizada como padrão. (as análises foram realizadas em triplicata)

4.4 *Índice de emulsificação*

A determinação do índice de emulsificação (IE) foi realizada de acordo com o método descrito por COOPER e GOLDENBERG (1987). O IE das preparações enzimáticas foi determinado pela adição de 1 ml de hexadecano a 1 ml da amostra.

Em seguida, a mistura foi homogeneizada em vortex MS1 Minishaker por 2 minutos a 3000rpm e deixada em repouso por 24 horas.

Após esse tempo foi medida, com um paquímetro, a altura da camada de emulsão e a altura total da mistura. O índice de emulsificação foi calculado de acordo com a equação 1. (as análises foram realizadas em triplicata)

$$\text{Índice} = \frac{\text{altura da camada de emulsão}}{\text{altura total da mistura}} \times 100$$

Equação 1

4.5 *Tensão superficial*

A determinação da tensão superficial das preparações amilolíticas comerciais foi realizada utilizando o tensiômetro K100 Krüss, segundo o método da placa e anel De Nöuy. Para cada amostra analisada foram necessários 30 ml de amostra, mantidos a 30℃. O equipamento foi previamente cali brado com água destilada na mesma temperatura. As análises foram realizadas no laboratório de Sistemas Particulados EQ/UFRJ. (as análises foram realizadas em triplicata)

4.6 *Atividade hidrolítica de lipase*

A atividade hidrolítica de lipase presente nas preparações enzimáticas foi determinada de acordo com AMARAL *et al.* (2007). Uma unidade (U) de atividade enzimática hidrolítica foi definida como a quantidade de lipase que catalisa a liberação de 1 µmol de p-nitrofenol por minuto nas condições do ensaio. O sistema reacional foi composto por 1,8 ml do reagente p-nitrofenil laurato (0,018 gNL em 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) e 99 ml de tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7) e 0,2 ml da amostra diluída, sendo mantido a 37ºC. A variação de absorbância

produzida pela reação foi medida a 410nm em intervalos de 5s durante 100s. O branco da reação correspondeu à variação de absorbância obtida apenas para o reagente p-nitrofenil laurato a 37ºC. A atividade enzimática pode ser calculada de acordo com a Equação 2. (as análises foram realizadas em duplicata)

$$A = \frac{\Delta Abs \times D \times f \times V_R}{\Delta t \times V_A}$$

Equação 2

sendo:

A = atividade da enzima (U/L);

ΔAbs = variação de absorvância no intervalo de tempo (em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear dos valores de absorbância;

D = diluição da amostra;

f = fator de conversão dos valores de absorvância para a concentração de p-nitrofenol;

Δt = tempo decorrido de análise;

V_R = volume reacional (L);

V_A = volume da solução enzimática utilizada no ensaio (L).

4.7 *Determinação de força iônica*

A força iônica (FI) presente nas soluções utilizadas foi determinada a partir da medida da condutividade elétrica (CE) com a utilização da Equação 3. A condutividade foi medida utilizando-se um condutivímetro tipo TDS/SAL/Resistivity METTLER. (as análises foram realizadas em duplicata)

$$FI\ (mol/L) = 0{,}013 \times CE\ (dS/m)$$

Equação 3

4.8 Atividade amilolítica

A atividade amilolítica foi determinada através da concentração de açúcares redutores resultantes da hidrólise de uma solução de amido (1% m/v), pelo método do ácido dinitrosalicílico – DNS (MILLER, 1959).

Uma amostra de enzima foi adicionada a uma solução de amido (1% m/v) em tampão fosfato (0,02 $mol.L^{-1}$, pH 6,9 e NaCl 0,05 $mol.L^{-1}$), homogeneizada e mantida a 30℃. As reações enzimáticas foram interrompidas após 5 minutos pela adição de uma solução contendo ácido dinitrosalicílico (DNS) (solução composta por 10 g/L de ácido 3,5-Dinitrosalicilico, 300 g/L de tartarato duplo de sódio e potássio e 16 g/L hidróxido de sódio) e a mistura resultante foi imediatamente aquecida em banho a 100℃ por 10 min. Em seguida, adicionou-se 10mL de água destilada, homogeneizou-se e com a solução obtida foi feita a determinação da absorbância a 540nm em espectrofotômetro Hach DR/4000UV. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1μmol de glicose (produto formado)/minuto nas condições do ensaio. O cálculo da atividade enzimática foi realizado de acordo com a Equação 4. (as análises foram realizadas em triplicata)

$$A = \frac{Abs \times f \times V_R}{t * V_E} \times D$$

Equação 4

sendo:

A = atividade da enzima (U/mL),

Abs = absorbância obtida após 5 minutos de reação;

f = fator de conversão dos valores de absorbância para a concentração de glicose, retirado da curva padrão;

t = tempo de reação de igual a 5 minutos;

V_R = volume reacional (ml);

V_E = volume da enzima (ml);

D = diluição da amostra;

4.9 *Efeito da temperatura e da concentração de sal na atividade amilolítica*

O efeito da temperatura e da salinidade na atividade amilolítica dos preparados enzimáticos foi verificado na reação de hidrólise de amido em tampão fosfato e em fluido de completação. Uma amostra da preparação enzimática (na concentração de $5x10^{-3}$ % (v/v)) foi adicionada a uma solução de amido (1% m/v) em tampão fosfato (0,02 $mol.L^{-1}$, pH 6,9 e NaCl 0,05 $mol.L^{-1}$) ou em fluido de completação, homogeneizada e mantida a 30℃, 50℃, 65℃, 80℃ e 95℃. As reações enzimáticas foram interrompidas após 5 minutos pela adição de ácido dinitrosalicílico (DNS) e a mistura resultante foi imediatamente aquecida em banho a 100℃ por 10 min. A concentração de açúcares reduto res foi determinada conforme o item 4.8. O cálculo da atividade enzimática foi realizado de acordo com a Equação presente no item 4.8. (as análises foram realizadas em duplicata)

4.10 Estabilidade à temperatura

As quatro preparações enzimáticas (Liquozyme, Termamyl, Mi-Swaco e GBW) foram diluídas em fluido de completação (volume final 25ml, pH 8-9). A concentração final das enzimas no fluido foi de 1% (v/v). A solução diluída de cada produto foi mantida em banho-maria nas temperaturas de 65ºC, 80ºC e 95℃ por 8 horas ou até que não fosse possível detectar atividade amilolítica. Amostras de 0,1 ml foram retiradas em intervalos de 1 hora e a atividade amilolítica foi determinada de acordo com o item 4.8. Foram realizados ensaios controle, substituindo fluido de completação por água destilada. (as análises foram realizadas em duplicata)

4.11 *Determinação de parâmetros cinéticos*

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ das amilases presentes nas preparações enzimáticas comerciais Liquozyme, Termamyl, Mi-Swaco e GBW foram determinados em reação com amido solúvel, nas concentrações de 1,25; 2,5; 3,75; 5; 6,25; 7,5 e 8,75 mg/mL, em tampão fosfato de sódio (0,02 $mol.L^{-1}$, pH 6,9 e NaCl 0,05 $mol.L^{-1}$) e em fluido de completação (pH 8–9). As reações foram realizadas nas temperaturas de 65ºC e 80ºC e as amostras foram retiradas nos tempos de 0, 0,5, 1, 2, 5, 7, 10,15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 min. A concentração dos produtos formados (concentração de açúcares redutores) na hidrólise foi determinada através do método do ácido dinitrosalicílico (DNS), conforme item 4.8. (as análises foram realizadas em triplicata)

4.12 Efeito dos componentes do fluido de completação na atividade enzimática

O efeito dos componentes NaCl (204 g/L), $NaHSO_3$ (0,14 g/L) e Ultrawet (0,3% v/v) presentes no fluido de completação na atividade amilolítica dos preparados enzimáticos foi verificado realizando reações de hidrólise de amido (1% m/v), no fluido de completação e nas soluções contendo apenas um de seus componentes: NaCl (204 g/L), $NaHSO_3$ (0,14 g/L) e Ultrawet (0,3% v/v). As reações foram conduzidas na temperatura de 65ºC. As preparações enzimáticas foram empregadas na concentração de $5x10^{-3}$% (v/v). As reações enzimáticas foram interrompidas após 1, 2, 3, 5, 7 e 10 minutos pela adição de ácido dinitrosalicílico (DNS) e a mistura resultante foi imediatamente aquecida em banho a 100℃ por 10 min. Adicionou-se 10ml de água destilada, homogeneizou-se e com a solução obtida foi feita a determinação da concentração de açúcares redutores conforme método descrito no item 4.8. O cálculo da atividade enzimática foi realizado de acordo com a Equação 4 presente no item 4.8. (as análises foram realizadas em duplicata)

4.13 *Determinação de parâmetros cinéticos na presença do inibidor NaCl*

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ da amilase presente nas preparações enzimáticas comerciais Liquozyme, Termamyl, Mi-Swaco e GBW foram determinados em reação com amido solúvel, nas concentrações de 1,25; 2,5; 3,75; 5; 6,25; 7,5 e 8,75mg/mL, em tampão fosfato de sódio (0,02 $mol.L^{-1}$, pH 6,9 e NaCl 0,05 $mol.L^{-1}$) e nas soluções de fluido de completação contendo três diferentes concentrações do inibidor 0% (sem adição de NaCl), 50% (102 g/L NaCl) e 100%

(204 g/L NaCl). As reações foram realizadas na temperatura de 65ºC. A concentração de produtos formados (concentração de açúcares redutores) na hidrólise do amido foi determinada através do método do ácido dinitrosalicílico (DNS), de acordo com o item 4.8. (as análises foram realizadas em triplicata)

4.14 *Efeito da agitação no Reator Parr na atividade da α-amilase*

O efeito na hidrólise enzimática do amido (1% m/v) da agitação provocada pelo agitador mecânico do Reator Parr 4843 (Figura 17) foi investigado empregando agitações de 50, 100, 150 e 200 rpm e sem agitação, na pressão de 100 psi e temperatura de 65°C, em tampão fosfato de sódio (0,02 $mol.L^{-1}$, pH 6,9). A preparação enzimática Liquozyme foi empregada na concentração de $5x10^{-3}$% (v/v). A atividade amilolítica residual foi determinada de acordo com o item 4.8. (as análises foram realizadas em duplicata)

Figura 17: Reator Parr 4843 com volume útil de 80 ml e pressão máxima de 2000 psi. Possui uma célula para injeção da enzima na reação e controle de pressão e temperatura em um monitor digital.

4.15 *Efeito da pressão na atividade da α-amilase*

O efeito da pressão na hidrólise enzimática do amido (1% m/v) foi investigado empregando Reator Parr 4843, nas pressões de 100, 500 e 1000 psi nas temperaturas de 65, 80 e 95°C, em tampão fosfato de sódio (0,02 mol.L^{-1}, pH 6,9) ou em fluido de completação. As preparações enzimáticas Liquozyme, Termamyl, Mi-Swaco e GBW foram empregadas na concentração de $5x10^{-3}$% (v/v). Amostras de 1ml foram retiradas após 1, 2, 3, 5, 7, 10 e 15 minutos. Os açúcares redutores produzidos foram quantificados de acordo com o item 4.8.

4.16 *Efeito da pressão na estabilidade da α-amilase*

As quatro preparações enzimáticas Liquozyme, Termamyl, Mi-Swaco e GBW foram diluídas em fluido de completação (pH 8-9). A concentração final das preparações enzimáticas foi de 1% (v/v). A solução diluída de cada produto foi mantida nas temperaturas de 65ºC, 80ºC e 95°C, nas pressões de 100, 500 e 1000 psi por 8 horas ou até que não fosse possível detectar atividade amilolítica. Os ensaios foram realizados no Reator Parr 4843 e as amostras foram retiradas em intervalos de 1 hora. A atividade amilolítica foi, então, determinada de acordo com o item 4.8. Foram realizados ensaios controle, substituindo o fluido de completação por água destilada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos preparados enzimáticos

As α-amilases comerciais (Liquozyme e Termamyl) são enzimas termo estáveis expressas e produzidas por uma cepa de *Bacillus licheniformis* geneticamente modificada. A α-amilase é uma endoamilase que hidrolisa ligações 1-4-α-glicosídicas, quebrando o amido em dextrinas e oligossacarídeos solúveis (EISENMENGER e REYS-DE-CORCUERA, 2009; LI *et al.*, 2007; GUPTA *et al.*, 2003), e resultando em rápida redução da viscosidade do amido gelatinizado. Assim, estas enzimas têm um grande potencial em aplicações de remoção de reboco.

Os quebradores enzimáticos (Mi-Swaco e GBW) são descritos como produtos capazes de remover o reboco das paredes do poço durante as operações de completação, cuja composição protéica não é descrita pelo fabricante.

Devido a baixa quantidade de dados sobre os quebradores enzimáticos, todas as quatro preparações enzimáticas foram caracterizadas de forma comparativa e posteriormente avaliadas verificando a aplicação para remoção de reboco em operações de completação de poços de petróleo.

Para a caracterização dos preparados enzimáticos Liquozyme, Termamyl, Mi-Swaco e GBW foram realizados os ensaios de eletroforese, quantidade de proteína, índice de emulsificação, tensão superficial, determinação da atividade hidrolítica da lipase e atividade amilolítica.

5.1.1 Eletroforese

Preparações de proteínas podem ser analisadas pelo exame de intensidade relativa de banda de uma proteína específica obtida por eletroforese. Segundo a literatura (GUPTA *et al.*, 2003; EZEIJI e BAHE, 2006), o peso molecular da amilase é dependente da fonte de enzima e varia entre 10-210 kDa. Embora a composição dos quebradores enzimáticos não seja fornecida, os resultados revelaram, como apresentado na Figura 18, que todas as preparações enzimáticas têm perfis eletroforéticos muito semelhantes mostrando uma banda de proteína de aproximadamente 60kDa de massa molecular, demonstrando que apresentam características similares.

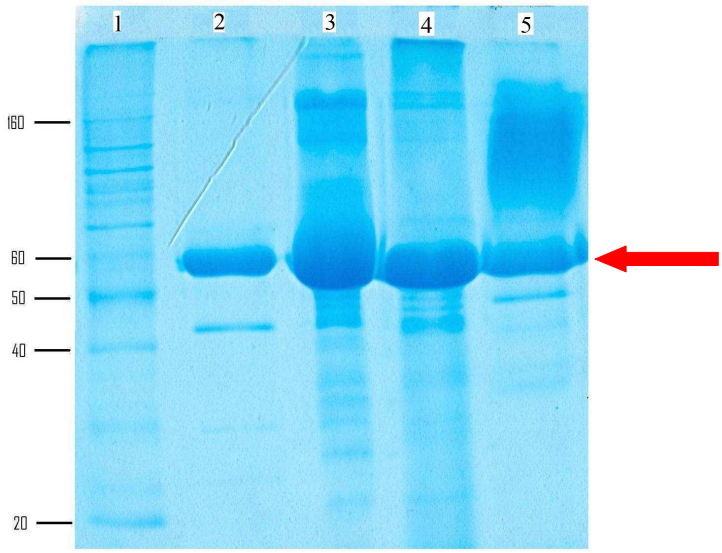


Figura 18. Eletroforese empregando gel de poliacrilamida a 12% (m/v) como gel de separação. (1) padrão de peso molecular; (2) Liquozyme; (3) GBW; (4) Mi-Swaco; (5) Termamyl. A seta marca a mesma banda de mesmo peso molecular de 60kDa.

5.1.2 Quantidade de Proteína

A concentração de proteína presente nas amilases comerciais Liquozyme e Termamyl foi de 53,93 mg/ml e 54,11 mg/ml, e para os quebradores enzimáticos Mi-Swaco e GBW foi de 58,67 mg/ml e 84,86 mg/ml, respectivamente. As amilases comercias apresentam uma concentração muito semelhante, sendo esta concentração próxima a apresentada pelo quebrador enzimático Mi-Swaco, apenas o quebrador enzimático GBW possui uma concentração mais elevada.

5.1.3 Índice de Emulsificação

Os agentes de emulsificação ou surfactantes são substâncias que aumentam a estabilidade da emulsão (RODRIGUEZ *et al.*, 2006). A fim de caracterizar as preparações enzimáticas e verificar a sua capacidade emulsificante, o índice de emulsificação foi determinado. Somente os quebradores enzimáticos Mi-Swaco e GBW apresentaram capacidade emulsificante, com valores de 20,76% e 28,57%, respectivamente, o que indica que somente estes possuem surfactante.

NASR-EL-DIN *et al.* (2006) verificaram que fluidos de completação que continham enzimas e surfactantes foram efetivos na remoção de grande parte do reboco. Uma posterior lavagem com solvente é necessária para remover surfactantes residuais que podem ter permanecido depois do processo de limpeza.

5.1.4 Tensão Superficial

A tensão superficial é um fenômeno causado pelas forças coesivas entre as moléculas presentes no líquido. A causa é um efeito elástico no filme superficial dos líquidos. A tensão superficial governa o comportamento físico-químico dos líquidos

(LEE *et al.*, 2009)**.** A tensão superficial das amilases estudadas foi analisada a fim de verificar as propriedades dos preparados enzimáticos. A tensão superficial determinada para as amilases comerciais Liquozyme e Termamyl foi de 43,441 mN/m (desvio padrão de 0,043 mN/m) e 40,164 mN/m (desvio padrão de 0,080 mN/m), respectivamente, e a dos quebradores enzimáticos Mi-Swaco e GBW igual a 34,313 mN/m (desvio padrão de 0,055 mN/m) e 36,975 mN/m (desvio padrão de 0,004 mN/m), respectivamente.

As preparações enzimáticas Mi-Swaco e GBW apresentaram uma menor tensão superficial quando comparadas com as outras duas preparações enzimáticas, o que pode ser decorrente da presença de surfactantes que ocorre apenas nestas duas preparações, como verificado no item 5.1.3. Esta diminuição da tensão superficial provocada pela presença de surfactante é conhecida na literatura.

NASR-EL-DIN *et al.* (2006) verificaram que o surfactante estudado reduz a tenção superficial da salmoura utilizada em seu trabalho, especialmente em altas temperaturas.

5.1.5 Atividade Lipolítica

A atividade hidrolítica de lipase não foi detectada em nenhum dos quatro preparados enzimáticos. Esta medida é realizada para garantir que a ação existente na reação é devida, essencialmente, a atividade da amilase utilizada, não existindo um potencial efeito lipolítico sobre o óleo, pois em dois dos preparados enzimáticos estudados foi detectada a presença de surfactantes.

5.1.6 Atividade Amilolítica

A atividade amilolítica apresentada pelas amilases comerciais Liquozyme e Termamyl na temperatura de 65ºC foi de 48.667 U/mL e 34.817 U/mL em tampão fosfato de sódio (0,02mol.L^{-1}, pH 6,9 e 0,05 mol.L^{-1} de NaCl) e 7.700 U/mL e 6.714 U/mL em fluido de completação, enquanto que a atividade dos quebradores enzimáticos Mi-Swaco e GBW foi de 33.179 U/mL e 37.008 U/mL em tampão fosfato de sódio e 6.566 U/mL e 6.966 U/mL em fluido de completação, respectivamente.

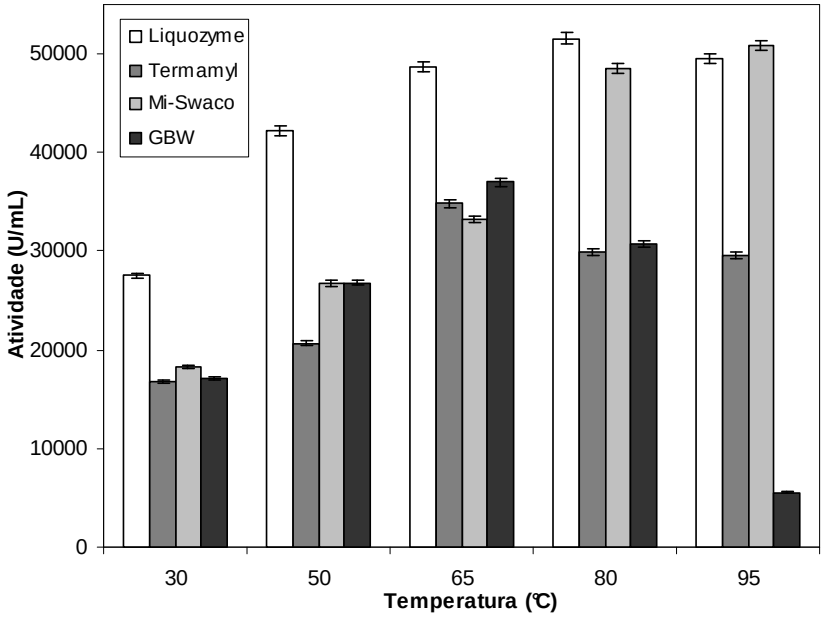
A preparação enzimática Liquozyme apresentou a maior atividade quando comparada com as atividades apresentadas pelas outras três enzimas estudadas. As quatro preparações enzimáticas tiveram suas atividades diminuídas em fluido de completação na temperatura de 65ºC, temperatura esta que não inativa as enzimas, sendo a causa da inibição decorrente apenas da presença do fluido de completação. Mesmo em fluido de completação a preparação enzimática Liquozyme apresentou as maiores atividades.

5.2 Efeito da temperatura e do fluido de completação na atividade amilolítica

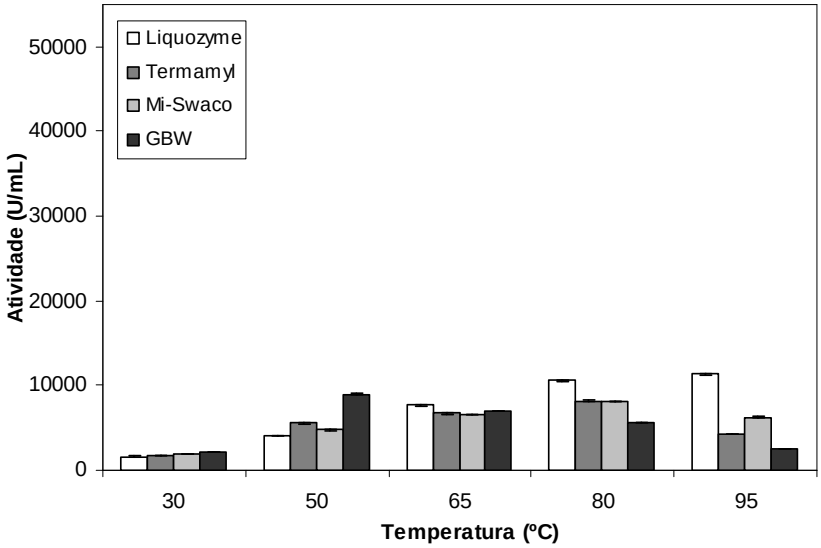
Os poços de petróleo geralmente operam em condições drásticas para as preparações enzimáticas, tais como alta temperatura, salinidade e pressão. Por isso, é importante verificar o efeito destes parâmetros nas enzimas estudadas, para avaliar a possibilidade de utilização destas para hidrólise do amido presente no reboco.

Os efeitos da temperatura e da alta salinidade na atividade amilolítica foram investigados em tampão fosfato e fluido de completação. As reações foram conduzidas a 30ºC, 50ºC, 65ºC, 80ºC e 95ºC, empregando amido a 1% (m/v).

Conforme mostrado na Figura 19, todas as preparações enzimáticas foram capazes de catalisar a hidrólise do amido em todas as temperaturas testadas, 65ºC, 80ºC e 95ºC, as quais são usualmente encontradas em poços de petróleo da Bacia de Campos (RJ). A α-amilase comercial Liquozyme é uma enzima termoestável e apresentou as maiores atividades na faixa de 65-90°C em tampão de fosfato. Na literatura (EZEIJI e BAHE, 2006; ASGHER *et al.*, 2007; LOPEZ *et al.*, 2006) é reportado que usualmente α-amilases microbianas, em especial as bacterianas, têm as maiores atividades na faixa de 60-80°C, em tampão fosfato.



(a) Tampão Fosfato



(b) Fluido de Completação

Figura 19. Efeito da temperatura e do fluido de completação na atividade das preparações enzimáticas comerciais. As reações foram realizadas empregando amido a 1% m/v, (a) em tampão fosfato de sódio (0,02 mol.L-1, pH 6,9 e 0,05 mol/L de NaCl) e (b) em fluido de completação.

Os valores de atividade amilolítica diminuíram significativamente na presença de fluido de completação para todas as preparações enzimáticas em todas as temperaturas estudadas (Figura 19b). Para a α-amilase comercial Liquozyme, o maior valor de atividade em fluido de completação foi observado a 95°C, sendo 77,1% inferior ao valor obtido em tampão fosfato. No entanto na indústria de petróleo, os fluidos de perfuração e as etapas de completação devem conter alta concentração salina e o NaCl é geralmente utilizado (KAMEDA *et al.*, 2007).

COBIANCO *et al.* (2007) verificaram que a atividade da α-amilase utilizada aumentou com o aumento da temperatura, com alta atividade próximo a 100°C. A enzima estudada apresentou ainda resistência ao sal utilizando cinco salmouras diferentes.

As quatro enzimas que utilizamos neste trabalho também apresentam resistência a alta concentração de sal, corroborando com os resultados apresentados na literatura.

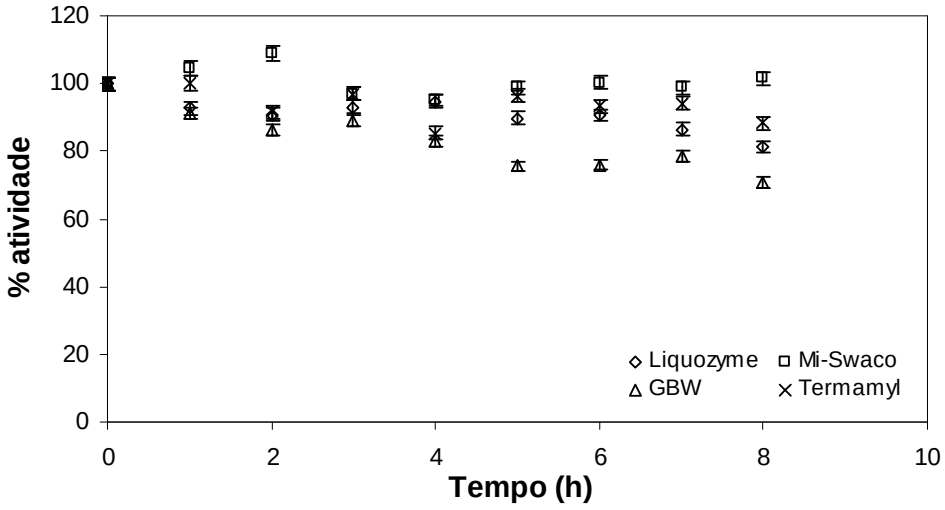
5.3 Efeito da temperatura e da salinidade na estabilidade das amilases

Como os poços geralmente operam em alta temperatura, a estabilidade térmica de preparações enzimáticas usadas para a remoção do reboco é um parâmetro importante.

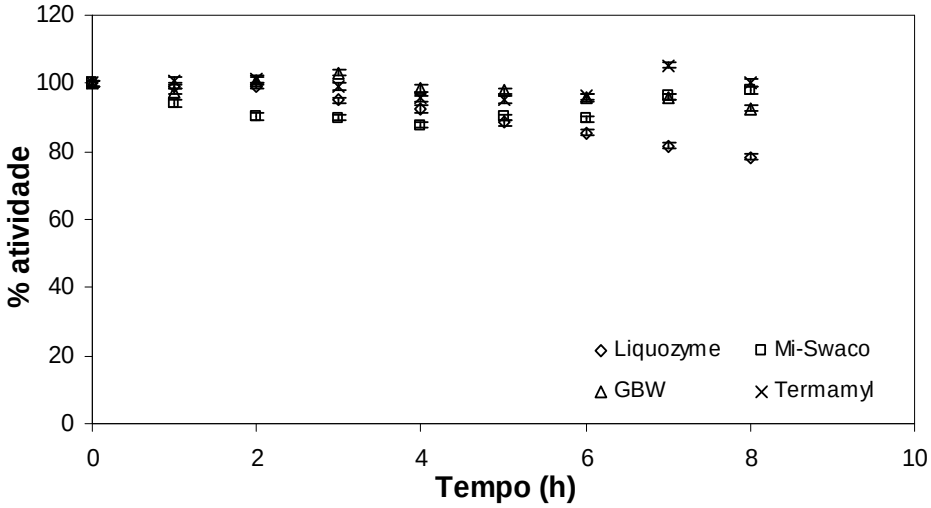
O efeito da temperatura e da alta concentração de sal foi investigado para a estabilidade de todos os preparados enzimáticos (Liquozyme, Termamyl, Mi-Swaco e GBW). As preparações enzimáticas foram incubadas em diferentes temperaturas (65, 80 e 95℃) na água ou na presença de fluido de completação por 8 horas, e, em

seguida, a atividade amilolítica residual foi determinada. A atividade residual da enzima foi expressa em porcentagem relativa de atividade inicial medida.

Conforme se pode observar na Figura 20, todas as preparações enzimáticas testadas permaneceram com mais de 70% de sua atividade inicial após 8 horas, nos experimentos controle (Figura 20a) e em fluido de completação (Figura 20b), a 65ºC.



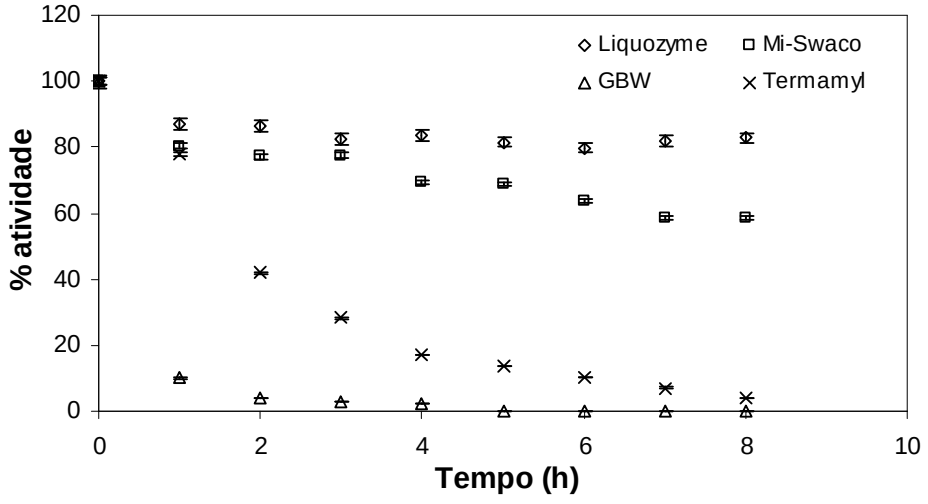
(a) Controle



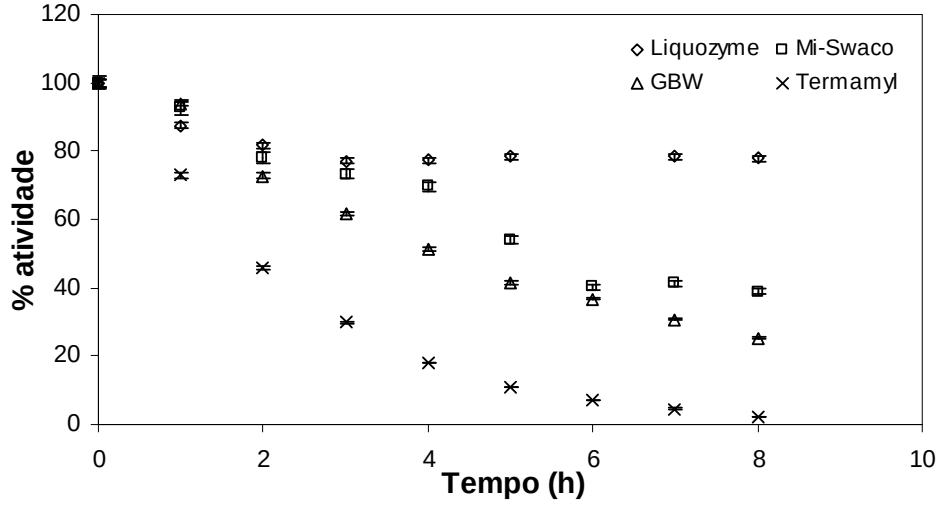
(b) Fluido de Completação

Figura 20. Estabilidade das quatro preparações enzimáticas comerciais a 65°C. (a) controle (H_2O) e (b) fluido de completação. ◊ Liquozyme, □ Mi-Swaco, △ GBW (KAMEDA, 2007) e x Termamyl (KAMEDA, 2007). A concentração das preparações enzimáticas foi de 1% v/v.

Nos experimentos controle realizados a 80ºC, a enzima Liquozyme manteve 80% da sua atividade inicial, o quebrador enzimático Mi-Swaco, 60% e a enzima Termamyl apenas 4% após oito horas de experimento. O quebrador comercial GBW não apresentou atividade amilolítica após cinco horas de experimento (Figura 21a). Em fluido de completação, após as oito horas, Liquozyme manteve 78% de atividade, Mi-Swaco 39%, GBW 25% e Termamyl apenas 2% (Figura 21b).



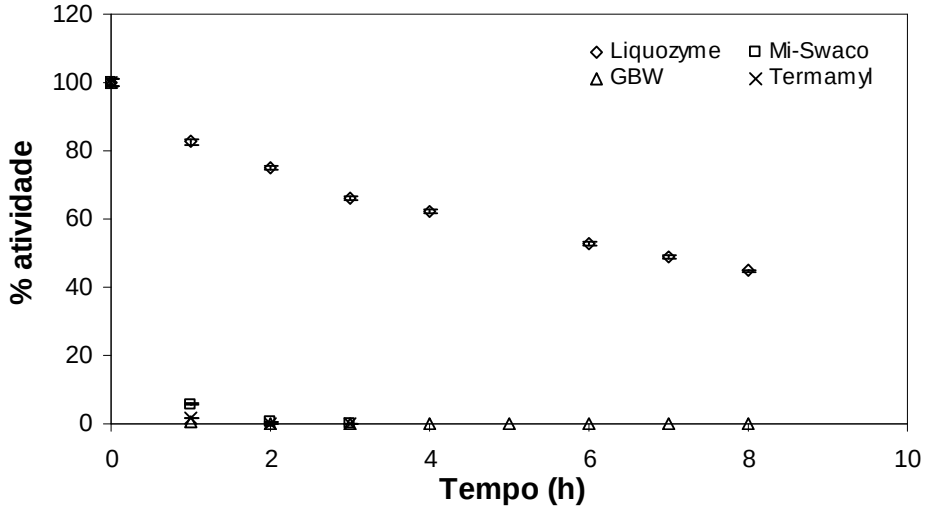
(a) Controle



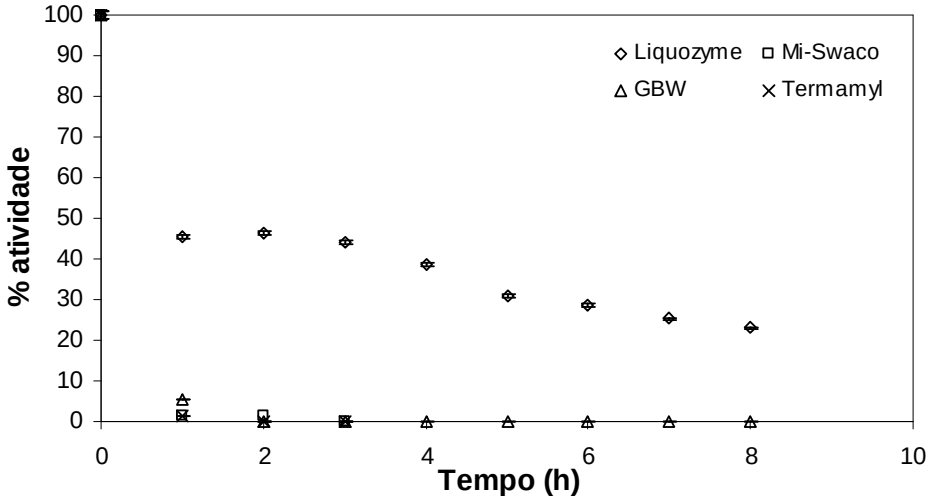
(b) Fluido de Completação

Figura 21. Estabilidade das quatro preparações enzimáticas comerciais a 80°C. (a) controle (H_2O) e (b) fluido de completação. ◊ Liquozyme, □ Mi-Swaco, △ GBW (KAMEDA, 2007) e x Termamyl (KAMEDA, 2007). A concentração das preparações enzimáticas foi de 1% v/v.

Nos experimentos controle realizados a 95ºC, a Liquozyme apresentou atividade residual de 45% após oito horas de experimento e as demais preparações enzimáticas não exibiram atividade após três horas de experimento (Figura 22a). Em fluido de completação, Liquozyme manteve 23% da sua atividade inicial após oito horas de experimento, enquanto que a atividade amilolítica das outras três preparações enzimáticas foi desprezível após duas horas (Figura 22b).



(a) Controle



(b) Fluido de Completação

Figura 22. Estabilidade das quatro preparações enzimáticas comerciais a 95°C. (a) controle (H_2O), (b) fluido de completação. ◊ Liquozyme, □ Mi-Swaco, △ GBW (KAMEDA, 2007) e x Termamyl (KAMEDA, 2007). A concentração das preparações enzimáticas foi de 1% v/v.

Na temperatura de 65℃ não foi verificada uma variação muito significativa da atividade residual para as quatro preparações enzimáticas estudadas, mas nas temperaturas de 80℃ e 95℃ pode-se verificar que a preparação enzimática que apresentou maiores atividades residuais foi a Liquozyme, sendo esta a única preparação enzimática que apresentou atividade residual após as 8 horas na temperatura de 95℃.

A preparação enzimática Liquozyme também apresentou as maiores atividades como descrito no item 5.2 e desta forma, foi considerada a preparação enzimática mais indicada para a remoção do reboco nos poços de petróleo.

Na Figura 23 são apresentadas as atividades da preparação enzimática Liquozyme após as 8 horas de experimento de estabilidade nas três temperaturas estudadas, em fluido de completação e no controle (H_2O). Pode-se verificar que a atividade da preparação Liquozyme após as 8 horas não varia significativamente nas temperaturas de 65℃ e 80℃, e nestas temperaturas há uma pequena variação entre a condição controle e os testes realizados em fluido de completação. Ou seja, em fluido de completação não há uma diminuição significativa da atividade residual. No entanto, na temperatura de 95℃, verifica-se uma diminuição significativa da atividade residual, sendo verificada uma maior diminuição nos experimentos em fluido de completação.

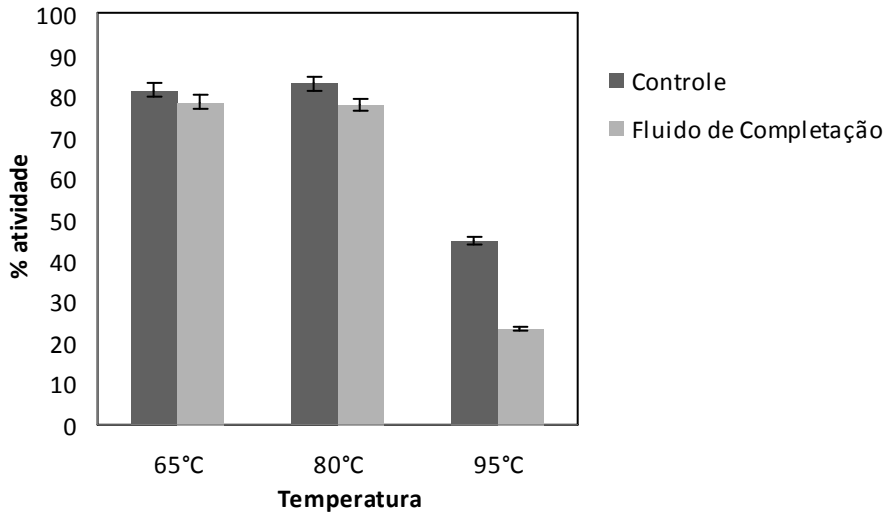


Figura 23. Estabilidade da preparação enzimática Liquozyme após 8h de reação nos experimentos controle (H_2O) e com o fluido de completação. A concentração da preparação enzimática foi de $5x10^{-3}$% v/v.

ASGHER *et al.* (2007) verificaram o efeito da temperatura (40-100^oC) na atividade amilolítica e na estabilidade da α-amilase termoestável de *Bacillus subtilis*. Os autores observaram que a atividade enzimática aumentou com a temperatura na faixa de 40-70^oC e uma redução na atividade enzimática foi verificada nas temperaturas acima de 70^oC. Na estabilidade a atividade residual foi de 100% com uma hora de incubação a 80^oC. Com 24h de incubação a 60^oC, a atividade residual foi de 68%.

ADEWALE *et al.* (2006) realizaram estudos do efeito da temperatura na estabilidade de três α-amilases diferentes e verificaram que, após uma hora a 80^oC, as preparações retiveram entre 15 e 25% da atividade inicial e a 100^oC apenas uma das α-amilases (*Sorghum bicolor*) estudadas possuiu atividade por 40 minutos.

As enzimas que estudamos apresentam atividade nas temperaturas de 80^oC e 95^oC superiores as atividades apresentadas a 65^oC. Com relação a estabilidade, após uma hora de incubação a 80^oC apresentam de 73 a 94% da atividade iniciale a

95 ^{o}C apenas a Liquozyme apresentou atividade após 8 horas apresentando 23% da atividade inicial.

AL-QODAH *et al.* (2007) também verificaram que a atividade enzimática aumentou com o aumento da temperatura até alcançar o máximo de atividade a 65°C, depois a atividade diminui até sua completa desativação a 100°C. Os mesmos autores estudaram a tolerância ao sal da α-amilase produzida pela *G. sterothermophilus* incubada com NaCl com concentrações de 1 a 5 M e os resultados demonstraram que a atividade enzimática diminui com o aumento da concentração de NaCl. Esta diminuição de atividade também foi verificada para as quatro enzimas que estudamos, com o aumento da concentração de NaCl, que ocorreu com a adição do fluido de completação.

5.4 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os resultados de estabilidade mostraram que as preparações enzimáticas estudadas são capazes de manter a atividade a 65 e 80℃. Assim, a determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ foi realizada nas temperaturas de 65 e 80℃ em tampão fosfato e em fluido de completação.

$V_{máx}$ é um parâmetro significativo na cinética enzimática, que representa a velocidade inicial máxima atingida quando praticamente todas as moléculas da enzima estão na forma complexo enzima-substrato. K_m é a concentração de substrato equivalente a uma velocidade (taxa) V_o, onde V_o é igual à metade de $V_{máx}$ (LEHNINGER, 2002).

Os resultados apresentados na Figura 24 indicam que as amilases comerciais comportam-se de acordo com a cinética de Michaelis-Menten em tampão fosfato, como encontrado na literatura (TOLEDO *et al.*, 2007; LI, *et al.* 2007; LOPEZ *et al.*,

2006; AGUILAR *et al.*, 2000) e em fluido de completação. O aumento da temperatura acarretou em um aumento da velocidade inicial de reação, conforme esperado. As preparações enzimáticas apresentaram um comportamento similar em fluido de completação para as duas temperaturas testadas.

As taxas iniciais de reação das amilases foram utilizadas para determinar os valores dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$) para as quatro preparações enzimáticas. Estes foram determinados utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

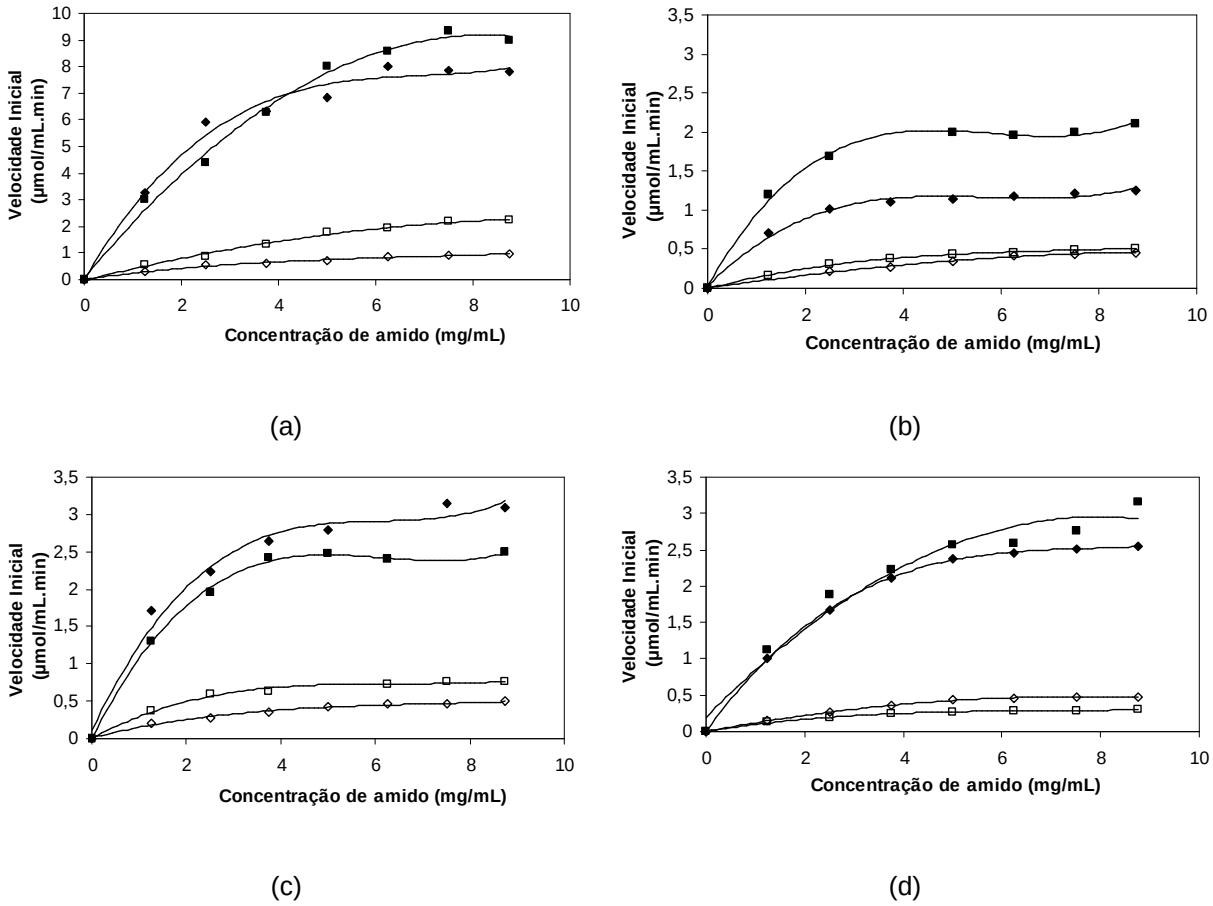


Figura 24. Gráfico Michaelis-Menten para as preparações enzimáticas (a) Liquozyme, (b) Termamyl (MESQUITA, 2010), (c) Mi-Swaco e (d) GBW (MESQUITA, 2010) em tampão à 65ºC (♦) e 80ºC (■) e em fluido de completação à 65ºC (◇) e 80ºC (□), utilizando o amido nas concentrações de 1,25; 2,50; 3,75; 5,00; 6,25; 7,50 e 8,75mg/mL.

Tabela 1. Parâmetros Cinéticos (K_m e $V_{máx}$) para as preparações enzimáticas Liquozyme, Termamyl (MESQUITA, 2010), Mi-Swaco e GBW (MESQUITA, 2010) a 65 e 80ºC, em tampão fosfato e fluido de completação.

	Temperatura (ºC)	**Meio**	**K_m (mg/mL)**	**$V_{máx}$ (µmol/mL.min)**	**R^2**
Liquozyme	65ºC	Tampão	2,96	11,07	0,99
		Fluido	5,47	1,55	0,99
	80ºC	Tampão	5,18	15,01	0,98
		Fluido	9,42	4,67	0,99
Termamyl	65ºC	Tampão	1,26	1,45	0,98
		Fluido	8,50	0,93	0,99
	80ºC	Tampão	1,24	2,41	0,98
		Fluido	5,70	0,91	0,99
Mi-Swaco	65ºC	Tampão	1,41	3,61	0,97
		Fluido	2,39	0,62	0,99
	80ºC	Tampão	1,79	3,25	0,98
		Fluido	1,99	0,97	0,99
GBW	65ºC	Tampão	3,36	3,80	0,99
		Fluido	6,54	0,94	0,99
	80ºC	Tampão	3,42	4,23	0,99
		Fluido	2,75	0,41	0,99

Como é demonstrado na literatura todas as enzimas α-amylases estudadas apresentaram o mesmo resultado. A $V_{máx}$ na presença do inibidor é menor do que na sua ausência e as enzimas apresentaram o K_m na presença do inibidor maior do que

na sua ausência (NELSON, 2002; SEGEL, 1975; CHETAN, 2008; MOREAUA, 2001).

Elevados valores de $V_{máx}$ e baixos valores de K_m indicam a eficiência de uma enzima em uma dada reação. Na presença do fluido de completação é observado o contrário, indicando que o fluido está provocando algum tipo de inibição nas preparações enzimáticas estudadas.

5.5 Efeito dos componentes do fluido de completação na atividade enzimática

De acordo com os resultados apresentados na Figura 19b, verificou-se uma queda acentuada da atividade amilolítica das quatro preparações enzimáticas (Liquozyme, Termamyl, Mi-Swaco e GBW) na presença de fluido de completação.

Com o propósito de verificar os principais responsáveis pela diminuição da atividade enzimática nesse experimento, foram realizadas reações de hidrólise do amido (1% m/v) na presença dos principais componentes do fluido de completação: cloreto de sódio (204 g/L), bissulfito de sódio (0,2 g/L) e ultrawet (3 ml/L) a 65ºC. Também foi realizada uma reação de hidrólise do amido empregando tampão fosfato (0,02 mol/L), ensaio de controle, e no fluido de completação.

As reações foram conduzidas a 65ºC para evitar a desnaturação térmica das amilases. Os resultados dos ensaios de inibição estão apresentados na Figura 25. Pode-se observar que os perfis reacionais são semelhantes para as quatro amilases testadas (Liquozyme, Termamyl, Mi-Swaco e GBW) na presença dos principais componentes do fluido de completação e do próprio fluido de completação.

O componente que exerceu a maior diminuição na produção de açúcares redutores gerados na hidrólise enzimática do amido foi o NaCl. Cabe ressaltar a elevada concentração desse componente (204 g/L) no fluido de completação, acarretando em valores elevados de força iônica (CAENN e CHILLINGAR, 1996). As curvas obtidas nas reações com NaCl (204 g/L) e com o fluido de completação foram semelhantes para as quatro preparações testadas.

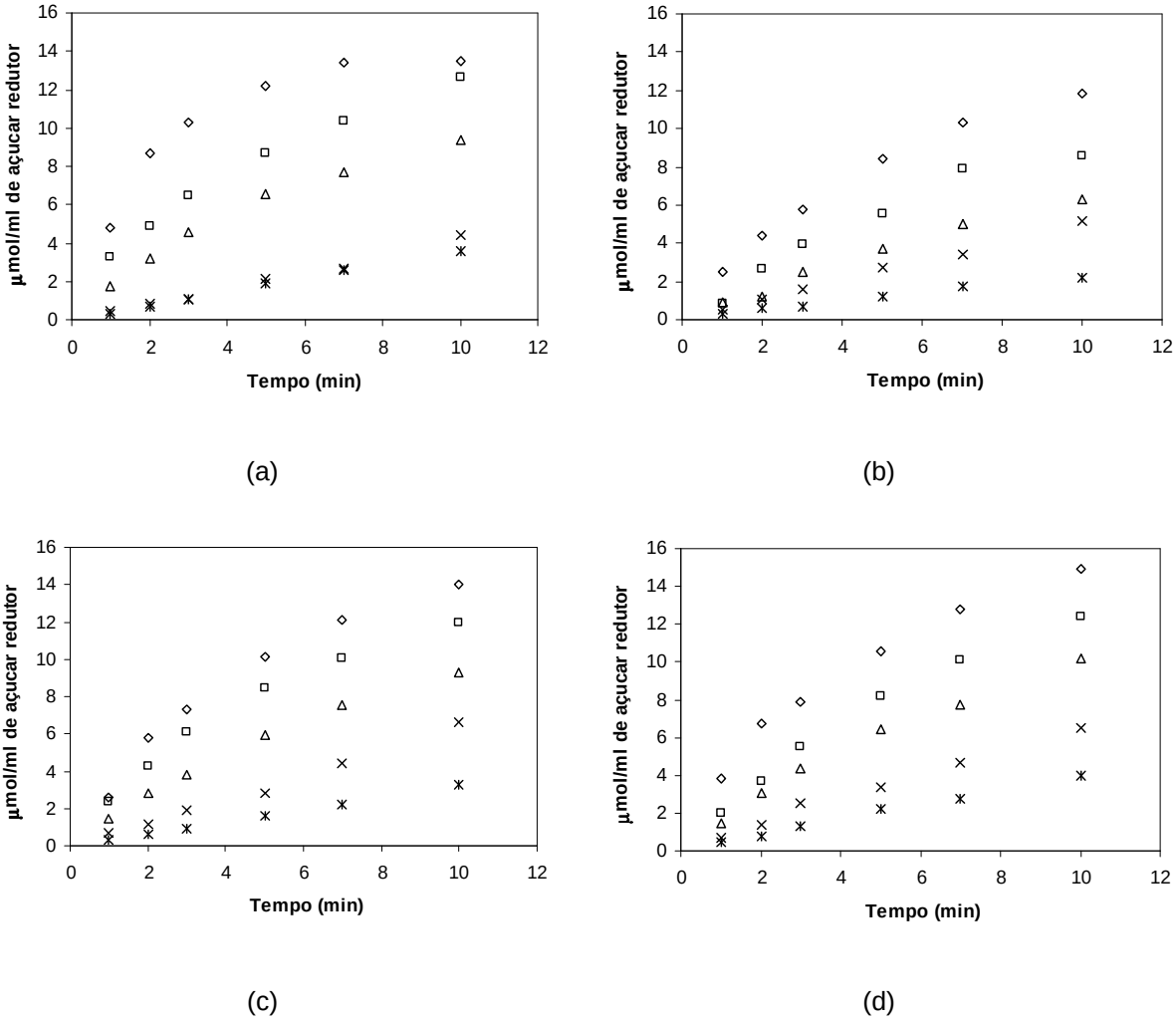


Figura 25. Efeito dos componentes do fluido de completação na reação de hidrólise do amido empregando as amilases (a) Liquozyme, (b) Termamyl, (c) Mi-Swaco e (d) GBW na concentração de $5x10^{-3}$% (v/v). As reações foram conduzidas a 65ºC, empregando amido a 1% m/v. (▽) tampão fosfato 0,02 mol/L (controle), (□) bissulfito de sódio (0,2 g/L), (○) ultrawet (0,3 % v/v), (△) cloreto de sódio (204 g/L) e (◇) fluido de completação.

A presença de bissulfito de sódio e de Ultrawet também provocou significante diminuição na atividade enzimática. Considerando o resultado em tampão fosfato, após 10 minutos de reação, todas as preparações enzimáticas apresentaram um resultado similar. Todos os valores referentes a Figura 25 estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Efeitos dos componentes dos fluidos de completação nas preparações enzimáticas Liquozyme, Termamyl, Mi-Swaco e GBW a 65ºC.

	% de redução da concentração de açúcares redutores			
	$NaHSO_3$	*Ultrawet*	NaCl	Fluido de completação
Liquozyme	18,28	42,64	72,76	73,19
Termamyl	27,14	46,57	56,32	81,26
Mi-Swaco	10,28	33,07	52,22	63,06
GBW	16,91	31,95	56,40	73,41

5.6 Determinação dos parâmetros cinéticos na presença de inibidor

Considerando os resultados apresentados na Figura 25, o NaCl foi o componente do fluido de completação que provocou a maior inibição para todas as amilases comerciais testadas. Assim, experimentos foram conduzidos a 65℃ com três diferentes concentrações do inibidor: 0%, 50% (102 g/L) e 100% (204 g/L), no fluido de completação contendo $NaHSO_3$ (0,14 g/L) e Ultrawet (0,3% v/v) a fim de determinar o tipo de inibição enzimática provocada por este sal. As taxas iniciais das

reações foram determinadas em diferentes concentrações de amido (1,25; 2,50; 3,75; 5,00; 6,25; 7,50 e 8,75 mg/mL).

De acordo com a Figura 26, a inibição provocada pelo NaCl parece ser do tipo mista não competitiva. Neste tipo de inibição o inibidor não afeta a ligação do substrato e vice-versa. O inibidor (I) e o substrato (S) se ligam de forma reversível, randômica e independente em diferentes sítios da enzima (E). Sendo assim, o inibidor se liga à enzima e ao complexo ES, o substrato se liga à enzima e ao complexo EI. Entretanto, o resultante complexo ESI é inativo. Consequentemente, a $V_{máx}$ na presença de inibidor será menor do que na sua ausência e o K_m na presença de inibidor será maior do que na sua ausência (NELSON e COX, 2002; SEGEL, 1993; CHETAN *et al.*, 2008; MOREAUA *et al.*, 2001), como apresentado pelos valores de K_m e $V_{máx}$ determinados para as preparações enzimáticas (Tabela 3).

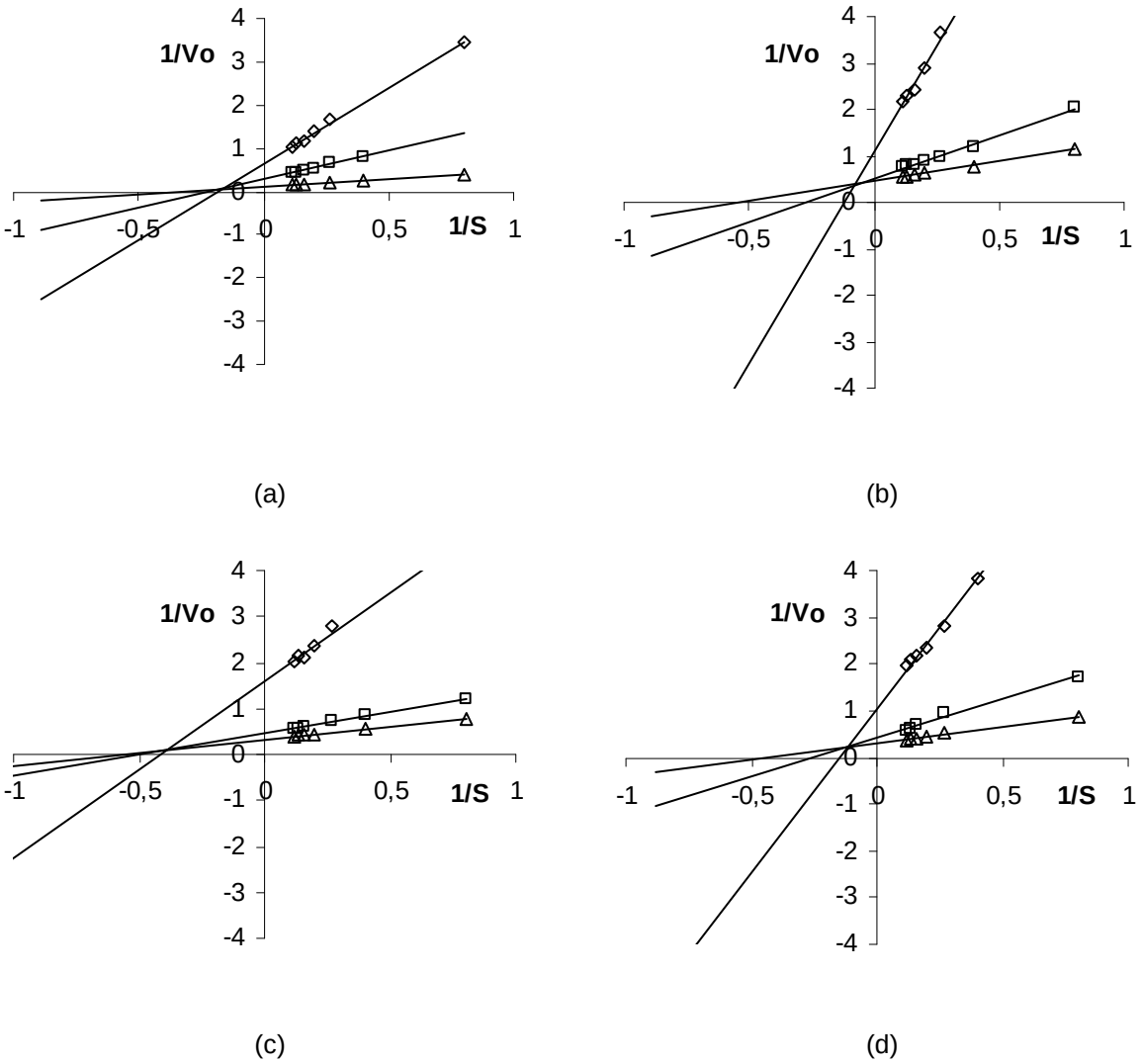


Figura 26. Gráfico de Lineweaver-Burk na presença de inibidor (NaCl). (a) Liquozyme, (b) Termamyl, (c) Mi-Swaco e (d) GBW. As reações foram conduzidas a 65ºC, em diferentes concentrações de amido de 1,25; 2,5; 3,75; 5; 6,25; 7,5 e 8,75mg/mL e com concentrações de inibidor de 0% (△), 50% (102 g/L) (□) e 100% (204 g/L) (◇).

Tabela 3. Valores de K_m e $V_{máx}$ determinados utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk.

	[NaCL]	K_m (mg/mL)	$V_{máx}$ (µmol/mL.min)	R^2
Liquozyme	**100%**	5,47	1,55	0,99
	50%	2,97	2,97	0,98
	0%	3,28	9,09	0,99
Termamyl	**100%**	8,50	0,93	0,99
	50%	3,62	1,93	0,99
	0%	1,87	2,20	0,99
Mi-Swaco	**100%**	2,40	0,62	0,99
	50%	2,01	2,17	0,99
	0%	1,78	3,08	0,99
GBW	**100%**	6,58	0,94	0,99
	50%	4,05	2,44	0,99
	0%	2,33	3,29	0,99

5.7 Determinação da Força Iônica

A determinação da força iônica é uma medida importante devido a alta concentração de sais presente no fluido de completação utilizado neste trabalho. Está descrito na literatura que a atividade enzimática é afetada negativamente pela alta força iônica (PIERANGELI *et al.*, 2001).

Verificando que a maior inibição, ou seja, menor produção de açúcares redutores ocorreu quando a enzima foi analisada na presença do componente NaCl, realizou-se um estudo com o fluoreto de potássio (KF) que, assim como o NaCl, é um sal neutro e monovalente, para verificar se a inibição era resultado da interação dos íons Na^+ e Cl^- com a enzima ou se resultado da elevada força iônica provoca por sua alta concentração no fluido de completação. Utilizando então a mesma concentração molar de 3,5 mol/L, obtivemos valores de força iônica muito próximos para ambos os sais (Tabela 4) e com isso processos de inibição similares, como apresentado na Figura 27.

A causa da inibição das preparações enzimáticas provocada pelo NaCl está na verdade relacionada com a alta concentração de sais no fluido de completação que acarreta em uma alta força iônica (ALOITAIBI *et al.*, 2010) e esta provocaria a inibição. A alta força iônica é um potencial causador da inibição da atividade das α-amilases estudadas, pois a alta concentração de sais pode provocar o efeito *salting-out* na enzima e consequentemente sua inativação.

Tabela 4. Tabela de valores de Condutividade e Força Iônica dos Componentes do Fluido e do Fluoreto de Potássio.

Componentes	Condutividade (dS/m)	Força Iônica (mol/L)
Fluido de Completação	207	2,691
NaCl (3,5mol/L)	209	2,717
KF (3,5mol/L)	152,5	1,982
$NaHSO_3$ (0,2g/L)	0,435	0,006
Ultrawet (0,3%)	0,047	0,0006

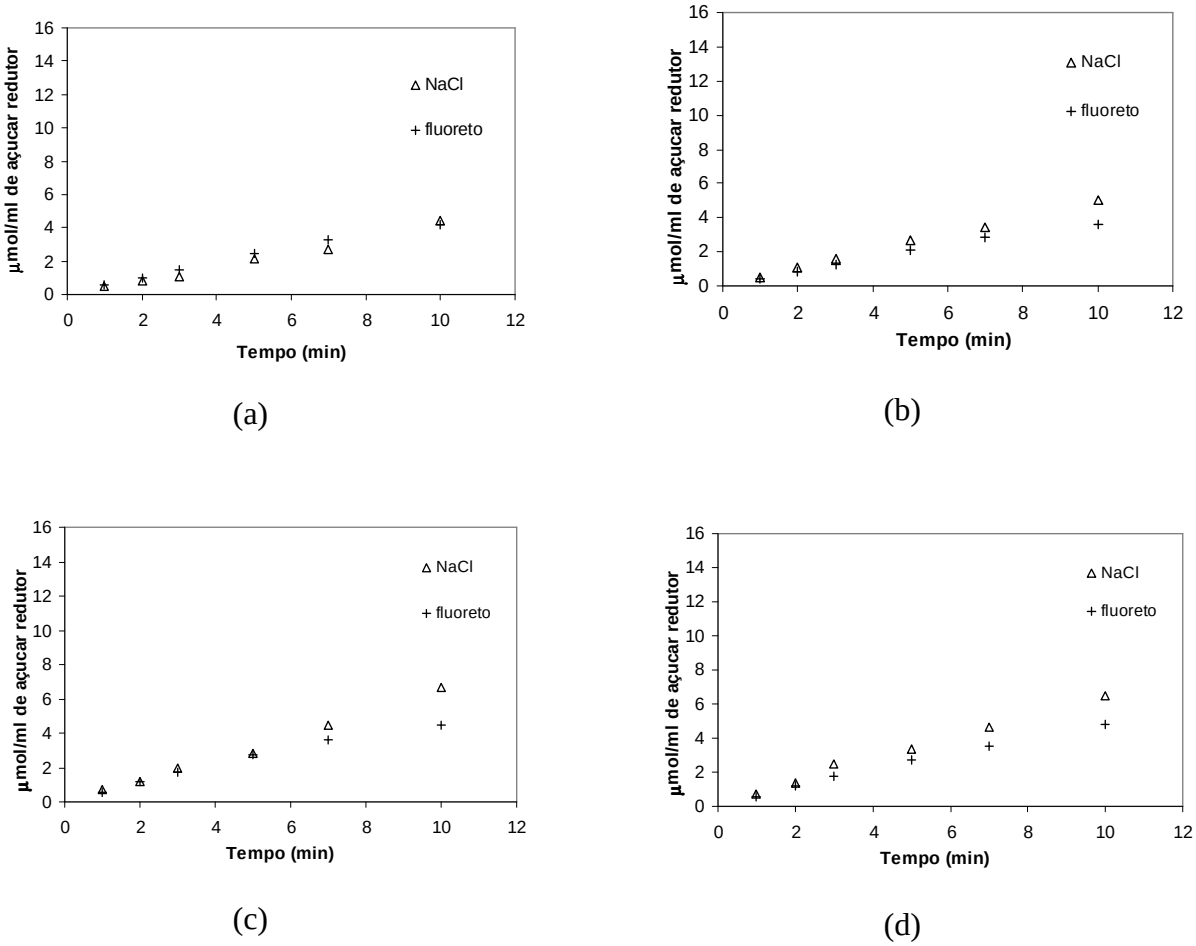


Figura 27. Comparação dos efeitos do NaCl (3,5 mol/L) e do Fluoreto de potássio (3,5 mol/L) empregando as preparações enzimáticas Liquozyme (a), Termamyl (b), Mi-Swaco (c) e GBW (d) na concentração de $5x10^{-3}$% (v/v). As reações foram conduzidas a 65ºC, empregando amido a 1% m/v. (△) cloreto de sódio (204 g/L) e (+) fluoreto de potássio.

5.8. Pressão

Outra variável importante a ser analisada visando o emprego de enzimas para remoção de reboco em poços de perfuração de petróleo é a pressão, pois tem sido reconhecida como um potencial agente desnaturante de proteínas. A faixa de pressão na qual as proteínas sofrem desnaturação varia de acordo com suas características estruturais. No entanto, na literatura já existem estudos que apontam

para um aumento da estabilidade térmica das enzimas em maiores pressões (BOONYARATANAKORNKIT *et al.*, 2002; FUKUDA e KUNUGI, 1984).

Os diferenciais de pressão aplicados neste trabalho foram 100, 500 e 1000 psi, por serem frequentemente relatados na literatura como os encontrados durante atividades de completação de poços (SIDDIQUI *et al.*, 2006; NASR-EL-DIN *et al.*, 2006; BATISTEL *et al.*, 2005; BAST *et al.,* 2000; HANSSEN e JIANG, 1999; BEALL *et al.*, 1996; HARRIS e PENNY, 1989; NYLAND *et al.*, 1988).

5.8.1. Efeito da velocidade de agitação no Reator Parr

Os experimentos foram realizados com amido a 1% (m/v), a 65°C utilizando a preparação enzimática Liquozyme a 5x10^{-3}% (v/v), a 100 psi, em tampão fosfato (0,02 mol/L^{-1}, pH 6,9)

Como os experimentos para verificar os efeitos da pressão na atividade e estabilidade das amilases comerciais seriam realizados no Reator Parr, foram primeiramente realizados ensaios com quatro velocidades de agitação (50, 100, 150 e 200 rpm) e sem agitação, visto que nos poços de petróleo perfurados não há agitação, pois ocorre o fechamento dos espaço do poço perfurado não ocorrendo agitação ou cisalhamento. Estes ensaios foram realizados para verificar se o sistema se mantém homogêneo durante o tempo de reação. Os experimentos foram realizados com amido a 1% (m/v) a 65ºC utilizando a preparação enzimática Liquozyme a 5x10^{-3}%, a 100 psi em tampão fosfato (0.02 mol.L^{-1}, pH 6,9).

De acordo com a Figura 28, o aumento da agitação não provocou variação significativa na concentração de açúcar redutor produzido, indicando homogeneidade do meio. De acordo com estes resultados, todas as reações subsequentes realizadas no Reator Parr foram conduzidas sem agitação, sendo

realizada apenas uma agitação inicial de 30 segundos para garantir a homogeneização do meio reacional.

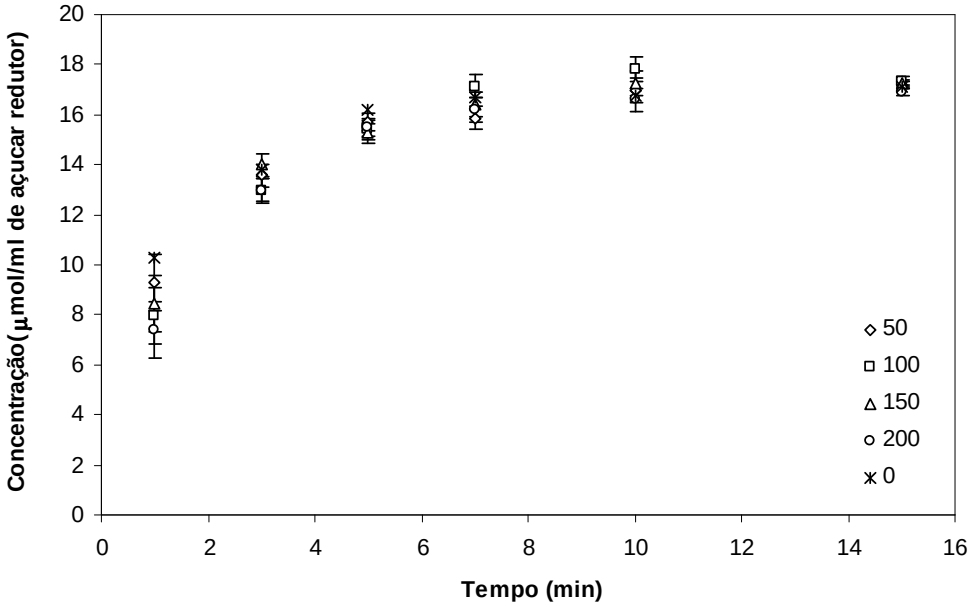


Figura 28. Influência da agitação (rpm) na produção de açúcar redutor resultante da hidrólise do amido pela ação da amilase comercial Liquozyme. As reações foram realizadas a 65ºC, empregando 1% m/v de amido, na pressão de 100 psi, em tampão fosfato (0.02 mol.L^{-1}, pH 6.9), com a enzima a 1%. × 0, ◊ 50, ▫ 100, ▵ 150, ○ 200 rpm.

5.8.2. Efeito da pressão na atividade das amilases

O efeito da pressão na atividade amilolítica foi investigado realizando reações de hidrólise do amido a 65ºC, 80ºC e 95ºC, em três pressões: 100, 500 e 1000 psi, em tampão fosfato (0.02 mol.L^{-1}, pH 6.9) e em fluido de completação (204 g/L NaCl).

A avaliação dos resultados apresentados nas Figuras 29, 30, 31 e 32 (a1, b1 e c1) indica que a pressão não exerce influência significativa na atividade das

amilases testadas, nas pressões de 100, 500 e 1000 psi para as três temperaturas estudadas (65, 80 e 95ºC) em tampão fosfato (sistema controle).

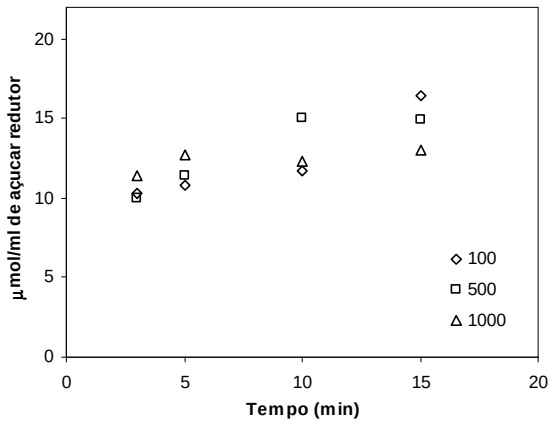
A influência combinada da pressão, da temperatura e da alta salinidade (fluido de completação) resulta em uma diminuição da produção de açúcares redutores para as quatro amilases comerciais em estudo (Figuras 29, 30, 31 e 32; a2, b2 e c2), quando comparadas com as mesmas temperaturas em tampão.

Assim, a pressão não exerceu variação nas atividades das enzimas, sendo as diferenças encontradas resultado do aumento da temperatura e da salinidade. Este resultado indica que o diferencial de pressão encontrado nos poços de perfuração não representaria um problema na utilização dessas enzimas para a remoção do reboco.

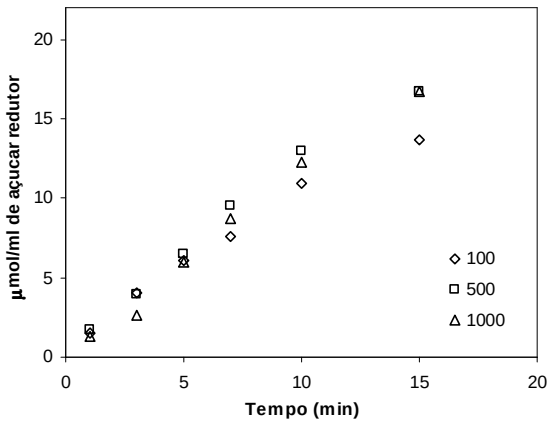
Em relação à enzima Liquozyme (Figura 29), pode-se observar que a taxa inicial da reação de hidrólise do amido foi sempre menor na presença do fluido de completação, em relação ao sistema controle. No entanto, após 15 minutos de reação, a concentração de açúcares redutores foi similar para todas as pressões e temperaturas testadas. Assim, apesar da inibição provocada pelo fluido de completação, essa enzima pode ser usada com a mesma eficiência, desde que tempos reacionais maiores sejam empregados. Perfis semelhantes a esse foram observados para as outras amilases testadas.

Gomes *et al.* (1998) não observaram variação na atividade amilolítica até a pressão de 300 MPa, obtendo um aumento da atividade da amilase na degradação do amido em pressões entre 400 e 600 MPa (1000 psi equivale a 6,9 MPa), sendo estas pressões trabalhadas muito superiores as encontradas em poços de petróleo e também muito superiores as estudadas no presente trabalho, com este resultado

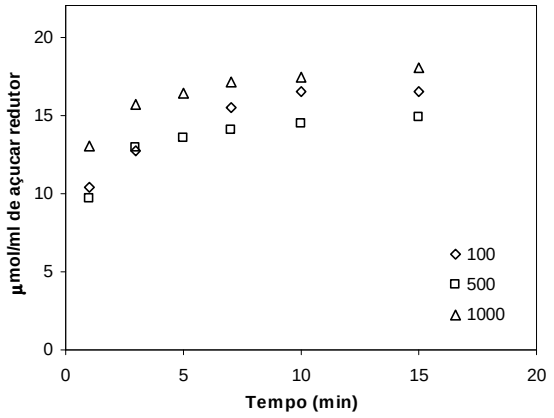
presente na literatura é possível entender o fato de não termos encontrado valores muito diferentes de atividade com o aumento da pressão trabalhada.



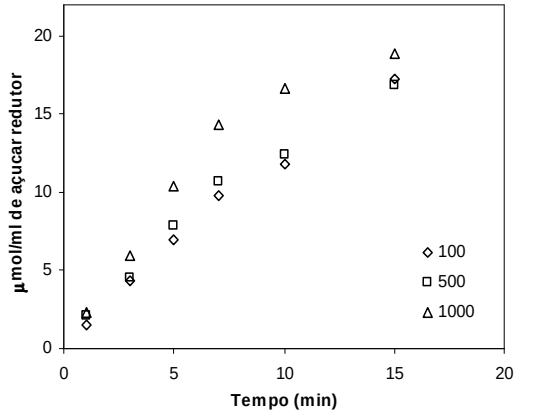
a1) 65ºC



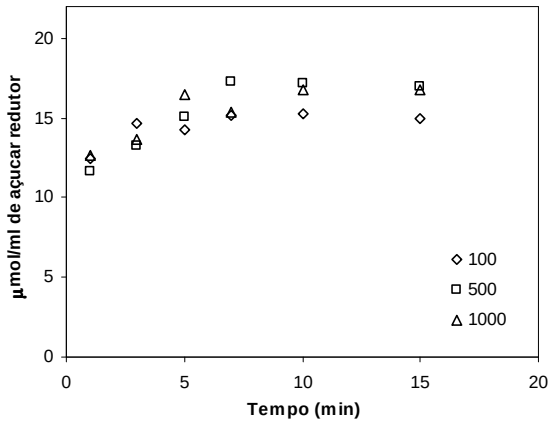
a2) 65°C



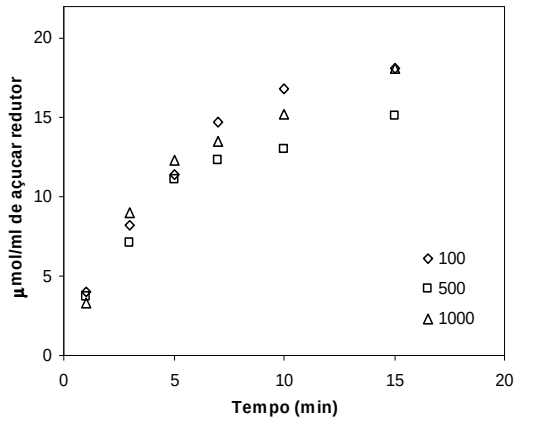
b1) 80°C



b2) 80°C

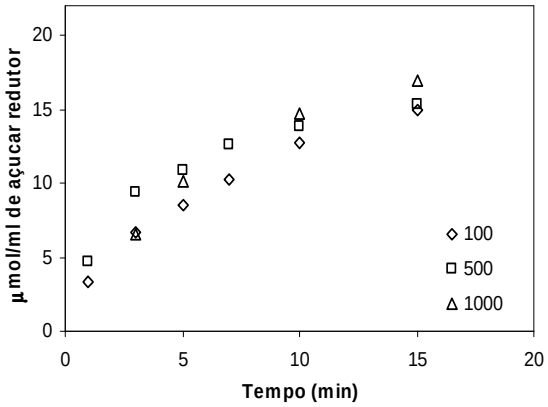


c1) 95°C

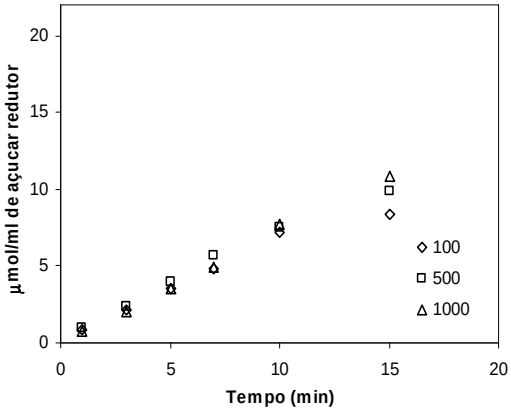


c2) 95°C

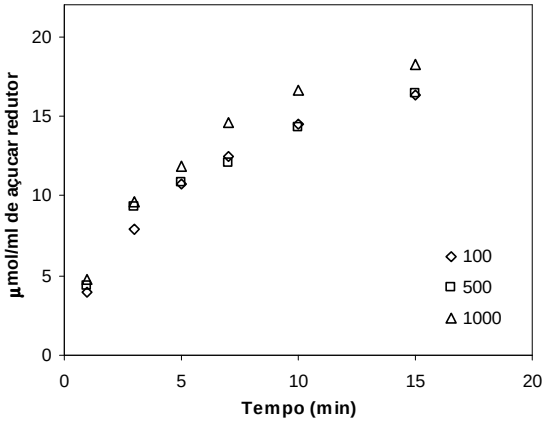
Figura 29. Efeito da pressão na atividade amilolítica da Liquozyme. As reações foram realizadas a (a) 65ºC, (b) 80ºC e (c) 95ºC, empregando 1% m/v de amido, nas pressões de 100, 500 e 1000 psi, em tampão (a1, b1, c1) e em fluido de completação (a2, b2, c2).



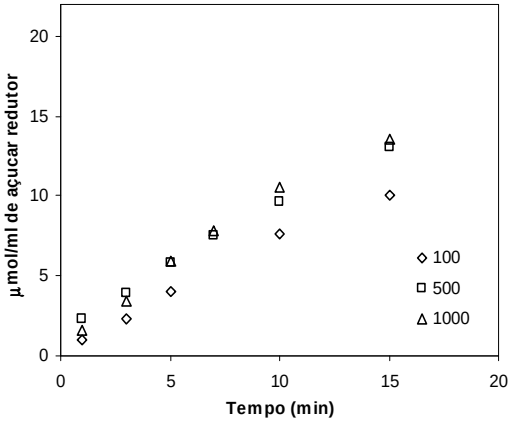
a1) 65ºC



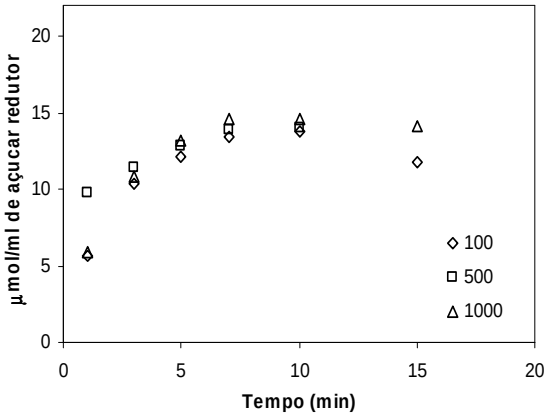
a2) 65°C



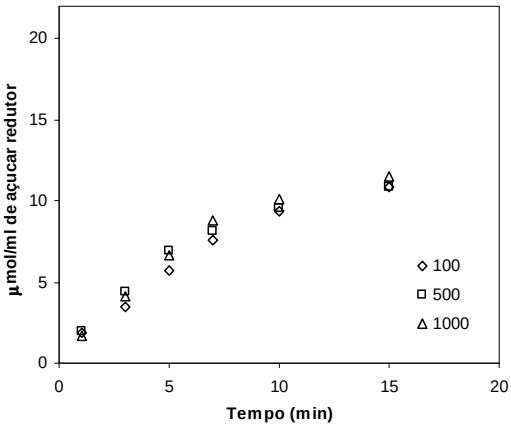
b1) 80°C



b2) 80°C

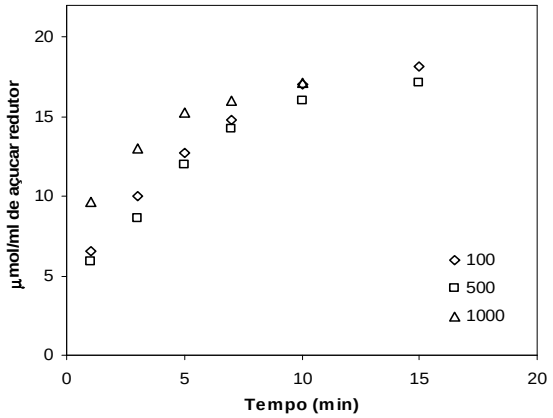


c1) 95°C

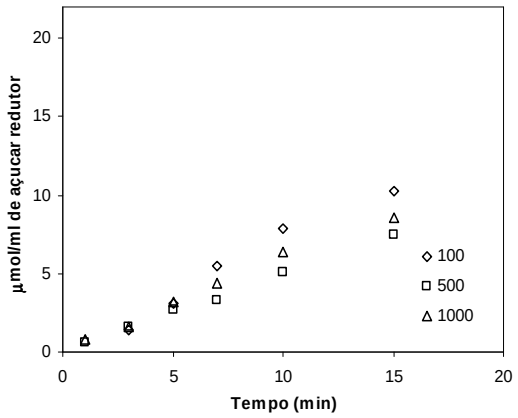


c2) 95°C

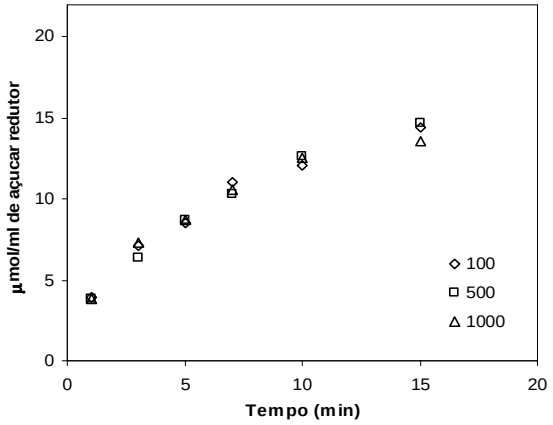
Figura 30. Efeito da pressão na atividade amilolítica da Termamyl. As reações foram realizadas a (a) 65ºC, (b) 80ºC e (c) 95ºC, empregando 1% m/v de amido, nas pressões de 100, 500 e 1000 psi, em tampão (a1, b1, c1) e em fluido de completação (a2, b2, c2).



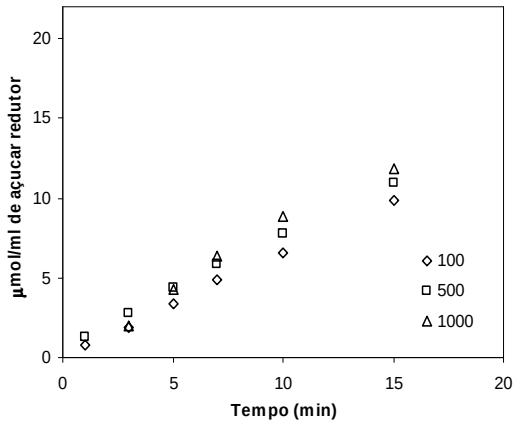
a1) 65ºC



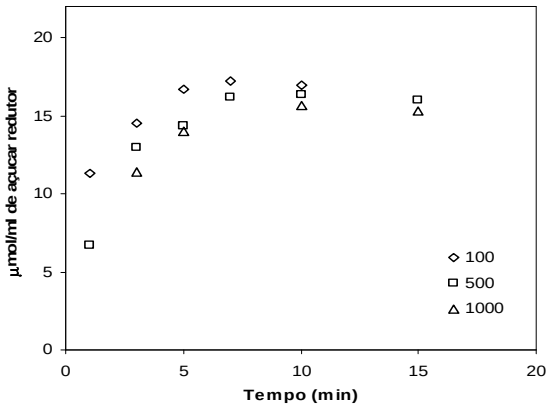
a2) 65°C



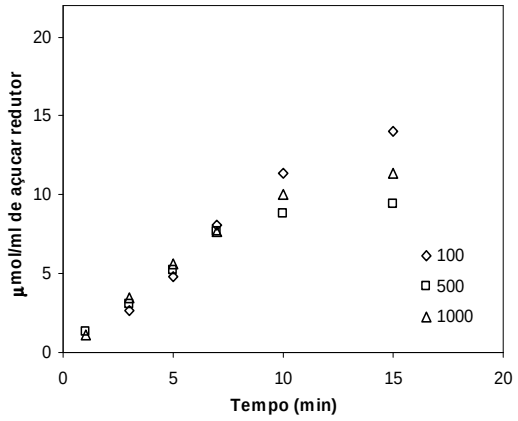
b1) 80°C



b2) 80°C

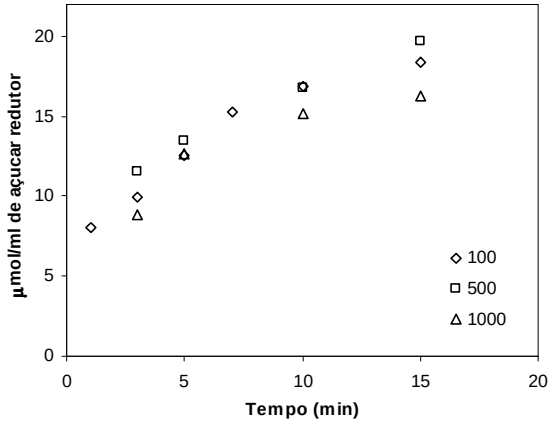


c1) 95°C

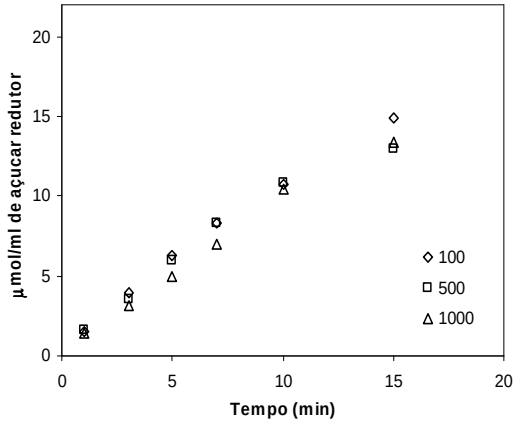


c2) 95°C

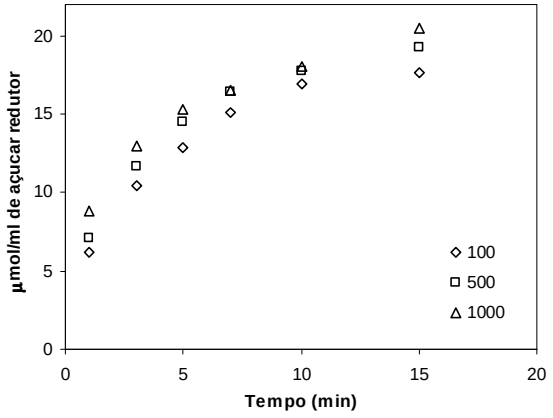
Figura 31. Efeito da pressão na atividade amilolítica da Mi-Swaco. As reações foram realizadas a (a) 65ºC, (b) 80ºC e (c) 95ºC, empregando 1% m/v de amido, nas pressões de 100, 500 e 1000 psi, em tampão (a1, b1, c1) e em fluido de completação (a2, b2, c2).



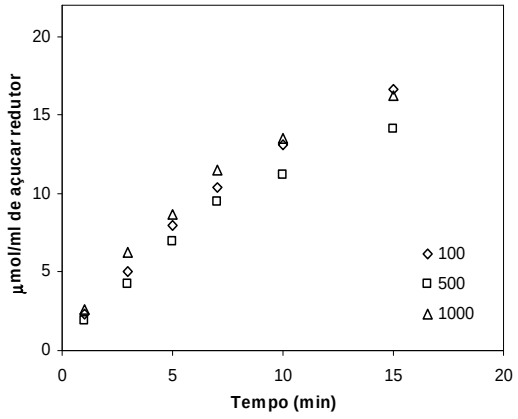
a1) 65ºC



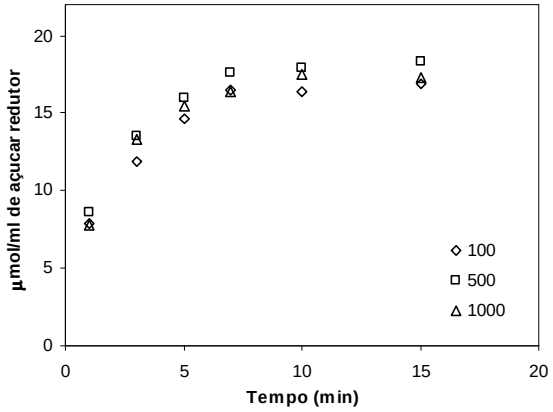
a2) 65°C



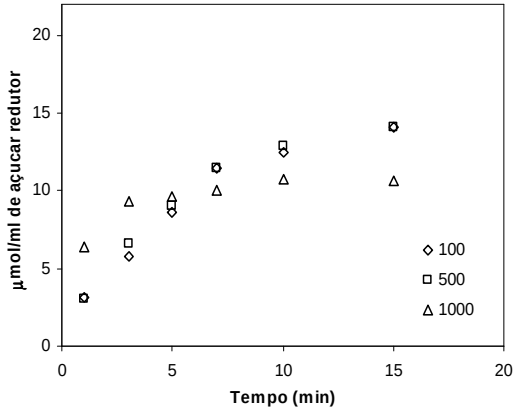
b1) 80°C



b2) 80°C



c1) 95°C



c2) 95°C

Figura 32. Efeito da pressão na atividade amilolítica da Termamyl. As reações foram realizadas a (a) 65ºC, (b) 80ºC e (c) 95ºC, empregando 1% m/v de amido, nas pressões de 100, 500 e 1000 psi, em tampão (a1, b1, c1) e em fluido de completação (a2, b2, c2).

5.8.3. Efeito da pressão na estabilidade das amilases

A temperatura, pressão e salinidade são os fatores mais importantes para serem estudados na estabilidade enzimática em operações de completação de poços de petróleo. Desta forma, também foi objetivo, neste trabalho, estudar os efeitos dessas variáveis em conjunto na estabilidade das preparações enzimáticas.

O efeito da pressão na estabilidade foi investigado mantendo as preparações enzimáticas a 65ºC, 80ºC e 95ºC, nas três pressões estudadas 100, 500 e 1000 psi, em fluido de completação (204 g/L de NaCl) e em água (controle). A concentração da preparação enzimática foi de $5x10^{-3}$ (v/v). A preparação foi diluída na água ou no fluido de completação e mantida na temperatura e na pressão determinadas por 8 horas. A atividade residual da amilase determinada em intervalos de uma hora. A atividade da enzima foi expressa em percentagem relativa da atividade inicial.

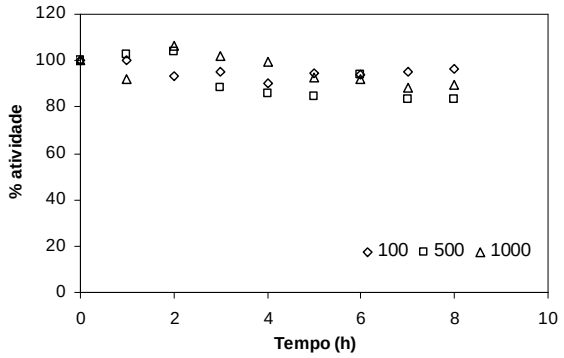
A Figura 33 apresenta os resultados obtidos da influência combinada de pressão e temperatura na estabilidade da α-amilase comercial Liquozyme ao longo de 8 horas de ensaio controle (a1, b1, c1) e com o fluido de completação (a2, b2, c2).

De acordo com a Figura 33a1, a α-amilase comercial Liquozyme não apresentou uma diferença significativa na atividade residual para as três pressões (100, 500 e 1000 psi) a 65°C. Após 8 horas, a enzima manteve 83% da atividade inicial. Em fluido de completação (Figura 33a2), após 8 horas de ensaio, a enzima manteve cerca de 82% da sua atividade inicial.

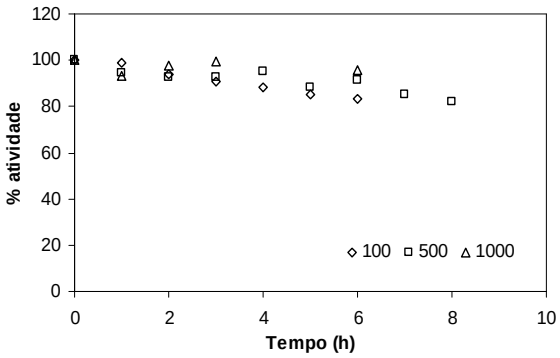
Na temperatura de 80ºC (Figura 33b1) também não foi observada diferença significativa na atividade residual para as três pressões estudadas (100, 500 e 1000

psi), uma atividade residual de 67% após 8 horas de incubação foi observada nos ensaios controle próxima a 62%, nos experimentos empregando fluido de completação no mesmo intervalo de tempo (Figura 33b2).

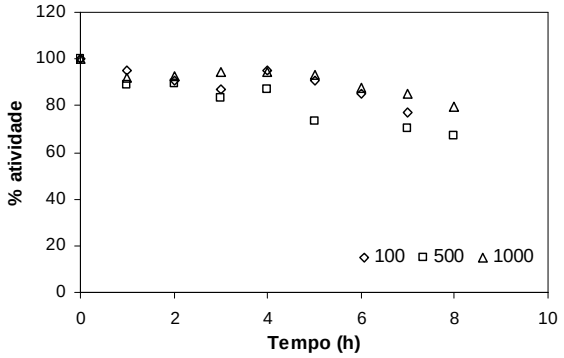
A 95ºC, os perfis de atividade em todas as pressões também foram muito semelhantes, apresentando declínio em sua atividade decorrente da alta temperatura (Figura 33c1). Após 8 horas, a atividade residual não apresentou valores muito diferentes para as três pressões 100, 500 e 1000psi, estando acima de 14%. Em fluido de completação, a enzima Liquozyme apresentou uma atividade residual próxima a 2% após 8 horas (Figura 33c2).



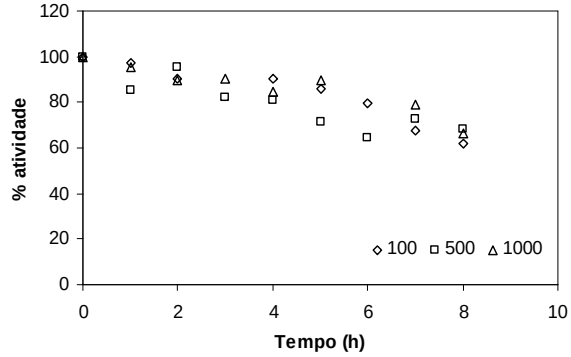
a1) 65ºC



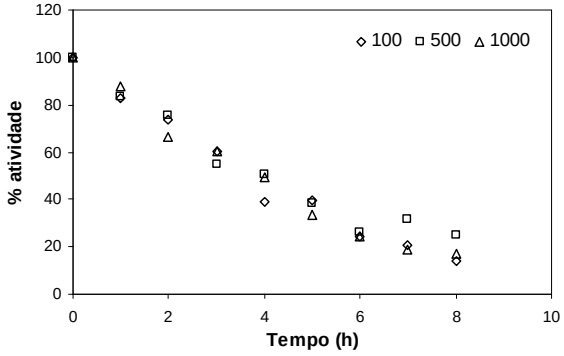
a2) 65°C



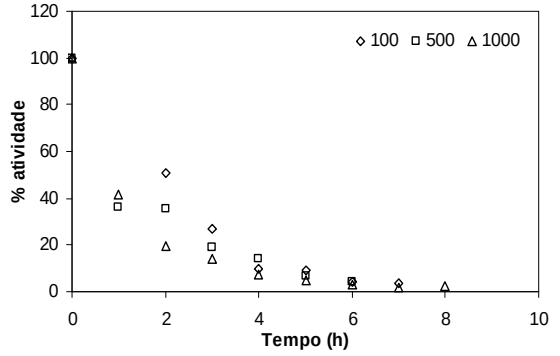
b1) 80°C



b2) 80°C



c1) 95°C



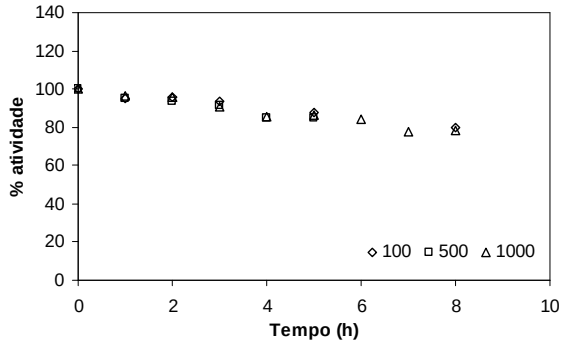
c2) 95°C

Figura 33. Efeito da pressão e da temperatura na estabilidade da α-amilase comercial Liquozyme (1% v/v) (a) 65°C, (b) 80°C e (c) 95°C, sob pressões de 100, 500 e 1000psi, em controle (a1,b1,c1) e em fluido de completação (a2,b2,c2).

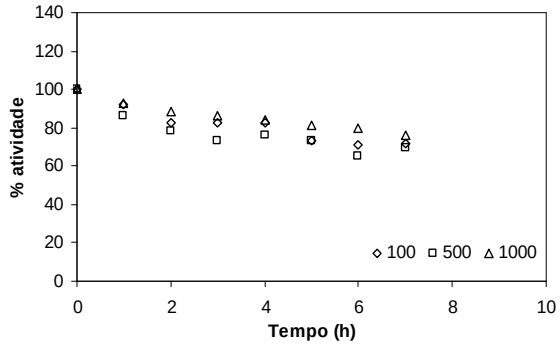
De acordo com a Figura 34a1, a preparação Termamyl também não apresentou uma diferença significativa na atividade residual para as três pressões estudadas (100, 500 e 1000 psi) a 65°C. Após 8 horas, a enzima apresentou 78% da atividade inicial. Com o fluido de completação (Figura 34a2), a enzima manteve 66% da sua atividade inicial no mesmo período de tempo.

Na temperatura de 80ºC, Termamyl não apresentou atividade após 7 horas de incubação no experimento controle, sendo observado o mesmo perfil para as três pressões (Figura 34b1). Com fluido de completação, a preparação enzimática Termamyl não apresentou atividade após 5 horas de reação (Figura 34b2).

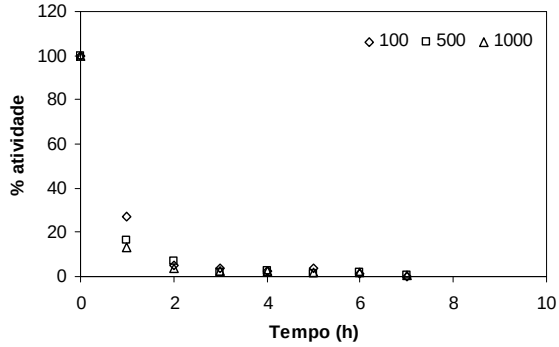
A 95ºC, os perfis de atividade em todas as pressões testadas também foram muito semelhantes, apresentando declínio em sua atividade decorrente da alta temperatura, não apresentando atividade residual após 5 horas nas condições controle (Figura 34c1) e não apresentando atividade residual após 2 horas nas condições com o fluido de completação (Figura 34c2).



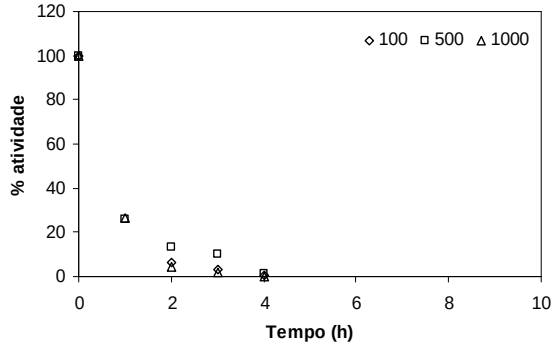
a1) 65ºC



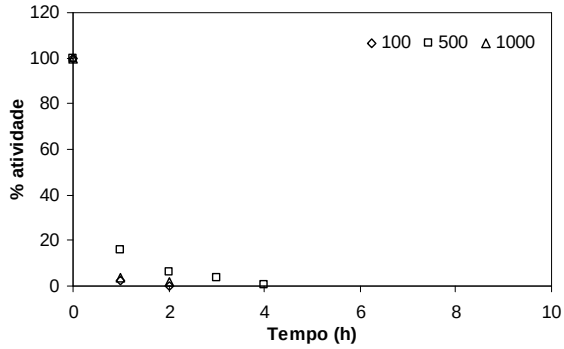
a2) 65°C



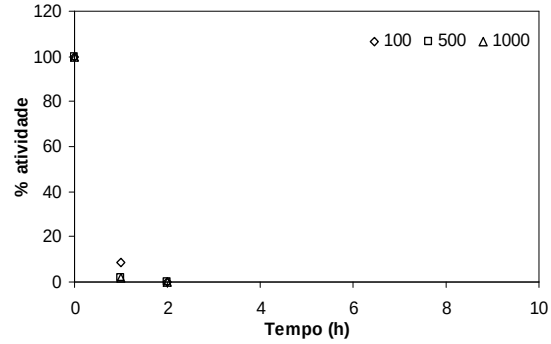
b1) 80°C



b2) 80°C



c1) 95°C



c2) 95°C

Figura 34. Efeito da pressão e da temperatura na estabilidade da α-amilase comercial Termamyl (1% v/v) (a) 65°C, (b) 80°C e (c) 95°C, sob pressões de 100, 500 e 1000psi, em controle (a1,b1,c1) e em fluido de completação (a2,b2,c2).

De acordo com a Figura 35a1, o quebrador enzimático Mi-Swaco também não apresentou uma diferença significativa na estabilidade nas três pressões investigadas (100, 500 e 1000 psi) a 65°C. Após 8 horas de ensaio, a enzima manteve praticamente a mesma atividade enzimática residual (acima de 80%). Nos experimentos com o fluido de completação (Figura 35a2) após 8 horas de reação a enzima manteve 70% da atividade inicial.

Na temperatura de 80ºC, as curvas também foram semelhantes (Figura 35b1) para as três pressões testadas, apresentando uma atividade residual de 4% após 8 horas de ensaio. E uma atividade residual de 1% nas reações com fluido de completação após as 8 horas de ensaio (Figura 35b2).

A 95ºC, os perfis de atividade em todas as pressões apresentaram um declínio em sua atividade decorrente da alta temperatura (Figura 35c1), a atividade residual não apresentou valores significativamente diferentes para as três pressões 100, 500 e 1000psi, e após 5 horas não se verificou mais atividade. Utilizando o fluido de completação, nenhuma atividade residual foi detectada após 4 horas de incubação (Figura 35c2).

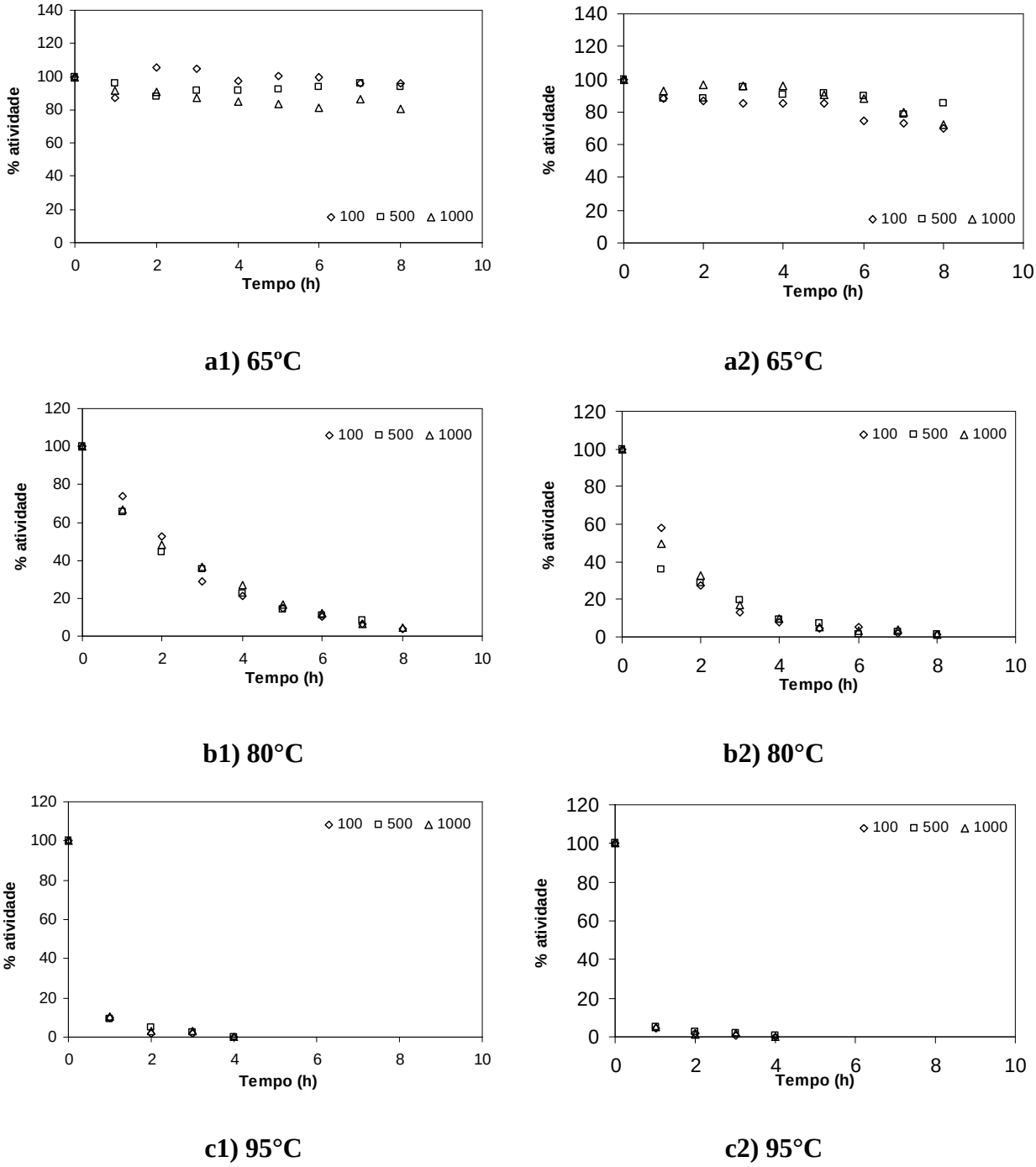


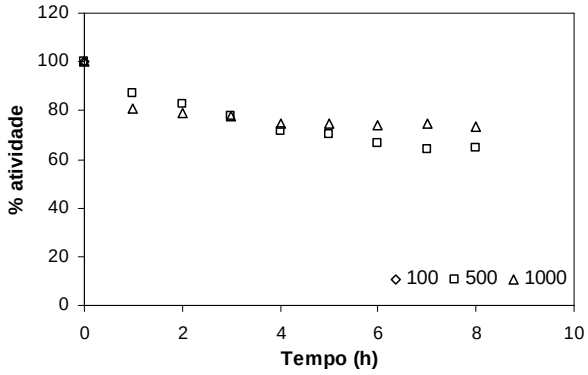
Figura 35. Efeito da pressão e da temperatura na estabilidade do quebrador comercial Mi-Swaco (1% v/v) (a) 65°C, (b) 80°C e (c) 95°C, sob pressões de 100, 500 e 1000psi, em controle (a1,b1,c1) e em fluido de completação (a2,b2,c2).

Na Figura 36 estão representados os resultados de estabilidade do quebrador enzimático GBW ao longo de 8 horas de ensaio. Novamente, não se observou uma diferença significativa na atividade residual para as três pressões (100, 500 e 1000 psi), nas três temperaturas investigadas a 65°C.

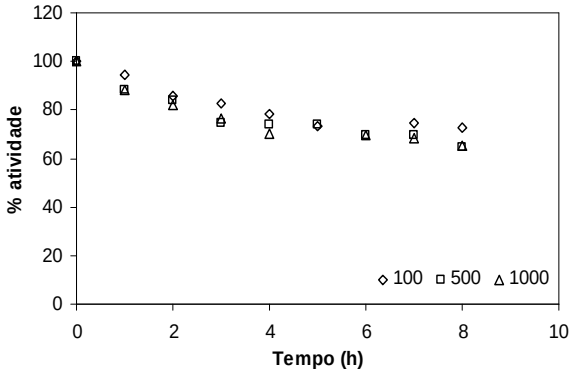
Após 8 horas de reação, a enzima manteve praticamente a mesma atividade enzimática residual, cerca de 64%. Nos sistemas com fluido de completação (Figura 36a2) após 8 horas de reação, o quebrador enzimático manteve 65% de atividade residual.

Na temperatura de 80ºC as curvas também não apresentaram diferença significativa na atividade residual (Figura 36b1) para as três pressões, apresentando uma atividade residual de 1% após 8 horas de reação. E apresentou uma atividade residual de 4% com fluido de completação após o mesmo intervalo de tempo (Figura 36b2).

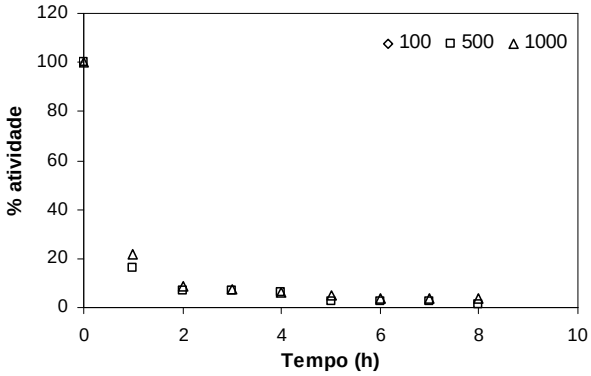
A 95ºC, os perfis de atividade em todas as pressões apresentaram declínio em sua atividade decorrente da alta temperatura (Figura 36c1): após 7 horas não se verificou mais atividade residual nos sistemas controle. Utilizando o fluido de completação, não foi detectada atividade residual após 4 horas (Figura 36c2).



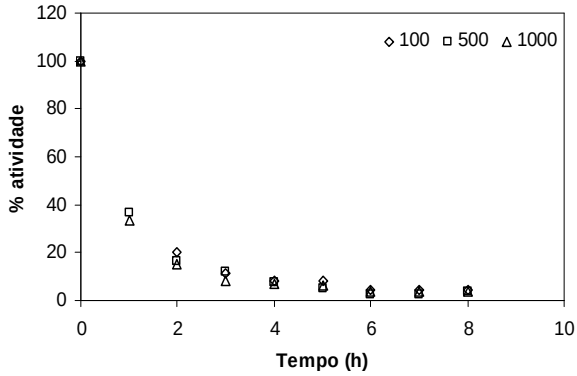
a1) 65ºC



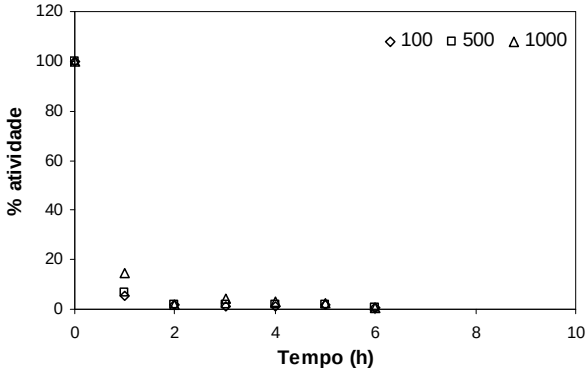
a2) 65°C



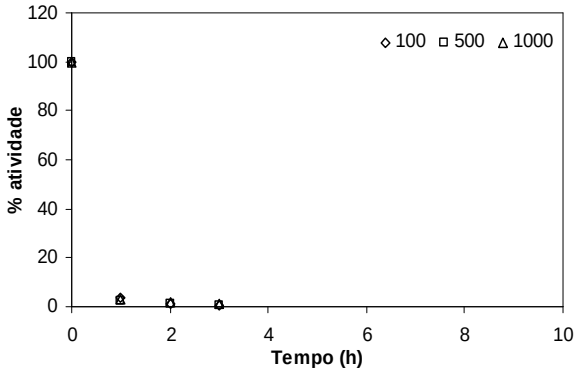
b1) 80°C



b2) 80°C



c1) 95°C



c2) 95°C

Figura 36. Efeito da pressão e da temperatura na estabilidade do quebrador comercial GBW (1% v/v) (a) 65°C, (b) 80°C e (c) 95°C, sob pressões de 100, 500 e 1000psi, em controle (a1,b1,c1) e em fluido de completação (a2,b2,c2).

Tabela 5: Resumo para as atividades residuais (%) nos ensaios de estabilidade após 8 horas de exposição.

	100 psi		500 psi		1000 psi	
	tampão	fluido	tampão	fluido	tampão	fluido
			Liquozyme			
65°C	96	79	83	82	90	85
80°C	72	62	67	68	79	66
95°C	14	2	25	2	17	2
			Termamyl			
65°C	80	66	79	68	78	74
80°C	0	0	0	0	0	0
95°C	0	0	0	0	0	0
			Mi-Swaco			
65°C	96	70	94	85	80	72
80°C	4	1	4	1	4	1
95°C	0	0	0	0	0	0
			GBW			
65°C	68	73	64	65	73	65
80°C	2	5	1	4	4	4
95°C	0	0	0	0	0	0

Deste modo, a pressão não parece ser o fator responsável pela diminuição da atividade amilolítica nas condições operacionais investigadas, não provocando alterações na estabilidade das enzimas estudadas em nenhuma das três pressões estudadas.

Foram verificadas diferenças significativas com o aumento da temperatura para 95ºC, onde ocorreu inibição da atividade das enzimas, e também nos sistemas utilizando o fluido de completação que possui alta salinidade. Esta alta concentração de sais pode ter provocado a diminuição da atividade residual destas enzimas, como descrito por Cobianco *et al.* (2007).

A preparação enzimática que apresentou melhor estabilidade nas condições avaliadas foi a Liquozyme, pois apresentou a maior atividade residual na temperatura de 95°C em fluido de completação, condição mais drástica estudada.

6. CONCLUSÕES

6.1 Caracterização

A caracterização realizada comparativamente com as quatro preparações estudadas foi muito importante para verificar os produtos com os quais estamos trabalhando. Todas possuem características muito semelhantes. A análise eletroforética para as quatro preparações apresentou uma banda de maior intensidade em 60kDa.

Duas das enzimas, as amilases comerciais, Liquozyme e Termamyl, possuem igual quantidade de proteína, 53,9 mg/ml e 54,1 mg/ml, respectivamente, e estas não apresentam capacidade emulsificante, possuindo tensão superficial também muito próxima, 43,4 nM/m e 40, 2 nM/m, respectivamente. Os quebradores enzimáticos, Mi-Swaco e GBW, apresentam índice de emulsificação de 20,8% e 28,6%, respectivamente, apresentam tensão superficial de 34,3 nM/m e 36, 9 nM/m, respectivamente.

6.2 Atividade e estabilidade

Todas as preparações enzimáticas apresentaram atividade amilolítica, sendo capazes de hidrolisar o amido, nas condições encontradas em poços de petróleo, como alta temperatura (65ºC e 80ºC e 95ºC) e alta salinidade apresentada nos fluido de completação (204 g/L de NaCl).

Apesar de apresentarem atividade em experimentos com fluido de completação, os componentes provocam a diminuição da atividade, sendo o NaCl o que causou o maior efeito negativo em todas as preparações amilolíticas testadas.

Sendo este efeito negativo provocado pelo aumento da força iônica na solução, decorrente da alta concentração de íons.

Com relação à termoestabilidade, todas apresentam, na temperatura de 65ºC, atividade residual acima de 70%, após as oito horas de reação. Na temperatura de 80ºC as preparações Liquozyme e Mi-Swaco apresentaram as maiores atividades e a Termamyl não apresentou atividade após quatro horas. Já na temperatura de 95ºC apenas a Liquozyme apresentou atividade após as oito horas de reação, apresentando 45% de atividade residual. Utilizando o fluido de completação a preparação Liquozyme apresentou 23% de atividade residual após as oito horas de reação.

A faixa de diferencial de pressão avaliada, 100 a 1000 psi, não foi responsável por alterações significativas na atividade e na estabilidade das preparações enzimáticas estudadas.

6.3 Parâmetros cinéticos

As amilases comerciais comportam-se de acordo com a cinética de Michaelis-Menten em tampão fosfato e em fluido de completação.

O aumento da temperatura de 65ºC para 80ºC acarretou no aumento da velocidade inicial e no aumento do K_m. Utilizando o fluido de completação, em cada temperatura estudada ocorreu a diminuição da $V_{máx}$ e o aumento do K_m, o que, provavelmente, esta relacionado com a perda de afinidade da enzima pelo substrato.

O estudo dos componentes presentes no fluido de completação mostrou que o componente que exerceu maior diminuição na produção de açúcares redutores foi o NaCl. Verificando a força iônica provocada por este sal e comparando com um outro sal, o KF, também neutro e monovalente, verifica-se que a força iônica

provocada pelos dois é equivalente. A então causa da inibição enzimática provocada pelo NaCl esta relacionada com a alta concentração de sais no fluido de completação que pode estar ocasionando o chamado efeito salting-out, resultando na diminuição da atividade das enzimas.

Com todos estes resultados é possível observar o grande potencial das enzimas na aplicação para remoção do reboco polimérico em poços de petróleo. A preparação enzimática liquozyme apresentou melhor desempenho, pois esta apresentou a maior atividade amilolítica em temperaturas mais altas e apresentou maiores atividades residuais nos experimentos de estabilidade nas condições de poço estudadas após as oito horas de reação.

7. SUGESTÕES

Como sugestões para continuidade do estudo apresentam-se:

- Avaliar a formação de produtos gerados na degradação do amido pelas α-amilases estudadas através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
- Realizar um estudo de análise de viabilidade técnica e econômica (EVTE) para a otimização da preparação enzimática.
- Fazer teste de remoção de reboco em corpos de prova com a melhor preparação encontrada neste trabalho, a preparação da Liquozyme.
- Avaliar o efeito da composição da água de formação na atividade e na estabilidade das preparações enzimáticas.
- Comparar o uso da α-amilase para hidrólise do amido com o emprego de ácidos minerais e de agentes oxidantes.
- Verificação da variação resultante da utilização de um complexo enzimático onde utilizaria amilase juntamente com amiloglicosidase, na tentativa de reduzir o tempo de remoção do reboco polimérico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adewale, I.O.; Agumanu, E.N. e Otih-Okoronkwo, F.I. Comparative studies on α-amylases from malted maize (Zea mays), millet (Eleusine coracana) and (Sorghum bicolor). *Carbohydrate Polymers* 66, 71-74, 2006.

Aguilar, G.; Morlon-Guyot, J.; Trejo-Aguilar, B. e Guyot, J. P. Purification and characterization of na extracellular α-amylase produced by Lactobacillus manihotivorans LMG 18010^{T}, an amylolytic lactic acid bactetium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 406-413, 2000.

Al-bani, F.; Baim, A.S. e Jacob, S. Drilling and completion intelligent multilateral MRC wells in haradh inc-3. *Society of Petroleum Engineers* 105715, 2007.

Alotaibi, M. B.; Nasr-El-Din, H.A. e Siddiqui, M.A. Chemical treatments to enhance productivity of horizontal and multilateral wells: lab studies and case histories. *Society of Petroleum Engineers* 89467, 2004.

Alotaibi, M. B.; Nasr-El-Din, H.A.; Hill, A.D. e Al Moajil, A.M. An optimized method to remove filter cake formed by formate based drill-in fluid in extended reach wells. *Society of Petroleum Engineers* 109754, 2007.

Alotaibi, M. B.; Azmy, R.M. e Nasr-El-Din, H.A. Wettability studies using low-salinity water in sandstone reservoirs. *Offshore Technology Conference*, 2010

Al-Qodah, Z.; Daghstani, H.; Geopel, Ph. e Lafi, W. Determination of kinetic parameters of α-amylase producing thermophie Bacillus sphaericus. *African Journal of Biotechnology*, v.6 (6), pp.699-706, 2007.

Amaral, P. F. F.; Almeida, A. P.; Peixoto, T.; Rocha-Leão, M. H. M.; Coutinho, J. A. P. e Coelho, M. A. Z. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in Yarrowia lipolytica cultures for lipase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* v. 23, n. 3, pp. 339-344, 2007.

Asghaer, M.; Asad, M. J.; Rahman, S. U.e Legge, R. L. A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic Bacillus subtilis strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, v.79, 950-955, 2007.

Bast, M.S.; Ali, S.A.; Scarborough, B. and Luyster, M.R. New enzyme completion technology used in the Gulf of Mexico for the first time. *Society of Petroleum Engineers* 58768, 2000.

Battistel, E.; Bianchi, D.; Fornaroli, M.; Guglielmetti, G.; Europa, P. e Cobianco, S. Enzyme breakers for chemically modified starches. *Society of Petroleum Engineers* 94702, 2005.

Beall, B.B.; Brannon, H. D.; TjonJoePin, R. M. e O'Driscoll, K. Evaluation of a new technique for removing horizontal wellbore damage attributable to drill-in filter cake. *Society of Petroleum Engineers* 36429, 1996.

Boonyaratanakornkit, B.B.; Park, C.B. e Clark, D.S. Pressure effects on intra and intermolecular interactions within proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1595, 235-249, 2002.

Bourgoyne Jr, A.T.; Millheim, K.K.; Chenevert, M.E. e Young Jr, F.S. *Applied Drilling Engineering*. SPE Textbook Series v. 2, 1986.

Bradshaw, R.; Hodge, R.; Wolf, N.O.; Knox, D.; Hudson, C. e Evans, E. Formate-based reservoirs drilling fluid resolves high-temperature chellenges in the natura sea. *Society of Petroleum Engineers* 98347, 2006.

Brannon H.D., Tjon-Joe-Pin, R.M., Carman, P.S.; Wood, W. D. Enzyme breaker technologies: a decade of improved well stimulation. *Society of Petroleum Engineers* 84213, 2003.

Caenn, R. e Chillingar, G. V. Drilling fluids: state of the art. *Journal of Petroleum Science Engineering*, 14, 221-230, 1996.

Chethan, S; Sreerama, Y. N. e Malleshi, N. G. Mode of inhibition of finger millet malt amylases by the millet phenolics. *Food Chemistry* 111, 187–191, 2008.

Cobianco, S.; Albonico, P.; Battistel, E.; Bianchi, D. e Fornaroli, M. Thermophilic enzymes for filtercake removal at high temperature. *Society of Petroleum Engineers* 107756, 2007.

Cooper, D. G. e Goldenberg, B. G. Surface-active agents from two Bacillus species. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 53, pp. 224-229, 1987.

Eisenmenger, M. J. e Reys-De-Corcuera. High pressure enhancement of enzymes: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 331-347, 2009.

Ezeiji, T. C. e Bahl, H. Purification, chacterization, and synergistic action of phytate-resistant α-amylase and α-glucosidade from Geobacillus thermodenitrificans HRO10. *Journal of Biotechnlogy*. 125, 27-38, 2006.

Fukuda, M. e Kunugi, S. *European Journal Biochemical*, 142, 565-570, 1984.

Gomes, M. R. A.; Clark, R. e Ledward, D. A. Effects of high pressure on amylase and starch in wheat and barley flours. *Food Chemistry*. v 63, pp. 363-372, 1998.

Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V. K. e Chauhan, B. Microbial α-amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* 38, 1599-1616, 2003.

Hansen, J. E. e Jiang, P. New enzyme process for downhole cleanup of reservoir drilling fluid filtercake. *Society of Petroleum Engineers* 50709, 1999.

Harris, P.C.; e Penny, G.S. Influence of shear history at bottomhole temperature on fracturing-fluid efficiency. *Society of Petroleum Engineers* 14258, 1989

Hoang, S.K. e Abousleiman, Y.N. Multilaterals drilling and sustainnable openhole production from theory to field-case studies. *Society of Petroleum Engineers*, 2010.

Iscan, A.G.; Civan, F. e Kok, M.V. Alteration of permeability by drilling fluid invasion and flow reversal. *Journal of Petroleum Science Engineering* 58, 227-244, 2007.

Kameda, E.; Queiroz, J. C.; Langone, M. A. P. e Coelho, M. A. Z. Removal of polymeric filter cake in petroleum wells: a study of commercial amylase stability. *Journal of Petroleum Science Enginering*, 59, 263-270, 2007.

Kameda, E. Utilização de preparações amilolíticas na remoção de reboco em operações de completação. *Tese de Doutorado, Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

Lee, B.; Ravindra, P. e Chan, E. New dropweight analyses for surface tension determination of liquids. *Colloids and Surfaces*. 332, 112-120, 2009.

Li, H.; Chi, Z.; Wang, X.; Duan, X. Ma, L. e Gao, L. Purification an characterization of extracellular amylase from the marine yeast Aureobasidium pullulans N13d and its raw potato starch digestion. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1006-1012, 2007.

Longbottom, J.R.; Dale, D. e Bruha, S. Development, testing and Field case histories of multilateral well completion systems. *Offshore Technology Conference* 8537, 1997.

Longbottom, J.R. Multilateral techniques enhance feasibility for deepwater applications with limited reserves. *Offshore Technology Conference* 8800, 1998.

Lopez, C.; Torrado, A.; Fuciños, P.; Guerra, N. P. e Pastrana, L. Enzymatic inhibition and thermal inactivation in the hydrolysis of chestnut purée with an amylase mixture. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 252-258, 2006.

Lowry, O. H., Rosebrough, N, J., Farr, A. L. e Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275, 1951.

Luyster, M.R.; Monroe, T.D. e Ali, S.A. Factors affecting the performance of enzyme breakers for removal of xanthan-based filter cakes. *Society of Petroleum Engineers* 58749, 2000.

Maarel, M.J.E.C.; Veen, B.; Uitdehaag, J.C.M.; Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. *Journal of Biotechnology* 94, 137-155, 2002.

McRae, J.; Bump, D. e Dike, E.V. Shale inhibition strategies for reservoirs containing reactive clay - experiences drilling high angle wells in Bohai Bay. *Offshore Technology Conference* 19320, 2008.

Mesquita, R. Caracterização de enzimas para remoção de reboco de poços de petróleo. *Trabalho de Graduação, Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 426-428, 1959.

Moreaua, Y.; Desseaux, V.; Koukiekolob, R.; Marchis-Mourenb, G. e Santimoneb, M. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part B 128. 543-552, 2001.

Nasr-El-Din, H. A.; Al-Otaibi, M. B.; Al-Qahtani, A. A e Al-Fuwaires. Filter-cake cleanup in MRC wells using enzyme/surfactant solutions. *Society of Petroleum Engineers* 98300, 2006.

Nasr-El-Din, H. A.; Al-Otaibi, M. B.; Al-Qahtani, A. A. e Samuel, M. An effective fluid formulation to remove drilling-fluid mudcake in horizontal and multilateral wells. *Society of Petroleum Engineers* 87960, 2007.

Nelson, D. L. e Cox, M. M. *Principles of Biochemistry*, 2002.

Nery, G.G. e Macari, R. Os fluidos de perfuração usados na industria da água subterrânea e sua influência sobre os perfis geofísicos de princípio elétrico. *Águas Subterrâneas* v19, n1 p. 49-60, 2005.

Nyland, T.; Azar, J.J.; Becker, T.E. e Lummus, J.L. Additive effectiveness and contaminant influence on fluid-loss control in water-based muds. *Society of Petroleum Engineers*, 1988.

Petri, D.F.S. and Queiroz, J.C. Identification of lift-of mechanism failure for salt drill-in drilling fluid containing polymer filter cake through adsorption/desorption studies. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 70, 89-98, 2010.

Pierangeli, M.A.P.; Guilherme, L.R.G.; Oliveira, L.R.; Curi, N.; Silva, M.L.N. Efeito da forca iônica da solução de equilíbrio sobre a adsorção/dessorção de chumbo em Latossolos brasileiros. *Pesq. Agropec. Brás*. 36, 8, 1077-1084, 2001.

Rahman, M.A.; Mustafiz, S.; Koksal, M. e Islam, M.R. Quantifying the skin factor for estimating the completion efficiency of perforation tunnels in petroleum wells. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 58, 99-110, 2007.

Prado, R.P.S. Comparação entre Estratégias de Produção Utilizando Poços Verticais e Horizontais. *Tese de mestrado, Ciências e Engenharia de Petróleo, Instituto de Geociências, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas*, 2003.

Sarubbo, L. A.; Luna, J. M. e Campos-Takashi, G. M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of Candida globrata UCP 1002. *Eletronic Journal of Biotechnology* v. 9, n. 4 pp. 400-406, 2006.

Segel, I. H. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, Wiley-Interscience, 1993.

Siddiqui, M.A.; Al-Anazi, H.A.; Al-Ansari, A.A.; Bataweel, M.A. e Hembling, D.E. Evaluation of acid precursor-enzyme system for filter-cake removal by a single-stage treatment. *Society of Petroleum Engineers* 99799, 2006

Suhy, T.E. e Harris, R.P. Application of polymer specific enzymes to clean up drill-in fluids. *Society of Petroleum Engineers* 51094, 1998.

Tabatabael, M. e Ghalambor, A. A new method to predict performance of horizontal and multilateral wells. *Society of Petroleum Engineers* 141164, 2011.

Toledo, A. L.; Severo Jr., J. B.; Souza, R. R.; Campos, E. S.; Santana, J. C. C. e Tambourgi, E. B. Purification by expanded bed adsorption and characterization of an α-amylase FORILASE NTL from A. niger. *Journal of Cromatography* B, 846, 51-56, 2007.

Thomas, J. E. et al. *Fundamentos da engenharia de petróleo*. Rio de Janeiro: Interciência: PETROBRAS, 2001. 271p.

Queiroz, J.C. In: Intern. Symp. Exhibition on Formation Damage Control, Lafayette, USA, *Society of Petroleum Engineers* 73713, 2002.

Queiroz, J.C. Redução na pressão de rompimento da torta de filtração através de melhorias na composição do fluido de perfuração à base de polímeros. *Tese de Doutorado. COOPE. Universidade Federal do Rio de Janeiro*, 2006.

Yang, B.H. e Flippen, M.C. Improved flowback analysis of assess polymer damage. *Society of Petroleum Engineers* 37444, 1997.

Yanping, Z.; Rongquan, R.; Hui, W. e Jun, W. Multilateral drilling and completion technology based on solid expandable tubular fixing system. *Petroleum Exploration and Development* 36, 6, 768-775, 2009.

Yildiz, T. Multilateral horizontal well productivity. *Society of Petroleum Engineers* 94223, 2005.