Slide 1

Bioremediação

Vias Metabólicas

Slide 2

Vias metabólicas

Via Metabólica

Sequência de enzimas envolvidas na degradação de um substrato ou na síntese de um metabólito:

- **Geralmente os genes estruturais das enzimas de uma via metabólica são regulados por um mesmo promotor**

Catabolismo ("destruição"): biodegradação

- **Produção de energia metabólica;**
- **Produção de intermediários para a biossíntese de biomassa**

Anabolismo ("construção"): biossíntese

- **Biossíntese de todos os compostos da célula**

Slide 3

Vias metabólicas

Diversidade Química de Células

Componente	% peso	Compostos diferentes	Unidade Básica	Moléculas diferentes
Água	70	1	-	1
Proteínas	15	3.000	aminoácido	20
DNA	1	1	nucleotídeo	4
RNA	6	> 3.000	nucleotídeo	4
Polisacarídeos	3	5	açúcares	~50
Membranas	2	< 350	lipídios	< 350
Monômeros	2	500	-	500
Íons inorgânicos	1	20	-	20

Slide 4

Vias metabólicas

Diversidade Química de Células

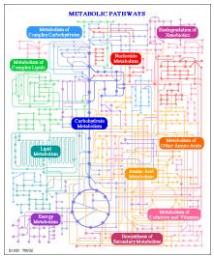
Componente	% peso seco	Moléculas/célula
Proteínas	55 (15-75)	2.360.000
RNA	20,5 (5-30)	
23S rRNA		18.700
16SrRNA		18.700
5SrRNA		18.700
tRNA		205.000
mRNA		1.380
DNA	3,1(1-5)	2.1
Fosfolipídios	9,1 (0-15)	22.000.000
Lipopolissacarídeos	3,4 (0-3,5)	1.200.000
Peptidoglicano	3 (0-20)	1
Glicogênio	2,5 (0-50)	4.360
Polihidroxibutirato	0 (0-80)	1
Polifosfato	0 (2-20)	1
Monômeros	2,1	
Inorgânicos	1,0	

Fonte Egli Front. Microbiol. 6:287, 2015

4

Slide 5

Vias metabólicas



Fonte: http://manet.illinois.edu/pathways.php

5

Slide 6

Vias metabólicas

Precursores: a interconexão entre o catabolismo e o anabolismo

Heterotróficos

Compostos orgânicos → CO_2

Autotróficos → CO_2

Glicose-1-fosfato
Glicose-6-fosfato
Fosfoenolpiruvato
3-Fosfoglicerato
Diidroxiacetonafosfato
Piruvato
Ribose-5-fosfato
Eritrose-4-fosfato
Acetil-CoA
a-Oxoglutarato
Succinil-CoA
Oxaloacetato

→ **Aminoácidos**
Nucleotídeos
Vitaminas
Carboidratos
Lipídios
Outros componentes celulares

Glicólise
Via das pentoses: $NADPH_2$ para biossíntese

Acetil-CoA
Ciclo de Krebs

6

Slide 7

Vias metabólicas

Biodegradação: vias metabólicas

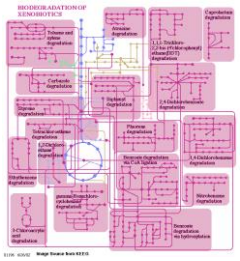
Regra geral: degradar a molécula do poluente até obter uma estrutura comum ao metabolismo básico da célula: glicólise, ciclo de Krebs, etc.

Biodegradação catabólica:

produz energia metabólica e/ou intermediários para a biossíntese

Slide 8

Vias metabólicas



Fonte: http://manet.illinois.edu/pathways.php

Slide 9

Vias metabólicas

Hidrocarbonetos: o anel aromático ou a molécula alifática são muito resistentes a reações químicas.

Hydrocarboneto aromático

↓

Ativação

↓

Cadeias metabólicas periféricas

↓

Intermediários aromáticos centrais

↓

Abertura dos anéis dos compostos aromáticos centrais

↓

Biodegradação até produzir composto metabolizável por cadeia metabólica universal da célula (ciclo de Krebs)

Hydrocarboneto alifático

↓

Ativação

↓

Cadeias metabólicas periféricas

↓

Intermediário metabolizável por cadeia metabólica universal da célula (β-oxidação)

Slide 10

Vias metabólicas

Ativação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos

O anel aromático ou a molécula alifática são muito resistentes a reações químicas. Ambas moléculas precisa ser ativadas enzimaticamente por reação com oxigênio no início da cadeia metabólica. Existem duas classes de enzimas capazes de fazê-lo:

Mono-oxygenases: **Catalizam a introdução de um átomo da molécula de oxigênio no substrato, sendo o segundo átomo reduzido a água, a reação depende de um doador de hidrogênio fisiológico, geralmente $NADH_2$ nas reações de biodegradação:**

$$S + O_2 + 2H \Rightarrow S\text{-}OH + H_2O$$

Dioxygenases: **Catalizam a introdução de dois átomos de oxigênio no substrato:**

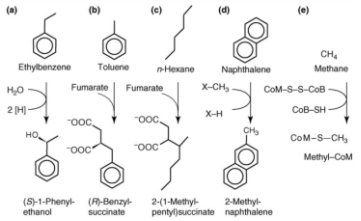
$$S + O_2 \Rightarrow SO_2$$

10

Slide 11

Vias metabólicas

Ativação anaeróbia de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos



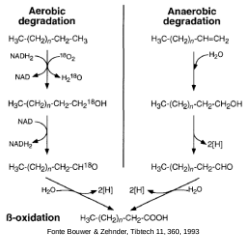
Fonte Heider,Curr.Opin.Chem. Biol.11,188, 2007

11

Slide 12

Vias metabólicas

Degradação aeróbia e anaeróbia de n-alcanos: cadeias metabólicas periféricas



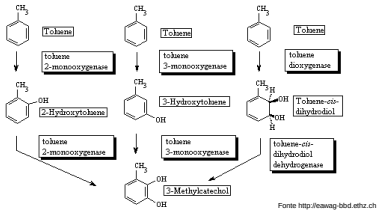
Fonte Bouwer & Zehnder, Tibtech 11, 360, 1993

12

Slide 13

Vias metabólicas

Cadeias metabólicas periféricas – Degradação aeróbia de tolueno



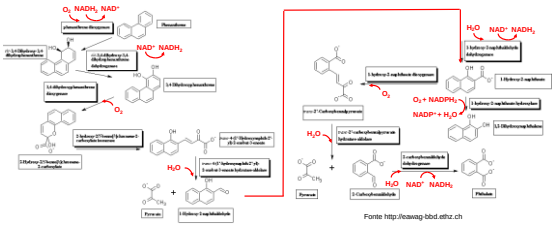
Fonte http://eawag-bbd.ethz.ch

13

Slide 14

Vias metabólicas

Cadeias metabólicas periféricas – degradação aeróbia fenantreno (PAH)



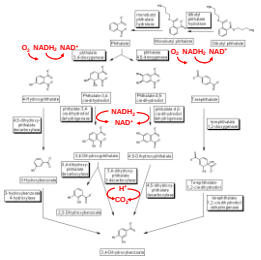
Fonte http://eawag-bbd.ethz.ch

14

Slide 15

Vias metabólicas

Cadeias metabólicas periféricas – degradação aeróbia fenantreno (PAH)



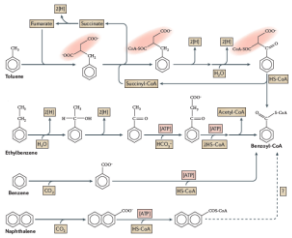
Fonte http://eawag-bbd.ethz.ch

15

Slide 16

Vias metabólicas

Cadeias metabólicas periféricas: degradação anaeróbia hidrocarbonetos aromáticos:



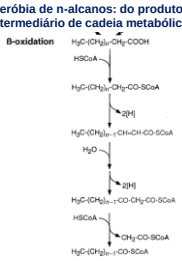
Fonte Fuchs e t al., Nature Ver.Microbiol. 9, 803, 2011

16

Slide 17

Vias metabólicas

Degradação aeróbia e anaeróbia de n-alcanos: do produto da cadeia metabólica periférica ao intermediário de cadeia metabólica universal



Fonte Bouwer & Zehnder, Tibtech 11, 360, 1993

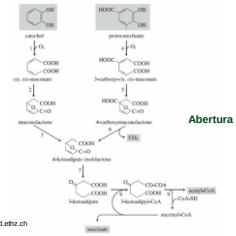
17

Slide 18

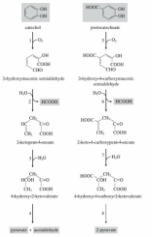
Vias metabólicas

Abertura dos anéis dos compostos aromáticos centrais: aeróbio

Abertura meta



Abertura orto



Fonte http://eawag-bbd.ethz.ch

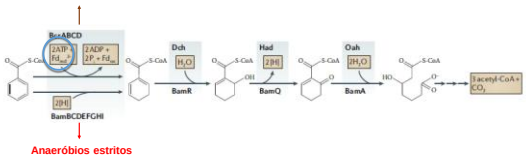
18

Slide 19

Vias metabólicas

Abertura dos anéis dos compostos aromáticos centrais: anaeróbio

Anaeróbios facultativos



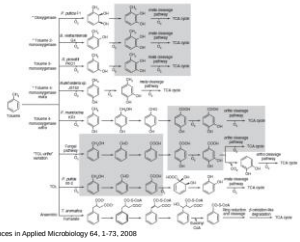
Anaeróbios estritos

Fonte Fuchs e t al., Nature Ver.Microbiol. 9, 803, 2011

Slide 20

Vias metabólicas

Diversidade de vias de biodegradação de tolueno

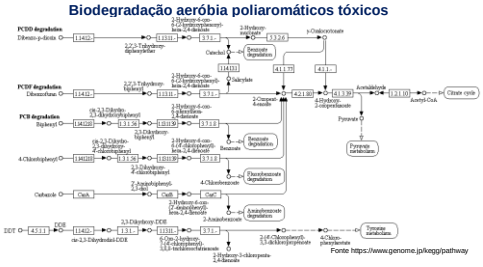


Fonte Parales et al., Advances in Applied Microbiology 64, 1-73, 2008

Slide 21

Vias metabólicas

Biodegradação aeróbia poliaromáticos tóxicos

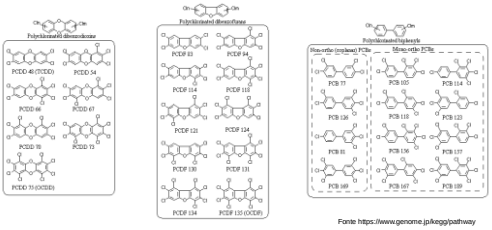


Fonte https://www.genome.jp/kegg/pathway

Slide 22

Vias metabólicas

Biodegradação aeróbia poliaromáticos tóxicos



Fonte https://www.genome.jp/kegg/pathway

22

Slide 23

Vias metabólicas

Biodegradabilidade de poluentes

Melhora da Biodegradabilidade

Hidrocarbonetos alifáticos
- Biodegradabilidade diminui com aumento do comprimento da molécula e aumento do número de ramificações

Hidrocarbonetos aromáticos
- Compostos com um ou dois anéis degradam rapidamente, degradação diminui muito para compostos com mais de 4 anéis

Álcoois, ésteres

Nitrobenzenos e nitroéters

Organoclorados
- Compostos com até três átomos de cloro degradam rapidamente, compostos altamente clorados geralmente recalcitrantes em ambientes aeróbios.

Pesticidas
- Degradação muito variável, depende muito da estrutura da molécula.

23

Slide 24

biochemical-pathways.com/ mapa pioneiro de vias metabólicas

https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map01100 mapa metabólico com poucas vias de degradação de xenobióticos

https://biocyc.org/ mapa metabólico com maior quantidadedevias de degradação de xenobióticos

http://eawag-bbd.ethz.ch/index.html mapa metabólico de vias de biodegradação de xenobióticos, infelizmente última atualização em 2016!

24

Slide 25

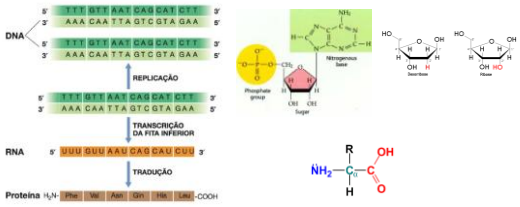
Bioremediação

Genética e Controle Metabólico

Slide 26

Biorremediação: Genética

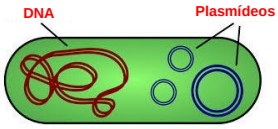
O Dogma Central da Biologia



Slide 27

Biorremediação: Genética

Armazenamento de Informação Genética na Célula Bacteriana



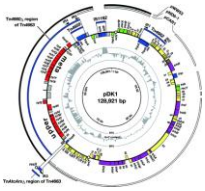
Slide 28

Biorremediação: Genética

Plasmídeos: Elementos Genéticos Móveis

- Fragmentos de DNA circular presentes no citoplasma de certas bactérias;
- Tamanho entre 1000 - 200.000pb
- Plasmídios se replicam independentemente do cromossomo;
- Células podem conter cópias múltiplas do mesmo plasmídio (até ~ 1000);
- Plasmídios são transferíveis entre células pelo processo de conjugação;
- Plasmídios são importantes repositórios de genes de vias catabólicas e de resistência a antibióticos

Plasmídio TOL

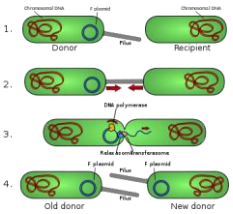


Fonte: Yano et al., J Bacteriology 192, 4337–4347 2010

Slide 29

Biorremediação: Genética

Transferência de Plasmídeos entre Células por Conjugação



Slide 30

Biorremediação: Genética

Plasmídeos Catabólicos

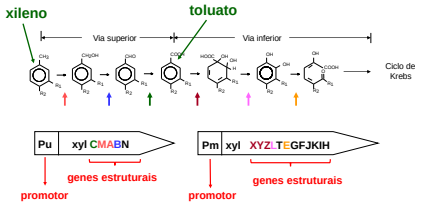
Plasmídeo	Tamanho	Via catabólica	Origem
pSS60	53kb	4-clorobenzoato	*Achromobacter*
pBRC60	75kb	4-clorobenzoato	*Alcaligenes*
pENH91	78kb	3-clorobenzoato	*Ralstonia eutropha*
pJP4	75kb	2,4D	*Ralstonia eutropha*
pTSA	85kb	ácido p-toluenosulfônico	*Comamonas testosteroni*
pP51		clorobenzeno	*Pseudomonas*
P-PS12-1	85kb	1,2,4,5-tetraclorobenzeno	*Burkholderia*
pTOL	129kb	tolueno	Pseudomonas putida

Fonte: Top & Springael Curr Opinion Biotechnol 14, 262–269, 2003

Slide 31

Biorremediação: Genética

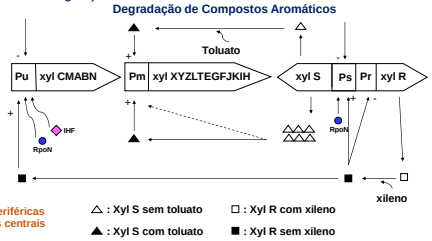
Organização Da Informação Genética
Genes da via de Degradação de Compostos Aromáticos do plasmídio TOL



Slide 32

Biorremediação: Genética

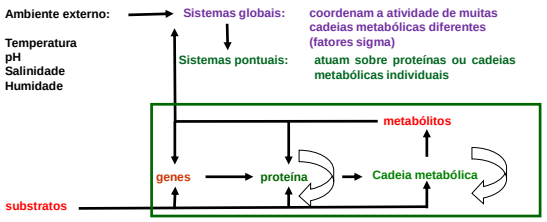
Regulação Metabólica: Sistemas Pontuais e Globais na via de Degradação de Compostos Aromáticos



Slide 33

Biorremediação: Genética

Controle Metabólico



Slide 34

Biorremediação: Genética

Controle da atividade: Fatores sigma (sistemas globais)

Tabela 7.3 Fatores sigma de *Escherichia coli*

Nome[a]	Sequência consenso de reconhecimento a montante[b]	Função
σ^{70} RpoD	TTGACA	Para a maioria dos genes, principal fator sigma durante o crescimento normal
σ^{54} RpoN	TTGGCACA	Assimilação de nitrogênio
σ^{38} RpoS	CCGGCG	Principal fator sigma durante a fase estacionária, também para genes envolvidos em respostas oxidativas e osmóticas
σ^{32} RpoH	TNTCNCCTTGAA[c]	Resposta ao choque térmico
σ^{28} FliA	TAAA	Para genes envolvidos na síntese de flagelos
σ^{24} RpoE	GAACTT	Resposta a proteínas dobradas incorretamente no periplasma
σ^{19} FecI	AAGGAAAAT	Para certos genes envolvidos no transporte de ferro

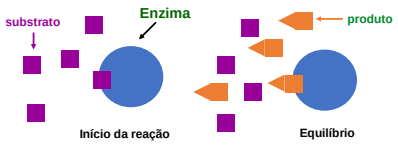
Slide 35

Biorremediação: Genética

Sistemas de Regulação Pontual

Controle da atividade de proteínas:

- **Inibição pelo produto: O produto da reação enzimática compete com o substrato pelo sítio catalítico da enzima.**



Slide 36

Biorremediação: Genética

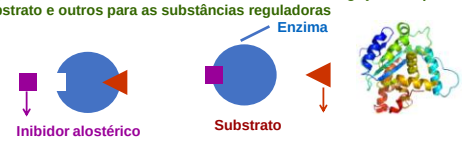
Sistemas de Regulação Pontual

Atuam a nível de proteínas:

- **Pelo controle da atividade**
- **Pelo controle da quantidade**

Controle da atividade de proteínas:

- **Inibição alostérica: enzima com dois ou mais sítios de ligação: um para o substrato e outros para as substâncias reguladoras**



Slide 37

Biorremediação: Genética

Sistemas de Regulação Pontual

Proteína constitutiva:
produzida continuamente pela célula

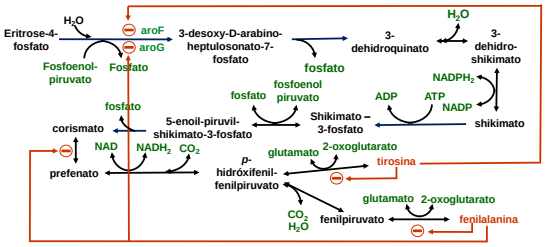
Proteína induzível:
produzida somente na presença de uma substância indutora: indução e repressão de genes

Controle da quantidade de proteínas:

- variação do número de cópias de genes.
- Eficiência da transcrição (promotor forte vs. promotor fraco).
- Estabilidade do RNA mensageiro.
- Eficiência da tradução do mRNA no ribossomo.
- Estabilidade da proteína (tempo médio de vida da proteína).
- Modificações pós-tradução.

Slide 38

Biorremediação: Genética



Slide 39

Biorremediação: Genética

https://www.youtube.com/watch?v=QvNdzLALvkI excelente aula com animações sobre o dogma central da microbiologia (inglês)

https://www.youtube.com/watch?v=J3HVVI2k2No animação dogma central da biologia da nature, estilo star wars (inglês)

https://www.youtube.com/watch?v=l0Vtb350vWA animação regulação transcrição do operon ara (inglês)

https://www.youtube.com/watch?v=uFojTzqQ0po aula sobre regulação da transcrição (português)

https://www.youtube.com/watch?v=N14At2qKQQ8aulasobre transcrição em procariotos (inglês)

https://www.youtube.com/watch?v=zFZYFUAVDFE animação do processo de conjugação para a transferência de plasmídios (inglês)

Slide 40

Biorremediação

Nutrição Bacteriana

Slide 41

Nutrição Microbiana

"So let's get this straight – we work for 24 hours, in these conditions, and for no pay?!?"

Fonte: Gadd & White, Tibtech,11, 353,1993

Slide 42

Nutrição Microbiana

Nutrição Bacteriana na Biorremediação

A manutenção da atividade metabólica de células procarióticas ou eucarióticas na biorremediação deve ocorrer em dois níveis distintos:

- **Crescimento (produção de biomassa);**
  - ⇒ **depende do fornecimento de todos os elementos necessários para a produção de biomassa em configuração compatível com o metabolismo celular.**
- **Atividade metabólica (insumos para a manutenção do metabolismo dos contaminantes).**
  - ⇒ **depende do fornecimento de todos os elementos necessários para a manutenção dos processos metabólicos de biodegradação em configuração compatível com o metabolismo celular.**

Slide 43

Nutrição Microbiana

Macronutrientes (≥0,1% peso seco)

Elemento	% Peso seco	Fonte
C	50	Contaminante ou outra fonte
O	20	Contaminante ou outra fonte
N	14	Frequentemente limitante no ambiente. Contaminante ou outro
H	8	Não depende de fonte específica
P	3	Meio ambiente, contaminante ou fonte específica
S	1	Meio ambiente, contaminante
K	1	Meio ambiente
Na	1,5	Meio ambiente
Mg	0,5	Meio ambiente
Ca	0,5	Meio ambiente
Fe	0,2	Meio ambiente

Slide 44

Nutrição Microbiana

Micronutrientes (<0,1% peso seco)

Elemento	Fonte
Mn	Meio ambiente
Co	Meio ambiente
Cu	Meio ambiente
Mo	Meio ambiente
Zn	Meio ambiente
Ni	Meio ambiente
V	Meio ambiente
Se	Meio ambiente
W	Meio ambiente
B	Meio ambiente

Slide 45

Nutrição Microbiana

Auxotrofia

Auxotrofia: organismos que demandam nutrientes adicionais na forma de moléculas orgânicas devido á sua incapacidade de biossíntese destes compostos

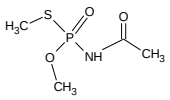
Microorganismo	Fator de crescimento
Haemophilus spp.	Hemina e NAD coenzima I e NADP coenzima II
Lactobacillus spp.	Purinas, pirimidinas, vitaminas e aminoácidos.
Streptococcus lactis	Ácido fólico
Methanobacterium ruminantium	Ácidos graxos de cadeia curta
Mycoplasma	Ácido mevalônico e colesterol
Clostridium Kluyveri	Biotina e ácido p-aminobenzóico
Sacharomyces cerevisae	Biotina
Bacterioides spp.	Vitamina K
Salmonella typhi	Triptofano
Leuconostoc paramesenteroides	Ácido nicotínico, tiamina, biotina

Slide 46

Nutrição Microbiana

Meios de Cultura: Fontes de Nutrientes

- Maioria dos elementos indisponíveis na forma elementar, com exceção dos metais solúveis.
- Nutrientes são incorporados na célula através de moléculas ou em complexos químicos.
- Certos compostos podem satisfazer simultaneamente a demanda de diferentes elementos.

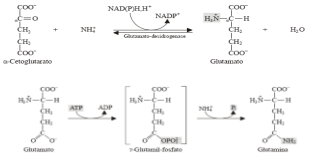


Acefato

Slide 47

Nutrição Microbiana

Fontes de Nitrogênio: NH_4^+, NO_3^-



$NO_3^- + 2NADH_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O$

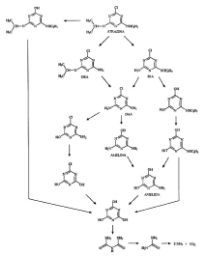
$NO_2^- + 6e^-$ (Ferredoxina) $\rightarrow NH_4^+ + 2H_2O$

Slide 48

Nutrição Microbiana

Fontes de Nitrogênio: N orgânico

- Convertido em amônia em vias metabólicas de biodegradação, que é assimilada pela via já citada do α-cetoglutarato.
- Ex de biodegradação: atrazina.



Slide 49

Nutrição Microbiana

Nutrição Bacteriana na Biorremediação

- **Aceptores finais de elétrons:** oxigênio, nitrato, sulfato,etc., consumidos em grande quantidade
- **Água** suficiente para garantir o crescimento e metabolismo;
- **pH** adequado para crescimento;
- **Salinidade** adequada;
- **Temperatura** adequada

Slide 50

Biorremediação

Crescimento Microbiano

Slide 51

Crescimento Microbiano

Crescimento microbiano

Crescimento individual da célula:

Multiplicação de uma célula individual. Engloba todos os processo fisiológicos que permitem o aumento da biomassa celular

Crescimento da população

Crescimento de uma população de células microbianas

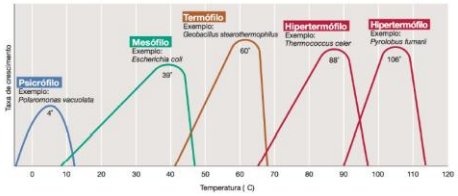
⇨ **Divisão binária**

51

Slide 52

Crescimento Microbiano

Crescimento microbiano: Temperatura



Fonte: Microbiologia de Brock,12. Ed,2010

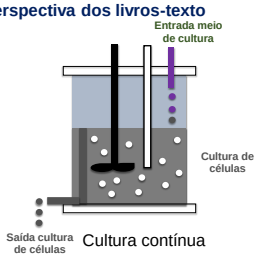
52

Slide 53

Crescimento Microbiano

Crescimento microbiano: A perspectiva dos livros-texto

Batelada



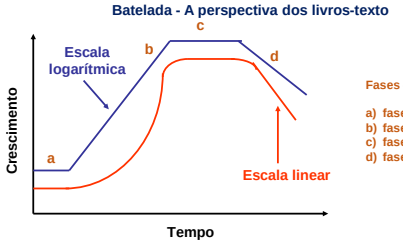
Cultura contínua

53

Slide 54

Crescimento Microbiano

Crescimento microbiano
Batelada - A perspectiva dos livros-texto



Fases de crescimento:

a) fase "lag",
b) fase exponencial,
c) fase estacionária,
d) fase de declínio

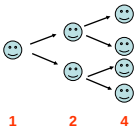
54

Slide 55

Crescimento Microbiano

Crescimento microbiano
Batelada - A perspectiva dos livros-texto
Fase log
crescimento logarítmico da população de microrganismos

⇒ nenhum fator externo ou componente do meio pode ser limitante para o crescimento microbiano.



$x = x_0\, 2^n$

$\log x = \log x_0 + \log 2^n$

$\log x = \log x_0 + n \log 2$

$\log x = \log x_0 + n\, 0{,}301$

g: tempo de geração

t: tempo transcorrido para a produção de n gerações

n: número de gerações

$$n = \frac{t}{g}$$

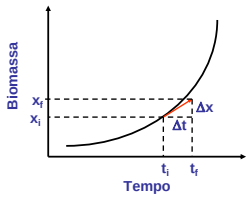
$$\log x = \log x_0 + \frac{t}{g}\, 0{,}301$$

55

Slide 56

Crescimento Microbiano

Curvas de crescimento: Notação genérica



1. Passo:

Divisão da curva de crescimento em segmentos pequenos, onde a alteração da biomassa em função do tempo Dt possa ser aproximada por uma reta.

2. Passo:

Montagem da equação da reta neste ponto:

$$\Delta x = \mu x \Delta t$$

56

Slide 57

Crescimento Microbiano

Curvas de crescimento: Notação genérica

3. Passo:

Rearranjar equação:

$$\frac{\Delta x}{x} = \mu \Delta t$$

4. Passo:

Diminuir os intervalos para intervalos infinitamente pequenos:

$$\frac{dx}{x} = \mu dt$$

5. Passo:

Resolver equação:

$$\int_{x_0}^{x} \frac{dx}{x} = \int_{t_0}^{t} \mu dt$$

$$\ln x - \ln x_0 = \mu (t - t_0)$$

como $t_0 = 0$ $\quad \ln x = \ln x_0 + \mu t$

$$\boxed{x = x_0\, e^{\mu t}}$$

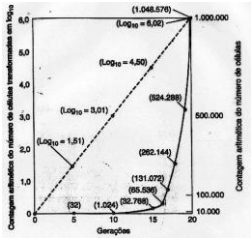
μ = taxa específica de crescimento (t^{-1})

57

Slide 58

Crescimento Microbiano

Curvas de crescimento



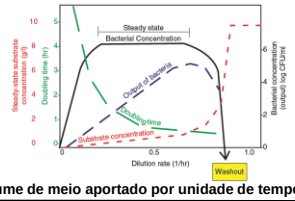
Notação exponencial vs. Não-exponencial

Slide 59

Crescimento Microbiano

Crescimento microbiano: A perspectiva dos livros-texto

$\mu = D$



$$D\ (t^{-1}) = \frac{\text{Volume de meio aportado por unidade de tempo (l/h)}}{\text{Volume de meio no reator}}$$

Slide 60

Crescimento Microbiano

A relação entre taxa de crescimento e concentração de substrato

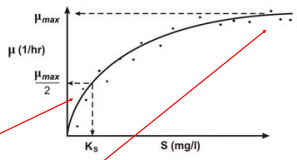
Equação de Monod:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} SX}{K_s + S}$$

$$S << K_s: \quad \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} SX}{K_s}$$

$$S >> K_s: \quad \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X$$



Slide 61

Crescimento Microbiano

A relação entre taxa de transformação e concentração de substrato

composto	sMMO Ks (μm)	sMMO Vmax (nmol/minmgproteína)	pMMO Ks (μm)	pMMO Vmax (nmol/minmgproteína)
Metano	92	726	19	450
Clorometano	-	-	11	15
1,2-diclorometano	77	130	-	-
1,1,1-triclorometano	214	48	-	-
Cloreto de vinila	2100	26	42	
trans-dicloroetileno	148	662	42	61
Cis-dicloroetileno	364	0,8	0,12	
1,1diclorometileno	5	12	0,8	0,12
1,1,1-tricloroetileno	145	580	7,9	4,1

Fonte: Semrau et al., FEMS Microbiol Rev 34 496–531, 2010

sMMO: metano-monooxygenase solúvel
pMMO: metano-monooxygenase particulada

A relação entre consumo de substrato e produção de biomassa

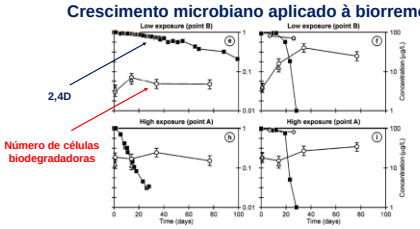
$$Y\ (-) = \frac{\text{Biomassa produzida (g)}}{\text{Quantidade de substrato consumido (g)}}$$

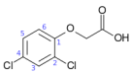
61

Slide 62

Crescimento Microbiano

Crescimento microbiano aplicado à biorremediação





2,4D (Herbicida)

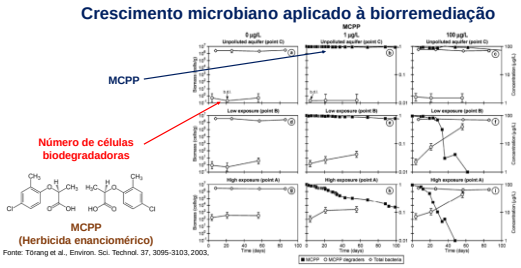
Fonte: Törang et al., Environ. Sci. Technol. 37, 3095-3103, 2003,

62

Slide 63

Crescimento Microbiano

Crescimento microbiano aplicado à biorremediação



MCPP
(Herbicida enanciomérico)

Fonte: Törang et al., Environ. Sci. Technol. 37, 3095-3103, 2003,

63

Slide 64

Crescimento Microbiano

Crescimento microbiano aplicado à biorremediação

- Concentrações de contaminantes biodegradáveis <<<Ks;
- Presença de microrganismos competidores;
- Disponibilidade de diferentes substratos;
- Limitação na disponibilidade de nutrientes essenciais;
- Maioria das bactérias aderidas nas superfícies formando biofilmes;
- Presença de inibidores.

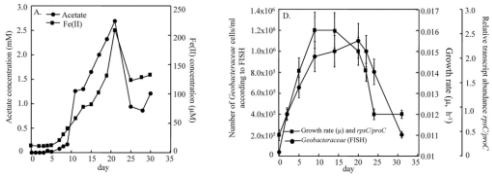
⇒ Crescimento lento de microrganismos devido a substratos limitantes;
⇒ Crescimento lento de microrganismos devido àpresençade inibidores;
⇒ Alternação entre fases de disponibilidade e falta de substratos;
⇒ Predação pode ter impacto elevado na população de biodegradadores;
⇒ Bacteriófagos podem influenciar população de biodegradadores;
⇒ Microrganismos metabolizam vários substratos diferentes simultaneamente;
⇒ Poluente pode ser degradado sem depender do crescimento das células

64

Slide 65

Crescimento Microbiano

Taxa de crescimento de Geobacteraceae em aquífero contaminado com U(VI) após bioestimulação com acetato



Fonte: Holmes et al., Appl Env Microbiol 79 1646 –1653 2013

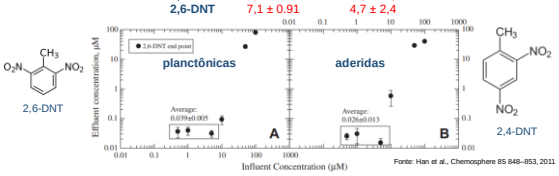
65

Slide 66

Crescimento Microbiano

Concentração mínima para crescimento microbiano com contaminantes

Composto	Limites (μg/L) planctônico	Limites (μg/L) aderido
2,4-DNT	9,8 ± 0.91	10,4 ± 1,5
2,6-DNT	7,1 ± 0.91	4,7 ± 2,4



Fonte: Han et al., Chemosphere 85 848–853, 2011

66