

**BIODEGRADAÇÃO DE FENOL POR UMA NOVA LINHAGEM DE *Aspergillus* sp. ISOLADA DE UM SOLO CONTAMINADO DO SUL DO BRASIL**

**Cátia Tavares dos Passos, Janáina Fernandes de Medeiros Burkert, Susana Juliano Kalil e Carlos André Veiga Burkert\***  
Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900 Rio Grande – RS, Brasil

Recebido em 6/6/08; aceito em 24/10/08; publicado na web em 12/2/09

BIODEGRADATION OF PHENOL BY A NEWLY *Aspergillus* sp. STRAIN ISOLATED FROM A CONTAMINATED SOIL IN SOUTHERN BRAZIL. The main goal of this work was to study the biodegradation of phenol in batch mode by a filamentous fungus isolated from a contaminated site in Southern Brazil. A better performance was obtained by previous adaptation of the microorganism to the toxic chemical. A 2<sup>3</sup> experimental design was proposed and it could be observed total phenol degradation in 72 h using 500 mg L<sup>-1</sup> glucose, inoculum of 20% and agitation of 200 rpm, resulting a biodegradation rate of 3.76 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. In relation to phenol tolerance, *Aspergillus* sp. LEBM2 was able to consume up to 989 ± 15 mg L<sup>-1</sup>.

Keywords: bioremediation; filamentous fungi; phenol.

**INTRODUÇÃO**

Fenol e seus derivados constituem uma importante classe de contaminantes ambientais pela sua presença em muitos efluentes industriais, incluindo refinarias, plantas petroquímicas, siderúrgicas, indústrias de cerâmicas e de resinas fenólicas, entre outros.<sup>1</sup> Embora sendo biodegradável tanto por via aeróbia como anaeróbia, o fenol é tóxico para a maioria dos microrganismos, principalmente não aclimatados, em concentração de apenas 10 mg L<sup>-1</sup>, podendo ser inibidor do crescimento mesmo para as espécies que o utilizam como substrato, causando problemas em estações de tratamento de efluentes.<sup>2</sup> A resolução CONAMA nº 357, publicada em 18 de março de 2005, define como padrão de lançamento para efluentes industriais o teor de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de fenóis totais,<sup>3</sup> valor considerado baixo frente às concentrações geradas pelas indústrias. Portanto, a remoção eficiente de fenol de efluentes industriais é de grande importância para a proteção ambiental e novas estratégias têm sido propostas para atingir esta finalidade.

A bioaugmentação por microrganismos autóctones selecionados constitui uma excelente alternativa para a biodegradação do fenol. Diversos autores têm mencionado o uso de microrganismos visando a remoção de fenol em efluentes industriais como, por exemplo, *Penicillium*,<sup>1</sup> *Aspergillus*,<sup>1,4</sup> *Graphium*,<sup>1,5</sup> *Candida*,<sup>6,7</sup> *Pseudomonas*,<sup>8</sup> *Acinetobacter*<sup>9</sup> e *Rhodococcus*.<sup>10</sup> No entanto, a prospecção de novas linhagens degradadoras, adaptadas a condições ambientais locais, e sua caracterização quanto à capacidade biodegradativa e tolerância à toxicidade constituem aspectos importantes a serem ainda explorados. Para a avaliação da toxicidade e biodegradabilidade, os ensaios em batelada são úteis para classificar variáveis importantes, verificando seus efeitos no desempenho do microrganismo no processo biodegradativo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a biodegradação do fenol por *Aspergillus* sp. LEBM2, verificando-se a influência da adaptação prévia do fungo, os efeitos dos parâmetros de cultivo em batelada e a tolerância ao fenol.

**PARTE EXPERIMENTAL****Água residuária sintética**

Os constituintes da água residuária sintética foram preparados na forma de soluções concentradas, sendo esterilizadas separadamente em autoclave (soluções de minerais e de glicose) e por filtração utilizando membrana Millipore de 0,22 µm (solução de fenol). Após as soluções foram misturadas, de forma a resultar na seguinte composição no início dos cultivos (mg L<sup>-1</sup>): 400, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 200, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 100, NaCl; 25, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 3, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 500, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O; glicose e fenol em concentrações variáveis.

**Microrganismo**

Utilizou-se o fungo *Aspergillus* sp. LEBM2, isolado de um solo contaminado por hidrocarbonetos derivados de petróleo,<sup>11</sup> na região da cidade do Rio Grande, RS, Brasil, sendo mantido a 4 °C, em ágar batata dextrose (PDA).

**Influência da adaptação sobre a capacidade biodegradativa**

Para obtenção dos diferentes inóculos, empregaram-se frascos erlenmeyer de 500 mL onde foram adicionados 150 mL de água residuária sintética contendo diferentes fontes de carbono: somente fenol (250 mg L<sup>-1</sup>), glicose (250 mg L<sup>-1</sup>) e fenol (250 mg L<sup>-1</sup>) e somente glicose (250 mg L<sup>-1</sup>).

Cada um destes frascos recebeu três unidades de 1 cm de diâmetro, provenientes do cultivo prévio do fungo em placas de Petri com PDA (sem adição de fenol) durante 5 dias a 25 °C.<sup>12</sup>

Após incubação a 25 °C por 7 dias, os diferentes inóculos obtidos foram transferidos para frascos erlenmeyers de 500 mL contendo água residuária sintética acrescida de 250 mg L<sup>-1</sup> de fenol como única fonte de carbono. O volume de inóculo correspondeu a 10% do volume total, de 150 mL. Paralelamente foi realizado um ensaio controle, sem a inoculação do microrganismo, para avaliar as perdas abióticas. Os experimentos foram realizados em triplicata, de forma estática (sem agitação), a 25 °C.

Os resultados foram avaliados pela taxa de biodegradação de fenol (em mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), obtida pelo acompanhamento da concentração

\*e-mail: burkert@vetorial.net

do fenol ao longo do tempo, sendo esta determinada nas amostras previamente filtradas e diluídas, através do método baseado no uso do reagente de Folin-Ciocalteu,<sup>5</sup> com posterior leitura de absorbância a 750 nm, utilizando uma curva de calibração de fenol na faixa de 0,25 a 10 mg L<sup>-1</sup>.

### Influência dos parâmetros de cultivo na biodegradação do fenol

Efetuiu-se um planejamento fatorial completo envolvendo 3 variáveis (2<sup>3</sup> ensaios mais três pontos centrais), visando aumentar a eficiência de biodegradação do fenol por *Aspergillus* sp. LEBM2. As variáveis estudadas foram: concentração de glicose (0 a 500 mg L<sup>-1</sup>), agitação (0 a 200 rpm) e volume de inóculo (10 a 20%). Nos experimentos, foram acompanhadas as concentrações de fenol por Folin-Ciocalteu<sup>5</sup> e de glicose pelo método 3,5 DNS,<sup>13</sup> e a resposta analisada foi a taxa de biodegradação de fenol.

O inóculo foi preparado conforme estabelecido na etapa anterior, sendo transferido para frascos erlenmeyer de 500 mL com água residual sintética contendo fenol (250 mg L<sup>-1</sup>) e glicose (concentração conforme planejamento experimental), totalizando um volume de 150 mL. A temperatura de todos os experimentos foi controlada a 25 °C; os ensaios estáticos (0 rpm) foram conduzidos em estufa com circulação de ar e os experimentos realizados sob agitação (100 ou 200 rpm, conforme planejamento experimental) foram conduzidos em incubadora rotatória.

### Avaliação da tolerância ao fenol

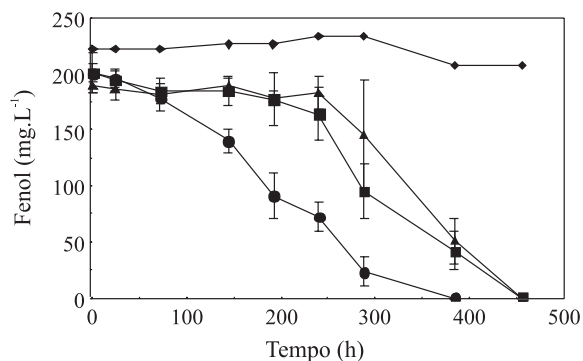
A partir da condição otimizada no planejamento experimental, foram realizados testes em triplicata para avaliar a tolerância do fungo filamentos *Aspergillus* sp. LEBM2 na biodegradação em concentrações crescentes de fenol. Foram testadas concentrações acima de 500 mg L<sup>-1</sup>, que foi o limite de tolerância estabelecido anteriormente para este microrganismo quando cultivado em placas de Petri, tendo o fenol como única fonte de carbono.<sup>11</sup>

### Análise estatística

Os dados obtidos foram tratados usando-se o software Statistica 5.0 (StatSoft, Inc.).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

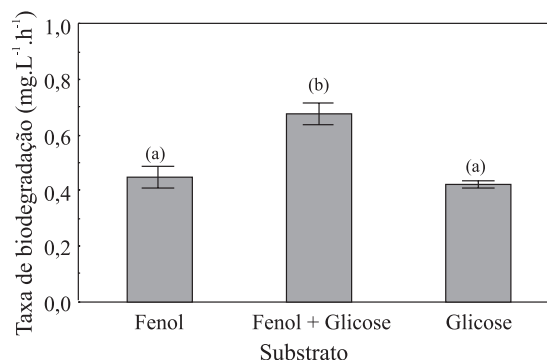
A Figura 1 mostra as médias das concentrações de fenol ao longo do tempo e os desvios padrão obtidos para a degradação deste



**Figura 1.** Ensaios de biodegradação de fenol por *Aspergillus* sp. LEBM2 em cultivo estático (sem agitação) utilizando diferentes substratos no preparo do inóculo. ■ fenol; ● fenol + glicose; ▲ glicose; ◆ controle

composto, utilizando-se diferentes substratos no preparo do inóculo. Mediante o ensaio controle verificou-se que não houve perdas abióticas significativas de fenol. A Figura 1 indica que a biodegradação foi mais rápida para o inóculo preparado com o substrato misto glicose e fenol, diminuindo o tempo para biodegradação total do fenol em 62 h. Comportamento similar foi observado por González *et al.*<sup>8</sup> para a biodegradação de fenol por *Pseudomonas putida*.

Os resultados obtidos para taxa de biodegradação de fenol foram submetidos à análise de variância e comparação de médias utilizando o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A Figura 2 indica que a taxa de biodegradação obtida usando-se o inóculo preparado com o substrato misto glicose e fenol ( $0,67 \pm 0,04$  mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) foi estatisticamente superior e diferente dos demais ensaios. As taxas de biodegradação obtidas com os inóculos preparados somente com glicose ( $0,44 \pm 0,04$  mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) ou fenol ( $0,41 \pm 0,02$  mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) não apresentaram diferenças significativas entre si.



**Figura 2.** Taxas médias de biodegradação de fenol e  $\pm$  desvio padrão para os diferentes substratos utilizados no preparo do inóculo. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

A partir desses resultados pôde-se constatar que a etapa de adaptação do microrganismo ao fenol durante o preparo do inóculo é essencial. A adaptação aumenta a taxa de biodegradação e a tolerância ao fenol, tornando o processo biológico mais eficiente. Por outro lado, também a presença de glicose como fonte adicional de carbono, facilmente assimilável, garante produção inicial de biomassa para a biodegradação.

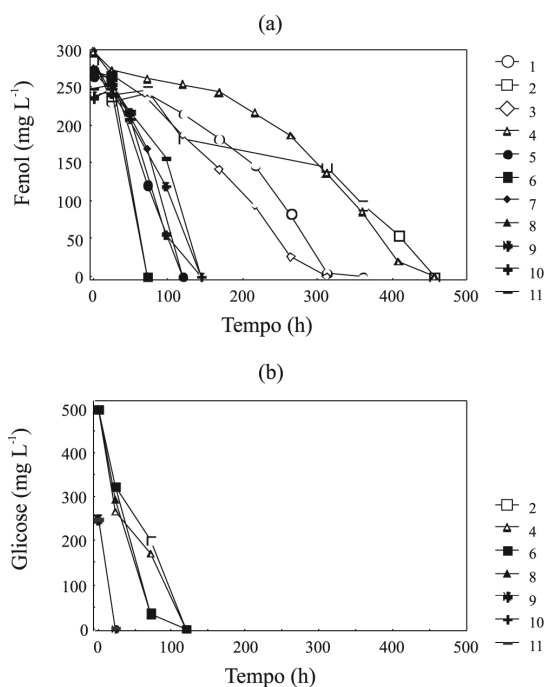
Os resultados para o planejamento experimental 2<sup>3</sup> são apresentados na Figura 3 e Tabela 1, sendo que a taxa de biodegradação de fenol variou de 0,58 a 3,76 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos foram ajustados a um modelo de primeira ordem (Equação 1) para a taxa de biodegradação de fenol ( $r$ ) em função das variáveis significativas codificadas  $X_1$  (concentração de glicose) e  $X_3$  (velocidade de agitação).

$$r = 1,82 + 0,29X_1 + 1,14X_3 + 0,46X_1X_3 \quad (1)$$

Com a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 2, onde as variáveis significativas foram acopladas ao resíduo,<sup>14</sup> observa-se a validade do modelo pelo Teste F, que foi 109,65 vezes maior que o valor tabelado, obtendo-se coeficiente de correlação de 0,995. A partir destes dados gerou-se a superfície de resposta e a curva de contorno apresentadas na Figura 4.

De acordo com a superfície de resposta (Figura 4a) e curva de contorno (Figura 4b), o incremento na agitação em toda a faixa de concentração de glicose avaliada proporcionou um aumento efetivo da taxa de biodegradação de fenol. Por outro lado, o aumento da concentração de glicose até agitação de 65 rpm praticamente não influenciou a taxa de biodegradação. Porém, com agitações superiores



**Figura 3.** Ensaios de biodegradação de fenol propostos no planejamento experimental. (a) Concentração de fenol ao longo do tempo. (b) Concentração de glicose ao longo do tempo

**Tabela 1.** Planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> em níveis codificados (valores reais)

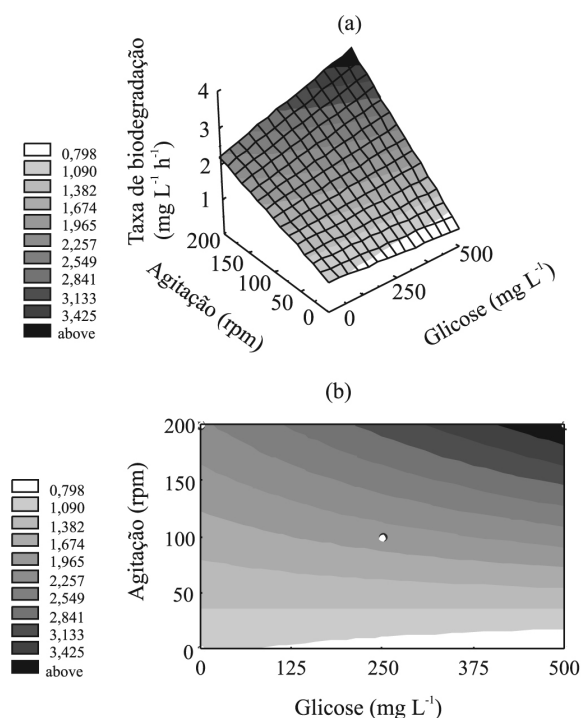
| Ensaio | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | r <sub>exp</sub> | r <sub>pred</sub> | Desvio (%) |
|--------|----------------|----------------|----------------|------------------|-------------------|------------|
| 1      | -1 (0)         | -1 (10)        | -1 (0)         | 0,79             | 0,85              | -7,60      |
| 2      | +1 (500)       | -1 (10)        | -1 (0)         | 0,58             | 0,51              | 12,07      |
| 3      | -1 (0)         | +1 (20)        | -1 (0)         | 0,95             | 0,85              | 10,53      |
| 4      | +1 (500)       | +1 (20)        | -1 (0)         | 0,65             | 0,51              | 21,54      |
| 5      | -1 (0)         | -1 (10)        | +1 (200)       | 2,20             | 2,21              | -0,46      |
| 6      | +1 (500)       | -1 (10)        | +1 (200)       | 3,75             | 3,71              | 1,07       |
| 7      | -1 (0)         | +1 (20)        | +1 (200)       | 2,29             | 2,21              | 3,49       |
| 8      | +1 (500)       | +1 (20)        | +1 (200)       | 3,76             | 3,71              | 1,33       |
| 9      | 0 (250)        | 0 (15)         | 0 (100)        | 1,66             | 1,82              | -9,64      |
| 10     | 0 (250)        | 0 (15)         | 0 (100)        | 1,63             | 1,82              | -11,66     |
| 11     | 0 (250)        | 0 (15)         | 0 (100)        | 1,72             | 1,82              | -5,81      |

X<sub>1</sub> = glicose (mg L<sup>-1</sup>); X<sub>2</sub> = volume de inóculo (%); X<sub>3</sub> = agitação (rpm); r<sub>exp</sub> = taxa de biodegradação de fenol experimental (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>); r<sub>pred</sub> = taxa de biodegradação de fenol predita pelo modelo (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

**Tabela 2.** ANOVA para a taxa de biodegradação de fenol

| Fonte de variação | Graus de liberdade | Soma quadrática | Média quadrática | Teste F |
|-------------------|--------------------|-----------------|------------------|---------|
| Regressão         | 3                  | 12,879          | 4,293            | 477     |
| Resíduo           | 7                  | 0,064           | 0,009            |         |
| Falta de ajuste   | 5                  | 0,060           | 0,012            |         |
| Erro puro         | 2                  | 0,004           |                  |         |
| Total             | 10                 | 12,944          |                  |         |

Coefficiente de correlação: 0,995; F<sub>0,95; 3; 7</sub> = 4,35.



**Figura 4.** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para taxa de biodegradação de fenol em função da concentração de glicose e agitação

a 100 rpm, incrementando a concentração de glicose de 0 até 500 mg L<sup>-1</sup> registraram-se taxas de biodegradação de fenol de aproximadamente 0,8 a 3,5 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Portanto, a agitação foi um parâmetro fundamental para o desempenho do *Aspergillus* sp. LEBM2 no processo de biodegradação.

Admitindo-se que haja uma correlação entre a velocidade de agitação do meio e o fornecimento de oxigênio proveniente do ar, o efeito positivo da agitação pode ser explicado por favorecer o metabolismo aeróbico do fungo, estimulando o crescimento microbiano e, desta forma, contribuindo para o sucesso da biodegradação.

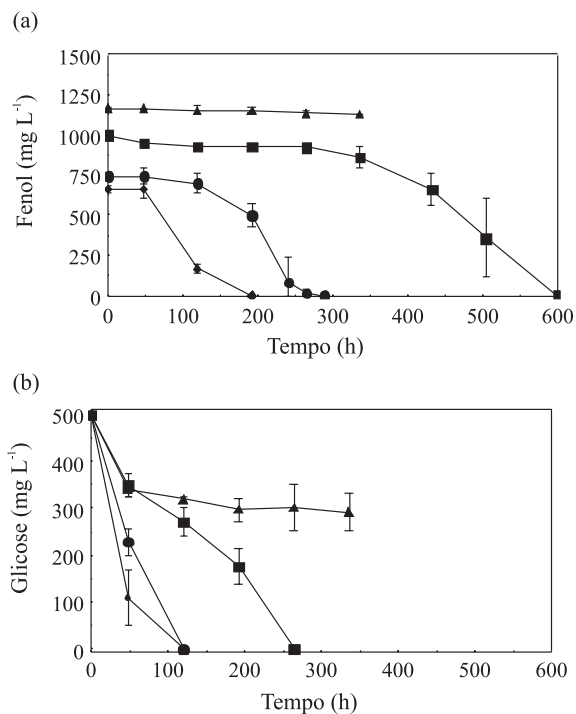
Pelo acompanhamento do consumo de glicose e fenol nos ensaios do planejamento experimental (Figura 3) verificou-se que o fungo consumiu preferencialmente o carboidrato. Após o consumo da glicose, o fenol continuou sendo consumido, confirmando que o *Aspergillus* sp. LEBM2 pode utilizá-lo em seu metabolismo como única fonte de carbono.

O incremento da taxa de biodegradação de fenol ao utilizar-se maior concentração de glicose no meio explica-se devido à glicose ser um composto preferencialmente assimilado pelos fungos, favorecendo a formação de biomassa, e sua presença no substrato não implica que outros compostos não possam ser utilizados. Apesar da repressão catabólica ser frequentemente mencionada, fontes de carbono convencionais, como glicose, glutamato e extrato de levedura, podem aumentar a taxa de biodegradação de compostos aromáticos, sugerindo que sua presença diminui a toxicidade e o efeito inibitório sobre o crescimento celular exercido por compostos xenobióticos.<sup>15</sup> Desta forma, esta habilidade de degradar fenol mesmo na presença de glicose implica na capacidade que o fungo tem de remover fenol em efluentes, solos e aquíferos que contenham outras fontes de carbono mais facilmente assimiláveis.

Analisando a superfície de resposta (Figura 4a), a condição otimizada para minimização do tempo de biodegradação foi 500 mg L<sup>-1</sup> de glicose e 200 rpm de agitação, independente do volume de inóculo, conseguindo-se aumento de 6,28 vezes na taxa de biodegradação (ensaios 6 e 8) quando comparada ao ensaio menos eficiente.

Sugere-se que seja utilizado volume de inóculo de 20% (ensaio 8), para garantir a eficiência do processo para maiores concentrações de fenol, uma vez que se trata de uma substância tóxica. Na Tabela 1 observa-se ainda que o modelo proposto prevê muito bem a taxa de biodegradação de fenol, principalmente na região ótima, onde apresenta desvios relativos inferiores a 2%.

A Figura 5a apresenta os resultados obtidos para a biodegradação de fenol utilizando diferentes concentrações deste componente, permitindo afirmar que houve aumento no tempo de biodegradação conforme incremento na concentração de fenol.

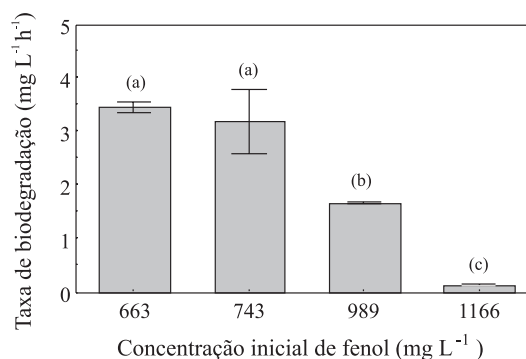


**Figura 5.** Consumo de fenol (a) e glicose (b) para diferentes concentrações iniciais de fenol, nas condições estabelecidas pelo planejamento experimental (500 mg L<sup>-1</sup> de glicose, 200 rpm de agitação, 20% de inóculo). ◆ 663 mg L<sup>-1</sup>; ● 743 mg L<sup>-1</sup>; ■ 989 mg L<sup>-1</sup>; ▲ 1166 mg L<sup>-1</sup>

A biodegradação foi total até a concentração inicial de fenol de 989 ± 15 mg L<sup>-1</sup>. Até esta concentração inicial, o fungo consumiu a glicose preferencialmente, mas simultaneamente ao fenol, para após consumir totalmente o fenol (Figuras 5a e 5b). Observa-se também na Figura 5b que, aumentando a concentração de fenol, a glicose foi consumida mais lentamente, demonstrando claramente o efeito inibidor do fenol sobre o metabolismo do fungo.

Como pode ser observado na Figura 6, não foi verificada diferença significativa na taxa de biodegradação de fenol entre as concentrações iniciais de 663 ± 20 e 743 ± 22 mg L<sup>-1</sup>. A concentração de 989 ± 15 mg L<sup>-1</sup> foi diferente das demais, apresentando taxa de biodegradação de fenol inferior (1,66 ± 0,02 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>), cerca de 50% menor que as anteriores, provavelmente por estar se aproximando do limite de tolerância ao fenol. A menor taxa de biodegradação mostrou-se associada a um aumento da fase de adaptação, evidenciada pela pequena variação na concentração de fenol nas primeiras 264 h de cultivo.

Foi observada uma variação não expressiva na concentração de fenol, cerca de 4%, para a concentração inicial de 1166 ± 11 mg L<sup>-1</sup> durante o período acompanhado, apesar do consumo de glicose nas primeiras 192 h de cultivo. A partir deste ponto também não houve consumo de glicose. Este fato indica que nesta concentração inicial de fenol o fungo provavelmente permaneceu viável pelo período



**Figura 6.** Taxas médias de biodegradação de fenol para diferentes concentrações iniciais e ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

citado, sendo que após sua atividade metabólica cessou pelo efeito tóxico do fenol, pois não mais se verificou decréscimo na concentração de glicose.

A concentração inicial de 989 ± 15 mg L<sup>-1</sup> pode ser considerada elevada tratando-se de fenol, o que possibilita afirmar que *Aspergillus* sp. LEBM2 apresenta alta tolerância ao fenol, sendo capaz de biodegradá-lo totalmente mesmo em altas concentrações. Limites de tolerância ao fenol em níveis similares têm sido observados para outros microrganismos cultivados em batelada, como *Candida tropicalis*,<sup>7</sup> *Pseudomonas putida*<sup>8</sup> e *Acinetobacter* sp..<sup>9</sup> Um linhagem de *Candida tropicalis*<sup>3</sup> foi capaz de degradar até 2000 mg L<sup>-1</sup>. *Graphium* sp.<sup>6</sup> foi capaz de tolerar 2000 mg L<sup>-1</sup>, mas a degradação foi de aproximadamente 60%. Para o gênero *Aspergillus*, Santos e Linardi<sup>1</sup> observaram percentuais de biodegradação variando de cerca de 90% (concentração inicial até 600 mg L<sup>-1</sup>) até 4% (1000 mg L<sup>-1</sup>), com taxas de biodegradação na faixa de 3 a 4 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>.

Desta forma, é importante destacar que com *Aspergillus* sp. LEBM2 foi possível a biodegradação total em altas concentrações de fenol, apesar do decréscimo na taxa de biodegradação.

## CONCLUSÕES

Constatou-se que a adaptação prévia do fungo *Aspergillus* sp. LEBM2 em meio contendo fenol e glicose, ambos na concentração de 250 mg L<sup>-1</sup>, possibilitou maior taxa de biodegradação de fenol, tornando o processo mais eficiente. Os ensaios em frascos agitados apresentaram resultados promissores, permitindo otimizar algumas variáveis que incrementaram a taxa de biodegradação de fenol em até 6,48 vezes. As condições otimizadas para alcançar uma taxa de biodegradação de fenol de 3,76 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> foram 500 mg L<sup>-1</sup> de glicose e agitação de 200 rpm, sugerindo-se que seja utilizado um volume de inóculo de 20% para garantir a eficiência do tratamento para maiores concentrações de fenol. *Aspergillus* sp. LEBM2 tem alta tolerância ao fenol, podendo biodegradá-lo efetivamente até uma concentração de 989 ± 15 mg L<sup>-1</sup> apresentando, desta forma, grande potencial para emprego em processos de bioaumentação.

## AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, o qual possibilitou a realização desse trabalho.

## REFERÊNCIAS

- Santos, V. L.; Linardi, V. R.; *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1001.

2. Sancinetti, S. T.; Félix, J. P. L.; Neto, M. A. F.; *Anais do XIV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Florianópolis, Brasil, 2003.
3. Britto, J. M.; Rangel, M. C.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 114.
4. García, I. G.; Peña, P. R. J.; Venceslada, J. L. B.; Martín, A. M.; Santos, M. A. M.; Gómez, E. R.; *Process Biochem.* **2000**, *35*, 751.
5. Santos, V. L.; Heilbuth, N. M.; Braga, D. T.; Monteiro, A. S.; Linardi, V. R.; *J. Basic Microbiol.* **2003**, *43*, 238.
6. Yan, J.; Jianping, W.; Hangmei, L.; Soliang, Y.; Tongding, H.; *Biochem. Eng. J.* **2005**, *24*, 243.
7. Chen, K. C.; Lin, Y. H.; Chen, W. H.; Liu, Y. C.; *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 490.
8. González, G.; Herrera, G.; García, M. T.; Peña, M.; *Bioresour. Technol.* **2001**, *80*, 137.
9. Adav, S. S.; Chen, M. Y.; Lee, D. J.; Ren, N.Q.; *Chemosphere* **2007**, *67*, 1566.
10. Hidalgo, A.; Jaureguibeitia, A.; Prieto, M. B.; Rodríguez-Fernández, C.; Serra, J. L.; Llama, M. J.; *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 221.
11. Santos, E. O.; Rosa, C. F. C.; Passos, C. T.; Sanzo, A. V. L.; Burkert, J. F. M.; Kalil, S. J.; Burkert, C. A. V.; *Afr. J. Biotechnol.* **2008**, *7*, 1314.
12. Burkert, J. F. M.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003.
13. Miller, G. L.; *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426.
14. Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F.; *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos*, Casa do Pão Editora: Campinas, 2005.
15. Loh, K. C.; Wang, S. J.; *Biodegradation* **1998**, *8*, 329.