



Universidade de Aveiro Departamento de Ambiente e Ordenamento
2008

Daniel Manuel da Silva Marques **Medição de celulose em partículas do aerossol interior**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, realizada sob a orientação científica do Dr. Mário Miguel Azevedo Cerqueira, Professor Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha família pelo incansável apoio. Assim como aos meus amigos e colegas de curso que me acompanharam ao longo deste período.

o júri

presidente

Prof. Dra. Ana Isabel Couto Neto da Silva Miranda

Professora Associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Mário Miguel Azevedo Cerqueira

Professor Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Dmitry Victorovitch Evtyugin

Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Quero agradecer ao meu orientador, Professor Mário Cerqueira, pela forma activa como participou nesta tese; pela disponibilidade que sempre demonstrou independentemente do horário em que era solicitado; pelos conhecimentos técnicos fornecidos para a optimização do procedimento experimental; pelas colheitas de amostras realizadas na sua habitação; e, finalmente, pela revisão final da tese. Ao Alexandre Caseiro, pelos conhecimentos técnicos específicos prestados sobre o procedimento de determinação da celulose; pelos momentos de troca de ideias, e pelo fornecimento de artigos científicos específicos sobre o tema. À Professora Teresa Nunes, pelo fornecimento das amostras de ar interiores das residências e pelo procedimento técnico sobre a recolha e determinação da massa de partículas. Ao Daniel Coelho e Ricardo Carvalho pelas colheitas de partículas no interior das residências universitárias, e finalmente às Técnicas Lurdes Salgueiro e Manuela Marques pelo apoio prestado nas tarefas laboratoriais.

palavras-chave

ar interior, aerossol orgânico, celulose, biopolímeros, análise enzimática

resumo

As concentrações de partículas em suspensão na atmosfera (PM_{10}) e o seu conteúdo em “celulose livre” foram determinadas em amostras recolhidas em três locais distintos do concelho de Aveiro. Para as recolhas de partículas utilizaram-se dois amostradores de baixo caudal, com tempos de amostragem que variaram entre 12 e 24 h e com funcionamento simultâneo em ambiente interior e exterior. As concentrações de partículas foram determinadas por gravimetria, enquanto a “celulose livre” foi determinada por sacarificação enzimática e análise sob a forma de D-glucose. As concentrações médias de PM_{10} no ar interior e exterior foram 29,4 e 20,4 $\mu\text{g m}^{-3}$, respectivamente. Por sua vez, as concentrações médias de “celulose livre” no ar interior e exterior foram 1,47 e 0,12 $\mu\text{g m}^{-3}$, respectivamente. Os correspondentes teores de celulose nas partículas do aerossol foram, em média, 5,6 e 1,1 %, indicando que este polímero contribuía de um modo mais expressivo para a massa de partículas em suspensão no ar interior do que no ar exterior: A explicação para estes resultados parece residir nas fontes de partículas em ambientes interiores, nomeadamente a manipulação de vestuário e carpetes contendo algodão na sua composição. Para um dos ambientes interiores procedeu-se ainda à determinação simultânea das concentrações de “celulose livre” em partículas com duas classes de tamanhos ($PM_{2,5}$ e PM_{10}). Os resultados obtidos mostraram que a maior parte da “celulose livre” se encontrava associada à fracção grosseira do aerossol ($PM_{2,5-10}$).

keywords

indoor air, organic aerosol, cellulose, biopolymers, enzymatic analysis

abstract

The atmospheric concentrations of particulate matter (PM_{10}) and the corresponding content of "free cellulose" were determined in samples taken at three different locations in the municipality of Aveiro. Indoor and outdoor aerosol particles were collected simultaneously with low volume samplers, during 12 to 24 h sampling periods. The concentration of particles was determined by gravimetry, while the "free cellulose" content was determined by enzymatic saccharification followed by analysis in the form of D-glucose. The average concentrations of PM_{10} were 29,4 and 20,4 $\mu\text{g m}^{-3}$, in indoor and outdoor air, respectively. In turn, the average concentrations of "free cellulose" were 1,47 and 0,12 $\mu\text{g m}^{-3}$, respectively. The corresponding content of cellulose in aerosol particles was, on average, 5,6% and 1,1%, suggesting that this polymer is a greater contributor to the indoor aerosol mass than to the outdoor aerosol mass. The explanation for these results seems to lie in indoor aerosol sources, particularly the manipulation of garments and carpets, which contain a significant amount of cotton in their composition. For one of the indoor locations "free cellulose" was additionally determined in two aerosol particle classes ($PM_{2,5}$ and PM_{10}). The results have shown that the major part of "free cellulose" was associated with the aerosol coarse fraction ($PM_{2,5-10}$).

Símbolos e abreviaturas

ADP	- adenosina-5'-difosfato
APA	- Agência Portuguesa do Ambiente
ATP	- adenosina-5'-trifosfato
CO	- monóxido de carbono
COV's	- compostos orgânicos voláteis
DAO	- Departamento de Ambiente e Ordenamento
DP	- desvio padrão
EEA	- <i>Environmental European Agency</i>
EPA	- <i>Environmental Protection Agency</i>
G-6-P	- glucose-6-fosfato
G6P-DH	- glucose-6-fosfato desidrogenase
GP	- grau de polimerização
HK	- hexoquinase
HPLC	- cromatografia líquida de alta pressão
ISO	- <i>International Standards Organization</i>
MP	- material particulado
NADP ⁺	- nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
NADPH	- nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reduzido
NO ₂	- dióxido de azoto
NO _x	- óxidos de azoto
O ₃	- ozono
PM _{2,5}	- material particulado com diâmetro aerodinâmico equivalente inferior a 2,5 µm
PM ₁₀	- material particulado com diâmetro aerodinâmico equivalente inferior a 10 µm
PM _{2,5 - 10}	- material particulado com diâmetros aerodinâmicos equivalentes compreendidos entre 2,5 e 10 µm
QUARG	- <i>Quality of Urban Air Review Group</i>
REA	- Relatório do Estado do Ambiente
SO ₂	- dióxido de enxofre
SY	- rendimento da Sacarificação
<i>et al.</i>	- e outros (do Latim <i>et alia</i>)
<i>etc.</i>	- e outras coisas mais (do Latim <i>et caetera</i>)

Índice do Texto

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento.....	1
1.2	Objectivos.....	3
1.3	Organização da dissertação	4
2	O aerossol atmosférico	5
2.1	Definição	5
2.2	Origem.....	7
2.2.1	Fontes primárias.....	7
2.2.2	Fontes secundárias.....	8
2.3	Efeitos dos aerossóis no ambiente.....	9
2.4	O aerossol interior	12
3	Química da celulose e ocorrência nas partículas do aerossol.....	15
3.1	Química da celulose e de compostos afins.....	15
3.1.1	Celulose	15
3.1.2	Hemicelulose	16
3.1.3	Lenhina	17
3.1.4	Glucose	17
3.1.5	Celobiose	18
3.2	Celulose nas partículas do aerossol	19
3.3	Métodos de medição de celulose aplicados à química do aerossol.....	21
4	Procedimento Experimental	25
4.1	Locais de amostragem	25
4.2	Métodos de Amostragem.....	27
4.3	Procedimento de análise da celulose.....	30
4.3.1	Deslenhificação.....	30
4.3.2	Sacarificação.....	31
4.3.3	Determinação da D-Glucose.....	31
5	Resultados e Discussão	35
5.1	Rendimento da sacarificação.....	35
5.2	Limites de Detecção	40
5.3	Reprodutibilidade do método	42
5.4	Concentrações de celulose nas partículas do aerossol.....	44
5.4.1	Residências universitárias.....	44
5.4.2	Departamento de Ambiente e Ordenamento.....	47
5.4.3	Morada (Cacia).....	50
5.4.4	Apartamento (Vera-Cruz).....	53
5.5	Resumo dos resultados obtidos e comparação com outros estudos	58
5.6	Influência da celobiose nas determinações de celulose em partículas do aerossol	62
6	Conclusões e recomendações	65
7	Referências Bibliográficas	69
	Anexos	

Índice de Tabelas

Tabela I Resumo das amostragens de aerossóis efectuadas neste estudo.....	29
Tabela II – Rendimentos médios do processo de sacarificação obtidos com diferentes variantes do método de Kunit e Puxbaum (1996).	36
Tabela III – Resultados das três series de determinação com filtros brancos.	40
Tabela IV – Valores médios e correspondentes desvios-padrão das concentrações de PM ₁₀ , PM _{2,5} e celulose determinadas neste estudo.	58

Índice de Figuras

Figura - 1. Tamanho relativo de um grão de areia, um grão de farinha e uma partícula fina inferior a 2,5 μm	5
Figura - 2. O efeito da iluminação na aparência dos penachos.....	9
Figura - 3. Principais factores que influenciam a qualidade do ar interior, apresentados por divisão da habitação.....	12
Figura - 4. Fórmula estrutural do fragmento de um polímero de celulose.....	16
Figura - 5. Fórmula de estrutura da D-glucose.....	17
Figura - 6. Amostrador Tecora ECHO PM.....	27
Figura - 7. Formatos das cabeças de amostragem utilizadas nas amostragens.....	28
Figura - 8. Relação entre a massa de celulose quantificada pelo método de Kunit e Puxbaum (1996) e a massa de celulose pesada.....	34
Figura - 9. Concentrações de celulose obtidas em réplicas da primeira amostra recolhida com um amostrador de alto caudal.....	42
Figura - 10. Concentrações de celulose obtidas em réplicas da segunda amostra recolhida com um amostrador de alto caudal.....	43
Figura - 11. Concentrações de PM_{10} no ar interior das residências universitárias.....	45
Figura -12. Concentrações de celulose no ar interior das residências universitárias.....	46
Figura -13. Relação entre as concentrações de celulose e PM_{10} no ar interior das residências universitárias.....	46
Figura - 14. Concentrações obtidas para as medições de PM_{10} no ar interior e exterior do edifício de laboratórios do Departamento de Ambiente.....	47
Figura -15. Concentrações de celulose no ar exterior e interior do edifício dos laboratórios do Departamento de Ambiente e Ordenamento.....	48
Figura - 16. Relação entre as concentrações de celulose e PM_{10} no ar interior e exterior do edifício dos laboratórios do Departamento de Ambiente e Ordenamento.....	49
Figura - 17. Concentrações de partículas amostradas no ar interior e exterior da moradia de Cacia.....	50
Figura - 18. Concentrações de celulose nas partículas amostradas no ar interior e exterior da moradia de Cacia.....	51
Figura - 19. Relação entre as concentrações de celulose e partículas amostradas no ar interior e exterior da moradia de Cacia.....	52
Figura - 20. Concentrações de partículas finas ($\text{PM}_{2,5}$) e grosseiras ($\text{PM}_{2,5-10}$) no ar interior do apartamento da Vera-Cruz.....	53
Figura - 21. Concentrações de celulose em partículas finas e grosseiras no ar interior do apartamento da Vera-Cruz.....	54
Figura - 22. Relação entre as concentrações de celulose e a massa de partículas finas e grosseiras em suspensão no apartamento da Vera-Cruz.....	55
Figura - 23. Concentrações de partículas PM_{10} no ar interior e exterior do apartamento da Vera Cruz.....	56
Figura - 24. Concentrações de celulose no ar interior e exterior do apartamento da Vera-Cruz.....	57
Figura - 25. Relação entre as concentrações de celulose e PM_{10} no ar interior e exterior do apartamento da Vera-Cruz.....	57
Figura - 26. Comparação entre as massas equivalentes de celulose usando os três métodos de medição diferentes. As linhas horizontais correspondem ao valor médio das 10 determinações.....	63

1 Introdução

1.1 Enquadramento

A protecção do ambiente e da saúde constitui um dos maiores desafios que se colocam às sociedades modernas. As preocupações associadas à qualidade do ar e aos seus efeitos na saúde pública encontram-se geralmente relacionadas com a poluição atmosférica no exterior dos edifícios. No entanto, as pessoas passam a maior parte do seu tempo em ambientes interiores, nomeadamente em habitações, transportes, locais de trabalho, zonas comerciais, edifícios de lazer, entre outros. (APA, 2008). Sucede que o ar interior se encontra frequentemente contaminado com agentes de natureza química, física e biológica, com origens muito diversas: confecção de alimentos, consumo de tabaco, produtos de limpeza, materiais de construção de edifícios e mobiliário, equipamentos eléctricos e electrónicos, aparelhos de ar condicionado, manipulação e queima de combustíveis, manipulação de vestuário, *etc.*

Até ao presente, a maior parte dos estudos sobre a composição do ar interior tem incidido sobre a presença de compostos gasosos e de microrganismos transmissores de doenças. Existe também alguma informação sobre a massa de partículas em suspensão no ar interior e a sua distribuição por tamanhos. Mais escassos são os trabalhos que incidem sobre a natureza química do aerossol, o que, de alguma forma, condiciona as possibilidades de actuação quando se pretende limitar a emissão por fontes de partículas em espaços interiores.

Há pouco mais de uma década, dois investigadores austríacos aplicaram com sucesso uma técnica de medição de celulose a partículas do aerossol, tendo reportado as primeiras concentrações deste polímero numa atmosfera urbana exterior (Kunit e Puxbaum, 1996). Naquele estudo, os autores sugeriram ainda que a celulose poderia ser a substância mais importante da fracção orgânica insolúvel dos aerossóis atmosféricos. Mais recentemente, os mesmos autores (Puxbaum e Tenze-Kunit, 2003) utilizaram a celulose como um traçador da presença de detritos de matéria vegetal em amostras de aerossóis recolhidas numa atmosfera exterior, recorrendo, para o efeito, a uma estimativa da fracção

mássica média daquele polímero nas folhas das plantas. Os resultados mostraram que as partículas de origem vegetal poderiam explicar cerca de 16% da matéria orgânica insolúvel presente nos aerossóis.

Os resultados obtidos nestes dois estudos e a simplicidade da técnica usada pelos seus autores serviram de motivação para a realização do presente trabalho, na medida em que havia pouca informação sobre a química do aerossol interior e, por outro lado, havia a percepção de que a celulose poderia ser um constituinte importante para a massa de partículas suspensas em espaços interiores.

1.2 Objectivos

Em face dos argumentos anteriormente apresentados, a presente dissertação teve como objectivo principal a caracterização do teor de celulose em partículas do ar interior. Como objectivos específicos pretendeu-se:

- implementar uma técnica de análise química de celulose em partículas do aerossol atmosférico;
- caracterizar as concentrações mássica e de celulose das partículas do aerossol em diversos espaços interiores e compará-las, sempre que possível, com medições simultâneas em partículas do aerossol exterior;
- avaliar o contributo da celulose para a massa de partículas do aerossol em ambientes interiores e exteriores;
- ampliar o conhecimento sobre a origem da celulose nas partículas do aerossol atmosférico.

1.3 Organização da dissertação

Esta dissertação encontra-se organizada em 7 capítulos e anexos. No Capítulo 1 é apresentado o tema proposto, são definidos os objectivos principais e é apresentada a estrutura da dissertação.

No Capítulo 2 define-se o conceito de aerossol e apresentam-se considerações gerais sobre as partículas atmosféricas, em particular aspectos relacionados com a sua génese, implicações sobre o ambiente e a saúde e ainda a ocorrência em espaços interiores.

O Capítulo 3 descreve as características químicas mais relevantes da celulose, dos compostos que lhe estão associados na biomassa vegetal e ainda dos compostos em que se pode dissociar quando ocorre a sua análise. Procede-se igualmente a uma revisão de conhecimentos sobre a ocorrência de celulose em partículas do aerossol e apresentam-se alguns procedimentos normalmente empregues na determinação da celulose em amostras de biomassa vegetal.

Para o Capítulo 4 ficou reservada a descrição dos locais de amostragem, dos métodos de colheita do aerossol e ainda do processo de determinação de celulose pelo método de Puxbaum e Tenze-Kunit (2003).

O Capítulo 5 é dedicado à apresentação dos resultados, incluindo o rendimento da sacarificação, o limite de detecção, a reprodutibilidade do método e as concentrações atmosféricas de partículas e de celulose nos diferentes ambientes caracterizados.

As conclusões e recomendações são expostas no Capítulo 6.

A dissertação é complementada com uma lista das referências bibliográficas e com os anexos, onde se apresentam, pormenorizadamente, o processo de determinação da concentração de celulose nos aerossóis, a forma como foi efectuada a calibração dos amostradores de baixo caudal, o procedimento de lavagem do material e o artigo de Puxbaum e Tenze-Kunit (2003), que constitui a base do estudo aqui apresentado.

2 O aerossol atmosférico

Ao longo deste capítulo é definido o conceito de aerossol e são tecidas algumas considerações gerais sobre a poluição por partículas, devido à sua importância no desenrolar do trabalho.

2.1 Definição

O termo aerossol designa suspensões relativamente estáveis de partículas sólidas ou gotículas dispersas num gás. Em qualquer dos casos, partículas e gotículas apresentam dimensões inferiores a 100 μm e superiores ao tamanho de moléculas individualizadas ($>0,001 \mu\text{m}$). Sob a designação de aerossóis incluem-se as neblinas, fumos, poeiras, névoas, nevoeiros, ou *sprays*. Por uma questão de facilidade de comunicação, o termo aerossol é muitas

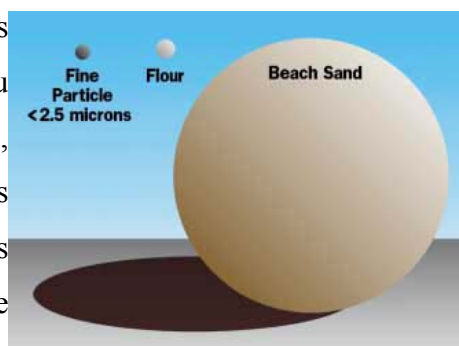


Figura - 1. Tamanho relativo de um grão de areia, um grão de farinha e uma partícula fina inferior a 2,5 μm .
Fonte: Malm (1999).

vezes referido com o mesmo significado que partículas suspensas (Wilson *et al.*, 2004). Nesta dissertação foi considerada esta aproximação, ou seja, partículas e partículas suspensas são ambas referências ao termo aerossol.

O tamanho das partículas do aerossol desempenha um papel fundamental na química da atmosfera, no transporte de poluentes e nos efeitos sobre a saúde humana. Geralmente, as partículas com diâmetros superiores a 2,5 μm são identificadas como partículas grosseiras, enquanto as partículas com diâmetros inferiores a 2,5 μm são designadas por partículas finas. Estas últimas podem ser posteriormente divididas em partículas com diâmetros entre 0,08 e 1-2 μm , conhecidas como modo de acumulação, e aquelas com diâmetros entre 0,01 e 0,08 μm , conhecidas como transição ou núcleos de *Aitken* (Finlayson-Pitts e Pitts, 1999). A Figura 1 apresenta uma relação de tamanhos entre um grão de areia e uma partícula fina, onde se pode averiguar a diferença de tamanhos entre estes dois tipos de partículas.

Para que se percebam os efeitos das partículas que entram no sistema respiratório humano é necessário recorrer a um equipamento que simule a eficiência com que as partículas entram pelo nariz e a boca, até alcançarem as zonas do corpo humano mais susceptíveis de sofrerem lesões.

Nas décadas de 80 e 90, a *International Standards Organisation* (ISO) definiu um conjunto de convenções para a amostragem de partículas com efeitos na saúde, tanto na atmosfera ambiente como em locais de trabalho. De acordo com o estabelecido por aquela organização, a “fracção torácica” é definida como a fracção mássica do total de partículas inaláveis que entram no sistema respiratório para além da laringe, alcançando o tórax. Quando referenciada ao total de partículas em suspensão na atmosfera, a “fracção torácica” é traduzida por uma função cumulativa lognormal com um diâmetro aerodinâmico mediano de 10 μm e um desvio padrão geométrico de 1,5. De igual modo é definida a “fracção respirável”, que corresponde à fracção de partículas inaladas capaz de penetrar até à região alveolar. Estas convenções, designadas geralmente por PM_{10} e $\text{PM}_{2,5}$, em termos de monitorização, correspondem às fracções de partículas que passam através de uma cabeça de amostragem com uma eficiência de corte de 50% a diâmetros aerodinâmicos de 10 e 2,5 μm , respectivamente (QUARG, 1996).

2.2 Origem

As partículas atmosféricas podem ser classificadas quanto, à sua origem, em dois grandes grupos: as partículas primárias, que são emitidas directamente para a atmosfera; e as secundárias, que se formam por reacções químicas na atmosfera. Em ambas as classes de partículas é ainda possível classificá-las, quanto ao tipo de fonte, em partículas com origem antrópica e partículas com origem natural.

2.2.1 Fontes primárias

As principais fontes de emissão de partículas primárias geradas por acção humana são o sector residencial (principalmente a queima de madeira), o transporte rodoviário, o sector eléctrico público e a produção de calor (EEA, 2007a). Em meio urbano, estas partículas primárias têm origem predominante nas emissões de tráfego, em particular nos veículos a gasóleo (REA, 2007). Por outro lado, praticamente todos os processos industriais são responsáveis pela emissão de partículas, em especial os seguintes: siderurgias, fundições primárias de metais, fundições de ferro, produção de cimento, processamento de rochas, tratamento de carvão, produção de asfaltos, produção de minerais, refinação de petróleo, processos químicos, processamento de cereais, produção de papel e pasta de celulose, combustíveis, entre outros.

No que se refere aos processos naturais, destaca-se a suspensão de partículas do solo em todas as regiões de clima seco, mas com maior ênfase para as desérticas. Os desertos do Sahara, do Sahel e as regiões desérticas do continente asiático são áreas geográficas de reconhecida importância na génese de poeiras atmosféricas.

Outra fonte natural com grande significado são os oceanos, cuja turbulência liberta gotículas de água para a atmosfera (o chamado *spray* marinho), as quais, por evaporação da água, se transformam em partículas de sal. Estas partículas podem ascender na atmosfera e actuar como núcleos de condensação das nuvens.

Embora limitadas no espaço e no tempo, as emissões vulcânicas são consideradas uma fonte natural de grande importância, devido à elevada quantidade de matéria particulada lançada na atmosfera durante uma erupção.

Ainda no que se refere a partículas naturais, merecem destaque as que possuem origem biológica. Neste caso, inclui-se material viável, como os pólenes, esporos, microrganismos e insectos, e inviável, como os detritos vegetais, libertados directamente pelas plantas ou por decaimento de substratos vegetais.

Por fim, refiram-se ainda as emissões de partículas para a atmosfera quando ocorrem incêndios florestais. Estas emissões podem ter uma importância regional ou continental e apresentam partículas com dimensões maioritariamente pequenas ($<0,05 \mu\text{m}$).

Como decorre do tipo de fontes anteriormente descrito, a composição química das partículas primárias é muito diversa. Já no que se refere às dimensões destas partículas, e com a excepção das que são geradas pelos incêndios florestais, na sua maioria apresentam tamanhos superiores a $2,5 \mu\text{m}$, pelo que são classificadas como grosseiras.

2.2.2 Fontes secundárias

As partículas secundárias resultam de reacções complexas entre substâncias químicas na atmosfera. Em zonas urbanas e industriais, gases emitidos em grande escala, como o dióxido de enxofre (SO_2) e os óxidos de azoto (NO_x) são importantes precursores de partículas de ácido sulfúrico e nítrico, cujas dimensões ($<2,5 \mu\text{m}$) permitem o seu transporte a longas distâncias do local de emissão.

Em zonas rurais, as emissões de compostos orgânicos voláteis (COV's) pela vegetação são também responsáveis pela génese de partículas secundárias do aerossol, através de mecanismos reactivos complexos onde intervêm também os NO_x e dos quais resulta igualmente ozono (O_3) troposférico.

2.3 Efeitos dos aerossóis no ambiente

A presença de matéria particulada na atmosfera pode ter efeitos directos e indirectos sobre o ambiente.

Os efeitos directos da presença do aerossol atmosférico no ambiente incluem o aumento da reflexão e/ ou da absorção da energia solar, com as consequentes alterações no balanço climático terrestre, a diminuição da visibilidade e alterações na química da precipitação. Suspeita-se ainda que as partículas possam participar na formação de ozono troposférico e na produção de *smog* fotoquímico (Jacobson *et al.*, 2000).

A característica mais óbvia da ocorrência de poluição do ar é a perda de visibilidade, o que se deve primariamente à presença de partículas suspensas, que realizam uma dispersão eficiente da luz solar. A dispersão da luz traduz-se em efeitos directos no clima, na medida em que altera a quantidade de radiação solar que chega à superfície terrestre (Finlayson-Pitts e Pitts, 1999).

A degradação da visibilidade ocorre sempre que as partículas apresentam um tamanho comparável ao comprimento de onda da luz visível, o que se deve a fenómenos de dispersão e absorção da radiação solar durante a transmissão através da atmosfera. A dispersão por partículas finas de natureza orgânica pode ser responsável por mais de 60% da dispersão, principalmente em zonas urbanas.



Figura - 2. O efeito da iluminação na aparência dos penachos. Fonte: Malm (1999).

O aerossol pode apresentar um conteúdo importante em compostos orgânicos, responsável por processos de absorção e reflexão da radiação solar, e conter ainda uma fracção de carbono elementar (tipo grafitico), que contribui somente para a absorção da radiação solar. Todavia a importância relativa das diferentes formas de carbono no aerossol, bem como o seu contributo para o balanço climático estão ainda por esclarecer (Jacobson *et al.*, 2000).

A Figura 2 pretende ilustrar o efeito das partículas do aerossol ao interceptarem a radiação solar. A imagem apresenta quatro penachos: os dois da direita são principalmente gotas de água, os dois da esquerda são cinzas volantes. Visualmente, existem diferenças entre os dois da direita (compostos por gotas de água). O primeiro penacho é iluminado pelo Sol (o penacho mais a direita) e o segundo encontra-se na sombra dos dois da esquerda. O primeiro penacho aparenta ser branco enquanto o segundo parece ser cinzento (Malm, 1999).

Por sua vez, os efeitos indirectos tanto podem decorrer da presença das partículas na atmosfera, como ser o resultado da sua deposição sobre a superfície terrestre. Como exemplo da primeira situação, tem-se a interferência das partículas no balanço radiativo global através da formação de nuvens. Já no que se refere à segunda situação, convém notar que as partículas mais pequenas possuem um tempo de vida na atmosfera que permite o seu transporte a longas distâncias através do vento, vindo a depositar-se no solo ou na água. O efeito desta deposição pode traduzir-se na acidificação de lagos e rios, em mudanças no equilíbrio de nutrientes em águas costeiras, na remoção de nutrientes dos solos, na destruição de florestas e colheitas agrícolas, ainda e na perturbação da diversidade dos ecossistemas (EPA, 2007).

2.4 Efeitos dos aerossóis na saúde

O tamanho das partículas está directamente relacionado com o seu potencial para causar problemas de saúde. As partículas com diâmetros inferiores a 10 μm podem atingir o sistema respiratório superior, enquanto as partículas mais finas, com diâmetros inferiores a 2,5 μm , podem alcançar as zonas mais interiores do sistema respiratório e mesmo introduzir-se na corrente sanguínea (EEA, 2007b).

Vários estudos científicos relacionam a exposição à poluição por matéria particulada com uma variedade de problemas de saúde. De entre estes destacam-se: o aumento da frequência de problemas respiratórios, como irritação nas vias respiratórias, tosse, ou dificuldade em respirar, diminuição da capacidade respiratória, agravamento dos casos de asma e desenvolvimento de bronquite crónica; o aumento da incidência de problemas cardíacos, como arritmia cardíaca e ataques cardíacos; e possivelmente, a ocorrência de mortes prematuras em pessoas com doenças cardíacas ou respiratórias (EPA, 2007).

2.5 O aerossol interior

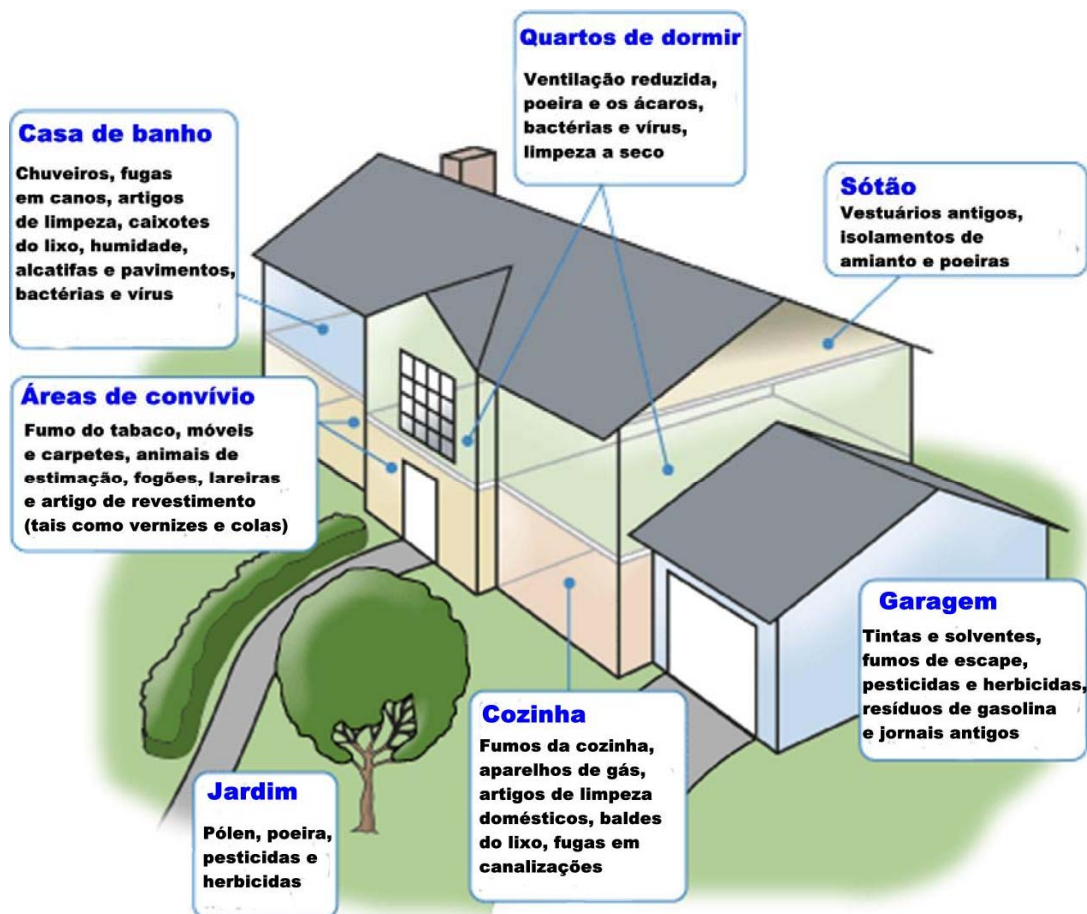


Figura - 3. Principais factores que influenciam a qualidade do ar interior, apresentados por divisão da habitação. Adaptado de Envspgroup (2008)

O termo “interior” é usado na literatura dedicada às questões da qualidade de ar para referir a uma variedade de ambientes, nomeadamente edifícios usados como habitação, locais de trabalho ou locais de recreio (Finlayson-Pitts e Pitts, 1999).

As fontes de poluentes atmosféricos apresentadas anteriormente, nesta dissertação, distinguem-se pela sua emissão para a atmosfera a uma grande escala. Em geral, nos espaços interiores, as concentrações destes poluentes tendem a apresentar-se mais baixas do que nos espaços exteriores, pois os poluentes depositam-se sobre as superfícies internas durante o tempo de residência do ar no interior dos edifícios. Contudo, no interior destes

espaços há uma grande diversidade de fontes de outros poluentes atmosféricos, que podem ser responsáveis pela ocorrência de concentrações atmosféricas potencialmente perigosas.

Para que se tenha uma ideia da diversidade de poluentes atmosféricos no ar interior, mostram-se na Figura 3 as principais fontes emissoras de poluentes num edifício de habitação. Cada divisão apresenta os seus problemas próprios, contudo, a queima de combustíveis, a confecção de alimentos, o uso de solventes e a suspensão de partículas por manipulação de artigos diversos ou por deslocação de pessoas, constituem as maiores fontes de poluentes no interior das habitações. A figura também engloba o jardim, que não é propriamente um ambiente interior, mas representa uma fonte importante de alguns poluentes no contexto de uma habitação individual. Nesta caso, os poluentes podem migrar da atmosfera exterior para a interior, afectando a qualidade deste micro-ambiente (EEA, 2007a).

Os poluentes gerados no interior de edifícios compreendem não só matéria particulada, mas também substâncias gasosas, como o ozono (O_3), o dióxido de azoto (NO_2), o monóxido de carbono (CO), o dióxido de enxofre (SO_2) e os compostos orgânicos voláteis (COV's) (Bernstein *et al.*, 2008). Estas substâncias gasosas podem ser também uma fonte do aerossol interior ao sofrerem processos de transformação que originam partículas secundárias de dimensões ultra-finas (Weschler e Shields, 2003). Por outro lado, a matéria particulada em suspensão no ar interior apresenta uma composição muito diversificada, contendo substâncias inorgânicas e orgânicas, sendo que, neste último caso, é possível distinguir material biológico variado, como ácaros, fungos, bactérias, vírus e pólenes (Holopainen *et al.*, 2006).

Os assuntos relacionados com a origem, distribuição e composição da matéria particulada no ar interior e o seu impacto na saúde não têm merecido uma grande atenção da comunidade científica, ao contrário do que se refere aos mesmos assuntos incidindo sobre o aerossol exterior, provavelmente porque no espírito da maioria das pessoas existe a noção de que em espaços interiores se está, geralmente, ao abrigo da poluição atmosférica. Por este facto, é ainda limitada a informação actual sobre o aerossol interior.

Segundo Abt *et al.* (2000), as concentrações de partículas no ar interior dependem não só das fontes presentes nos espaços interiores, mas também das actividades físicas dos ocupantes, das condições de ventilação, das taxas de transferência de ar e de outros aspectos construtivos dos edifícios. Tem-se constatado que a redução das trocas de ar

interior/exterior contribui para uma diminuição da diluição dos poluentes interiores, causando assim um aumento das suas concentrações, quando associados a fontes específicas no interior dos edifícios (Reynolds, 2006). Por outro lado, factores como a temperatura e a humidade relativa desempenham uma influência crucial no aumento das concentrações de partículas no ar ambiente, se estiverem em causa os chamados bio-aerossóis (como fungos, bactérias e ácaros).

De acordo com o trabalho realizado por Jones *et al.* (2000), as fontes interiores, como a confecção de alimentos, o fumo do tabaco, a limpeza a seco e a movimentação de pessoas, contribuem substancialmente para o aumento das concentrações de PM₁₀ e são fontes dominantes em episódios pontuais de acréscimo das concentrações de partículas.

Por sua vez, Chao e Wong (2002) concluíram que o aumento das concentrações de partículas finas (PM_{2,5}) no interior de habitações se encontrava estreitamente associado ao fumo do tabaco e a processos de combustão, com destaque para a queima de biomassa, principalmente no Inverno.

Segundo Møhlave *et al.* (2004), em habitações e ambientes não industriais, como escritórios e escolas, a concentração de partículas em suspensão situa-se, geralmente, entre 20 e 200 µg m⁻³. Contudo, em situações particulares, podem ocorrer valores extremos superiores a 1000 µg m⁻³. Os mesmos autores concluíram que as concentrações de partículas no interior apresentavam uma variação temporal e espacial que reflectia a importância das fontes interiores e as concentrações de partículas no ar exterior.

Jones *et al.* (2000) estudaram a composição química do aerossol interior, tendo concluído que o teor em carbono orgânico aumentava do exterior para o interior das habitações e que este aumento era mais evidente para as partículas finas. Também Lunden *et al.* (2008) se debruçaram sobre a natureza química do aerossol interior, tendo constatado que as concentrações de partículas de carbono orgânico no interior de habitações eram inferiores às esperadas se a sua remoção tivesse ocorrido apenas por mecanismos físicos, o que os levou a concluir que estas partículas eram igualmente removidas por processos de natureza química.

3 Química da celulose e ocorrência nas partículas do aerossol

Neste capítulo procede-se a uma descrição das características químicas mais relevantes da celulose, dos compostos que lhe estão associados na biomassa vegetal e ainda dos compostos em que se dissocia quando ocorre a sua degradação. Procede-se igualmente a uma revisão de conhecimentos sobre a ocorrência de celulose em partículas do aerossol e apresentam-se os procedimentos mais usualmente empregues na medição de celulose, tanto em amostras de biomassa vegetal como em amostras do aerossol.

3.1 Química da celulose e de compostos afins

3.1.1 Celulose

A celulose foi descrita pela primeira vez em 1838, pelo químico francês Anselme Payen, depois de a ter isolado de matéria vegetal e de ter determinado a sua fórmula química. É hoje um dado adquirido que a celulose é o mais importante componente estrutural das células das plantas o que faz deste o composto orgânico mais abundante à superfície da Terra. Efectivamente, em média, cerca de 1/3 da matéria vegetal é constituída por celulose. No caso da madeira, a percentagem deste polímero varia entre 40 e 60% enquanto no algodão pode superar os 90%.

Estruturalmente, a celulose é um polissacarídeo de fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, constituído por unidades de D-glucose, que se unem entre si através de ligações β -1,4-glicosídicas, em cadeias lineares com uma extensão que varia entre algumas centenas e dezenas de milhares de monómeros. Os grupos hidroxilo dos monómeros de glucose formam ainda ligações de hidrogénio com os átomos de oxigénio de outras cadeias, o que permite que estas se mantenham unidas lateralmente, de um modo muito organizado e com grande firmeza, sob a forma de microfibras. Esta celulose de características cristalinas pode representar 50 a

90% da celulose total presente na biomassa vegetal, sendo que a restante é composta por moléculas desorganizadas numa estrutura amorfa.

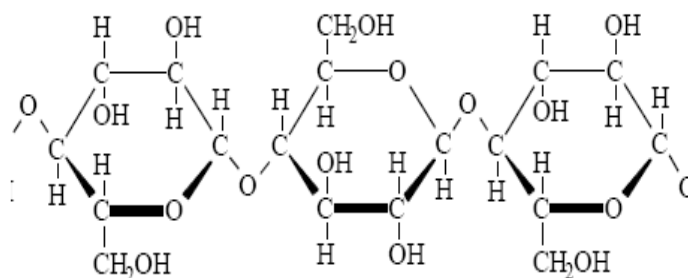


Figura - 4. Fórmula estrutural do fragmento de um polímero de celulose

Muitas das propriedades da celulose dependem do número de unidades de glucose que compõem as cadeias poliméricas, ou seja, do chamado grau de polimerização (GP). A celulose da pasta de papel apresenta um GP de 300 a 1700 unidades. Já as fibras de algodão e a celulose de origem bacteriana apresentam um grau de polimerização que oscila entre as 800 e as 10000 unidades.

3.1.2 Hemicelulose

A celulose encontra-se na biomassa vegetal normalmente associada a outros dois polímeros, menos abundantes, a hemicelulose e a lenhina.

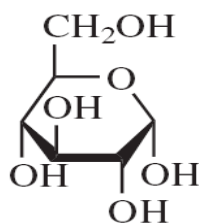
A hemicelulose é um polímero heterogéneo com composição específica que varia de planta para planta. A quantidade de hemicelulose (em massa seca) na madeira varia normalmente entre 20 e 30%. Estruturalmente, para além da glucose, é composta por vários açúcares, nomeadamente, xilose, manose, galactose, ramnose e arabinose. As cadeias de hemicelulose são mais curtas do que as de celulose, sendo geralmente compostas por cerca de 200 monossacarídeos. As cadeias de hemicelulose formam ligações de hidrogénio com as microfibras de celulose, contribuindo para aumentar a estabilidade da matriz celulose – hemicelulose – lenhina (Foyle *et al.*, 2007).

3.1.3 Lenhina

A lenhina é o terceiro polímero mais comum encontrado nas células das plantas, funcionando como material de ligação e de encapsulamento. A composição da lenhina pode apresentar algumas variações de acordo com a fonte (Foyle *et al.*, 2007), mas, no essencial, é um polímero complexo, de estrutura amorfa tridimensional, que resulta da união de vários ácidos e álcoois fenilpropílicos (Sjöström, 1993).

3.1.4 Glucose

A glucose é a unidade estrutural de menores dimensões a partir da qual se organiza a estrutura polimérica da celulose. Também designada por glicose, dextrose ou açúcar da uva, é o monossacarídeo mais abundante na Natureza, estando presente na forma monomérica nos frutos doces, como é o caso da uva, e também no mel, juntamente com a frutose. Trata-se igualmente do único componente de polissacarídeos como o amido e o glicogénio. A sua fórmula molecular ($C_6H_{12}O_6$) e a respectiva estrutura foram descritas, pela primeira vez, em 1891, pelo investigador alemão Emil Fischer. Estruturalmente, é possível distinguir duas formas de glucose com a mesma fórmula molecular, a mesma sequência de átomos ligados entre si, mas diferentes orientações espaciais dos seus átomos (estereoisómeros). As propriedades físicas, como o ponto de fusão, a densidade, a solubilidade e outras, são idênticas para ambas. Porém, diferem no seu efeito sobre a luz polarizada que as atravesse: uma desvia o plano de polarização da luz para a direita – isómero D ou forma dextrógira – e a outra para a esquerda – isómero L ou forma levógira. Dos dois estereoisómeros, a D-glucose é o mais conhecido, mais importante e mais abundante.



d-glucose

Figura - 5. Fórmula de estrutura da D-glucose

Nas folhas das plantas, dois compostos simples, o dióxido de carbono e a água, combinam-se para formarem a D-glucose. O processo, conhecido por fotossíntese, exige a acção catalítica da clorofila e requer energia sob a forma de luz solar. Milhares de moléculas de D-glucose podem então combinar-se e originar as moléculas muito maiores de celulose, que constitui a estrutura de suporte da planta. As moléculas de D-glucose podem também combinar-se, de um modo ligeiramente diferente, para originarem grandes moléculas de amido, que é então armazenado nas sementes para servir de alimento às novas plantas, durante o crescimento inicial.

3.1.5 Celobiose

A celobiose é um dissacarídeo de fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$ formado por duas unidades de glucose unidas entre si através de ligações β -1,4-glicosídicas. Trata-se de uma substância que não existe livre na natureza mas que pode ser obtida através da hidrólise enzimática ou acídica da celulose.

3.2 Celulose nas partículas do aerossol

Actualmente é ainda escassa a informação sobre a presença de celulose em aerossóis atmosféricos e o pouco que se sabe refere-se unicamente a partículas suspensas no ar ambiente exterior.

Kunit e Puxbaum (1996) apresentaram os resultados das primeiras medições de celulose em amostras de aerossóis. Tratou-se de um estudo efectuado na atmosfera urbana de Viena (Áustria), onde se procedeu à colheita de partículas totais com um amostrador de baixo caudal. Os resultados revelaram concentrações de celulose compreendidas entre 0,1 e 0,9 $\mu\text{g m}^{-3}$, correspondendo, em média, a cerca de 0,6% da massa total em suspensão na atmosfera, o que levou os autores a sugerirem que este polímero seria, provavelmente, em termos quantitativos, a substância mais importante da fracção orgânica insolúvel dos aerossóis atmosféricos.

Mais tarde, os mesmos autores (Puxbaum e Tenze-Kunit, 2003) utilizaram a celulose como um traçador da presença de detritos de matéria vegetal em amostras de aerossóis recolhidas igualmente em Viena, recorrendo, para o efeito, a uma estimativa da fracção mássica média daquele polímero nas folhas das plantas. Os resultados mostraram que as partículas de origem vegetal poderiam explicar cerca de 16% da matéria orgânica insolúvel presente nos aerossóis. As medições sazonais relatadas neste estudo mostraram ainda que o teor de celulose tinha um máximo no Outono, previsivelmente associado à degradação das folhas das plantas, e outro na Primavera, possivelmente ligado ao aumento da actividade biológica das plantas. Ainda neste estudo, os dois investigadores avaliaram o modo como a celulose se distribuía em aerossóis de diferentes tamanhos, tendo constatado que a maior parte da massa deste polímero se concentrava em partículas com um diâmetro aerodinâmico equivalente inferior a 1,6 μm . Estes resultados foram encarados com alguma surpresa, pois é um dado adquirido que as emissões primárias de material vegetal geram essencialmente partículas grosseiras.

Mais recentemente, Sánchez-Ochoa *et al.* (2007) determinaram a concentração de celulose em amostras de aerossóis recolhidas em seis locais de fundo do continente europeu. Os valores mínimos de celulose (16,3 ng m^{-3}) foram detectados nos Açores, um

local marinho de características remotas, e os máximos (181 ng m^{-3}) em K-Pusztá, um local continental de características rurais, situado na Hungria. De entre os locais continentais, as concentrações mais baixas foram detectadas em amostras colhidas a maior altitude, concretamente em Sonnblick, um local montanhoso situado nos Alpes austríacos (3106 m).

As tendências sazonais mais notórias foram observadas nos locais continentais, com a excepção de Aveiro, com os máximos a ocorrerem na Primavera e Verão, coincidindo com o período de actividade biológica mais intensa, e os mínimos a ocorrerem no Inverno. Por outro lado, os autores concluíram que o contributo da matéria vegetal para o conteúdo em matéria orgânica do aerossol tendia a aumentar com a altitude, com o valor médio mais baixo a ocorrer em Aveiro (2%) e o mais alto em Sonnblick (10%).

Conforme se apurou no levantamento de informação realizado no âmbito deste estudo, não parece haver qualquer registo de medições de celulose em partículas do ar anterior.

3.3 Métodos de medição de celulose aplicados à química do aerossol

Os métodos de análise para a determinação de celulose descritos na literatura referem-se maioritariamente a aplicações nas áreas do processamento e queima da madeira e da química alimentar. Nestas situações, a disponibilidade de material para análise não se apresenta como um factor limitante dos métodos. Já o mesmo não acontece com a quantificação de celulose em amostras de aerossóis, cujos níveis de concentração exigem técnicas de grande sensibilidade analítica. Kunit e Puxbaum (1996) descreveram o único método aplicável a este tipo de amostras, ou seja um método que permite medir quantidades de celulose da ordem do micrograma. No essencial, os autores seguiram um procedimento que é vulgar na análise de celulose em tecidos vegetais (Gould, 1984) e adaptaram-no no sentido de aumentarem a sua sensibilidade. O procedimento compreende três etapas: na primeira etapa, os substratos vegetais são sujeitos a um tratamento de deslenhificação, destinado a libertar a celulose que se encontra associada à lenhina e à hemicelulose; na segunda etapa, a “celulose livre” é hidrolisada a D-glucose; na terceira e última etapa, a D-glucose é quantificada por um processo analítico adequado.

Kunit e Puxbaum (1996) optaram por um processo de deslenhificação com peróxido de hidrogénio em meio alcalino, uma vez que a técnica apresentava um rendimento elevado (aproximadamente metade da lenhina e quase toda a hemicelulose eram solubilizadas) por acção de agentes químicos não tóxicos e disponíveis comercialmente com um elevado grau de pureza.

A sacarificação pode ser feita por hidrólise ácida ou enzimática. Kunit e Puxbaum (1996) seleccionaram um método enzimático que passava pela utilização de duas enzimas: a celulase e a celobiase. A celulase foi empregue para converter a celulose em compostos de baixo peso molecular, como polímeros de cadeia curta, celobiose e glucose. Por sua vez, a celobiase foi usada para a converter a celobiose em duas moléculas de glucose.

Contudo, existem outros processos disponíveis que permitem converter a celulose em compostos de baixo peso molecular, nomeadamente a degradação por meios ácidos, básicos, mecânicos, por acção da radiação, por acção da temperatura e por oxidação. Estes

processos permitem igualmente uma análise dos compostos formados, a fim de se obter uma estimativa da quantidade de celulose sujeita a análise.

As ligações glicosídicas na celulose são susceptíveis de hidrólise, a qual é iniciada com a exposição a ácidos que conduzem a uma elevada formação de D-glucose, sob condições adequadas. Contudo, quando é utilizado um ácido relativamente diluído a extensão da degradação pode ser baixa ou mesmo negligenciável. (Nevell, 1985a).

Quando as ligações glicosídicas da celulose se encontram em soluções alcalinas com temperaturas inferiores a 170 °C mantêm-se geralmente estáveis. Todavia, observa-se uma redução importante na sua massa molecular quando a celulose é aquecida com hidróxido de sódio a temperaturas elevadas, mesmo sem a presença de oxigénio (Kenill e Kennedy, 2003). Existe uma determinada proporcionalidade entre a diminuição da massa da celulose, no aquecimento alcalino, e a quantidade de material dissolvido que é formado, o que indica que a diminuição da massa é causada pela dissolução de materiais de cadeias mais pequenas, após a quebra de ligações da cadeia de celulose nas extremidades redutoras, formando assim as denominadas “hidroceluloses” (Nevell, 1985a).

Por outro lado, ao aquecer uma solução básica de celulose, a temperaturas que variem entre 250 e 300 °C, verifica-se a formação de compostos de baixa massa molecular, principalmente ácidos. Ácidos como o fórmico, acético, glicólico e láctico podem ser obtidos desta forma, enquanto a combinação da celulose com hidróxido de sódio ou de potássio a 230 °C forma maioritariamente ácido oxálico (Kenill e Kennedy, 2003).

A oxidação completa da celulose forma dióxido de carbono e água. A celulose é determinada quantitativamente pelo aquecimento com dicromato de potássio com uma solução de ácido sulfúrico (4 a 5 M), seguida da medição da quantidade de ácido crómico formado. Este é um método padrão para a quantificação de celulose (Nevell, 1985a).

A conversão da celulose por acção da temperatura processa-se por etapas. A primeira dá-se a temperaturas mais baixas, e resulta na decomposição das unidades glicosídicas da celulose pela ebulição da água, com a formação de dióxido de carbono, monóxido de carbono e resíduos sólidos. Com o aumento da temperatura, um tipo diferente de reacções toma lugar, resultando na despolimerização da molécula por libertação de unidades glicosídicas sob a forma de 1,6-anidro- β -D-glucopiranoose (levoglucosano).

A cisão directa do substrato e a exposição imediata dos produtos a um calor intenso ou à radiação, resulta na quebra das moléculas dos produtos gasosos de baixa massa

molecular, formando dióxido de carbono, monóxido de carbono, água, hidrocarbonetos e hidrogénio, algo que acontece na presença de temperaturas superiores às referidas no parágrafo anterior (Shafizadeh, 1985).

A radiação também constitui um factor de ataque ao material celulósico, impulsionando a sua degradação oxidativa, com a formação de radicais hidroxilo, desde que a exposição à radiação ocorra a um comprimento de onda $> 340\text{nm}$ (Malešič *et al.*, 2005).

No que diz respeito aos métodos de análise referidos na literatura para a determinação de baixas concentrações de glucose, incluem a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e os testes enzimáticos. Kunit e Puxbaum (1996) recorreram a um teste normalizado, de tipo enzimático, disponível comercialmente para a análise de alimentos, que adaptaram então à medição de glucose nas amostras de aerossóis.

4 Procedimento Experimental

4.1 Locais de amostragem

As amostras de aerossóis foram recolhidas em quatro locais distintos do concelho de Aveiro: no complexo de residências da Universidade de Aveiro, situado no Campus de Santiago, freguesia urbana da Glória; no edifício do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro, situado no mesmo Campus; numa moradia localizada na freguesia de Cacia; e num apartamento situado na freguesia da Vera-Cruz.

As colheitas no complexo de residências do Campus de Santiago ($40^{\circ}37'56''\text{N}$; $8^{\circ}39'22''\text{W}$) foram recolhidas em duas localizações interiores diferentes, num quarto e na cozinha. O quarto encontra-se situado no terceiro piso do bloco de residências, possui uma planta rectangular com área aproximada de 8 m^2 , uma porta de acesso e uma janela, encontrava-se mobilada com uma cama, um secretária e um armário. A cozinha do mesmo bloco residencial apresentava uma área interna de 20 m^2 , com uma porta de acesso sempre aberta todo o dia para o corredor do bloco.

No Departamento de Ambiente e Ordenamento ($40^{\circ}37'57''\text{N}$; $8^{\circ}39'35''\text{W}$) foram recolhidas simultaneamente amostras de ar interior, no laboratório 11, situado no terceiro piso do Edifício dos Laboratórios, e de ar exterior, no terraço do mesmo edifício, situado a uma altura correspondente a um quarto piso. O laboratório possui uma planta rectangular com uma área de 20 m^2 , uma porta de acesso, aberta somente em período diurno, e várias janelas em duas das paredes, mas que se mantiveram sempre fechadas durante as colheitas.

Na moradia de Cacia ($40^{\circ}40'24''\text{N}$; $8^{\circ}35'10''\text{W}$) efectuaram-se colheitas simultâneas de ar interior, num quarto situado no primeiro piso, e no exterior, num terraço situado a uma altura correspondente a um segundo piso. A habitação encontra-se numa zona de características rurais, mas relativamente próxima da auto-estrada A25 e de uma unidade industrial de produção de pasta de papel. O quarto possui uma planta rectangular com uma área de 15 m^2 , uma porta interior, que se manteve aberta durante o período de colheitas, uma porta exterior que se manteve fechada, e uma janela, que foi aberta

esporadicamente durante o mesmo período. O interior do quarto estava ocupado com duas camas, duas secretárias e dois armários. O chão era de azulejo e continha 4 tapetes. Os dois ocupantes do quarto eram não fumadores e usaram-no essencialmente no período nocturno. Durante as amostragens o quarto era ocupado pelos dois ocupantes principalmente no período nocturno, mas também apresentou ocupação no período diurno, pois também é utilizado como escritório.

O apartamento da freguesia da Vera-Cruz (40°38'51''N; 8°38'41''W) situa-se num quarto andar de um prédio de seis pisos, construído numa área urbana, junto de uma avenida com tráfego moderado. O quarto, de planta rectangular, com uma área de 12 m², dispõe de uma porta principal, uma janela, que se manteve sempre fechada durante as medições, e uma porta de acesso a uma casa de banho, também com janela, a partir da qual se fez a ventilação do quarto, por períodos de 2 a 6 horas diárias. O quarto continha uma cama de casal e uma cama de bebé, um roupeiro de parede e um armário também para roupa. O chão continha três carpetes de algodão. Durante as amostragens o quarto foi utilizado normalmente por três ocupantes, não fumadores, essencialmente no período nocturno. As amostragens no exterior foram realizadas numa varanda orientada para a avenida principal que serve o edifício.

4.2 Métodos de Amostragem

A amostragem de partículas em suspensão no ar ambiente (interior e exterior) processou-se com amostradores de baixo caudal da TECORA (modelo ECHO PM) idênticos ao que se apresenta na Figura 6. Estes equipamentos dispõem de uma cabeça de pré-separação – que funciona por impacto inercial –, um suporte para um filtro com 47 mm de diâmetro, uma bomba rotativa de palhetas secas, um medidor de caudal do tipo venturi, sensores de temperatura e pressão e um módulo electrónico para controlo das condições de amostragem.

O caudal utilizado variou consoante o tipo de cabeça de pré-separação associada ao amostrador. A grande maioria das colheitas de partículas com um diâmetro aerodinâmico equivalente inferior a $10\ \mu\text{m}$ foi efectuada a um caudal médio de $2,3\ \text{m}^3\ \text{h}^{-1}$, com o recurso a uma cabeça LVS PM_{10} da TECORA (P/N AA99-010-

0020SP) – idêntica à que se apresenta na Figura 7 b –, de acordo com a norma europeia EN 12341. O mesmo caudal foi utilizado para as colheitas de partículas com um diâmetro aerodinâmico equivalente inferior a $2,5\ \mu\text{m}$, desta vez com uma cabeça LVS $\text{PM}_{2,5}$ da TECORA (P/N AA99-010-0025SP), de acordo com a norma europeia EN14907.

Por indisponibilidade de equipamento, as colheitas de PM_{10} efectuadas no laboratório do DAO e no interior da moradia de Cacia foram realizadas com uma cabeça PM_{10} US EPA (*40 CFR Part 50*, Figura 7 a) a um caudal de amostragem de $1\ \text{m}^3\ \text{h}^{-1}$ (P/N AA99-010-0011SP) (TECORA, 2005).



Figura - 6. Amostrador Tecora ECHO PM.

Fonte: TECORA (2005).



Figura - 7. Formatos das cabeças de amostragem utilizadas nas amostragens. Fonte: TECORA (2005).

Para a avaliação da reprodutibilidade da técnica de medição de celulose efectuaram-se ainda duas recolhas de partículas totais em suspensão, no terraço do edifício de Laboratórios do DAO, por intermédio de um amostrador de caudal elevado, a $1,13 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$.

As amostragens tiveram a duração de 12 ou 24 h, dependendo do local e das restrições de utilização dos diversos espaços, tendo em conta que os níveis de ruído produzidos pelos equipamentos de colheita nem sempre eram compatíveis com o sossego requerido pelos ocupantes.

As partículas foram recolhidas em filtros de fibra de quartzo (Whatman QMA), previamente calcinados a uma temperatura de $550 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 2 h, para a remoção de contaminantes orgânicos. Os filtros foram ainda pesados antes e depois da amostragem – com o auxílio de uma balança Mettler Toledo, modelo AG245, dotada de uma sensibilidade de $0,00001 \text{ mg}$ – depois de acondicionados durante 24 horas num ambiente com temperatura e humidade controladas.

Uma vez concluída a pesagem dos filtros, procedeu-se ao seu congelamento (a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$) até à data de análise do seu conteúdo em celulose, a fim de se prevenir a degradação das amostras.

Na tabela seguinte apresenta-se um resumo dos locais, ambientes caracterizados, equipamentos, condições e períodos de colheita referentes às amostragens de partículas efectuadas neste estudo.

Tabela I Resumo das amostragens de aerossóis efectuadas neste estudo

Local	Espaço	Atmosfera	Amostrador	Cabeça	t	n	Período
Residências universitárias	cozinha	interior	BC (2,3m ³ /h)	PM ₁₀ *(EN)	12 h **	6	Mar – Abr 08
	quarto	interior	BC (1m ³ /h)	PM ₁₀ (EPA)	12 h **	7	
DAO - UA	laborat.	interior	BC (1m ³ /h)	PM ₁₀ (EPA)	24h	10	Jun 08
	terraço	exterior	BC (2,3 m ³ /h)	PM ₁₀ (EN)	24h	10	
Moradia (Cacia)	quarto	interior	BC (1m ³ /h) *	PM ₁₀ (EPA)	12h	12	Mai – Jun 08
	terraço	exterior	BC (2,3 m ³ /h) *	PM ₁₀ (EN)	12h	12	
Apartamento (Vera-Cruz)	quarto	interior	BC (2,3 m ³ /h)	PM ₁₀ (EN)	12 h	9	Jul 08
	quarto	interior	BC (2,3 m ³ /h)	PM _{2,5} (EN)	12 h	9	
	quarto	interior	BC (2,3 m ³ /h)	PM ₁₀ (EN)	24 h ***	9	Jul – Set 08
	varanda	exterior	BC (2,3 m ³ /h)	PM ₁₀ (EN)	24 h ***	9	
DAO – UA ****	terraço	exterior	AC (1.13m ³ /min)	PTS	24 h	2	Mai e Ago 08

BC - baixo caudal; AC - alto caudal; t - duração da amostragem; n - número de amostras

* o caudal verdadeiro foi diferente do que era pretendido, devido a uma falha na calibração. Os volumes corresponderam a cerca de 14 e 17% menos do que o pretendido com as cabeças PM₁₀ (EN) e PM₁₀ (EPA), respectivamente.

** amostragens alternadas em período nocturno e diurno

*** amostragens referentes a dois períodos diurnos consecutivos de 12 h.

**** ensaios destinados à avaliação da reprodutibilidade do método de medição de celulose

4.3 Procedimento de análise da celulose

Como foi referido anteriormente, a biomassa vegetal contém celulose na forma livre e celulose encapsulada pela lenhina (ou pela suberina, no caso da casca de árvores). Assim, para a determinação da “celulose total” é necessário proceder à deslenhificação da matéria vegetal, seguida de uma sacarificação enzimática (hidrólise) e da determinação enzimática da glucose.

4.3.1 Deslenhificação

De acordo com o descrito por Kunit e Puxbaum (1996), o processo de deslenhificação consiste em aplicar sobre o filtro amostrado 5 mL de uma solução de peróxido de hidrogénio a 1% (m/m), alcalinizada a pH = 11,5 com hidróxido de sódio, durante 24h, à temperatura de 25 °C. Para a solubilização da lenhina é essencial que o pH da solução se mantenha constante a 11,5. No final da reacção o filtro contendo as partículas do aerossol é lavado várias vezes com água destilada até que o pH da água de lavagem fique neutro; seguidamente é seco à temperatura de 120 °C, durante 2 h.

Este procedimento não foi adoptado no presente trabalho porque o processo de lavagem tende a arrastar partículas do aerossol acumuladas na superfície do filtro durante a amostragem, provocando erros na quantificação da massa de celulose (Caseiro, comunicação pessoal).

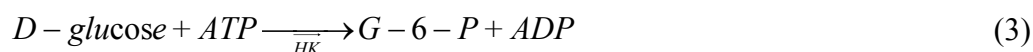
Este processo ocorre antes da hidrólise enzimática, pois a maioria dos substratos lenhoocelulósicos, quando sujeitos a algum tipo de pré-tratamento aumentam a acessibilidade ao ataque enzimático. O pré-tratamento deve preferencialmente resultar na remoção da lenhina e aumentar a disponibilidade da área de superfície e a porosidade do substrato, podendo igualmente solubilizar a hemicelulose (Rosgaard *et al.*, 2006).

4.3.2 Sacarificação

Nesta fase, retiraram-se de cada filtro quatro fracções circulares, com o auxílio de um vazador com 12 mm de diâmetro, que foram colocadas num frasco de polietileno com 5 mL de capacidade. Em cada um dos frascos contendo as amostras colocou-se o volume de 2.7 mL de uma solução tampão de ácido cítrico 0,05 M, a pH 4,8, com 0,05% de timol. Os frascos foram então fechados e colocados num banho ultra-sónico durante 40 min. De seguida, adicionaram-se às misturas 90 µL de uma suspensão de celulase de *Trichoderma reesei* e 90 µL de celobiase de *Aspergillus niger*¹. As suspensões contendo as enzimas tinham sido previamente diluídas com água ultra-pura: 1/10 no caso da celulase e 1/100 no caso da celobiase. Posteriormente, as amostras foram colocadas num banho termostatizado a 45 °C durante 24h. Terminado este período, a temperatura do banho foi elevada até 85 °C, durante 10 min, a fim de se desnaturar as enzimas, interromper a sua actividade, e dar por concluído o processo de hidrólise. Depois de arrefecidas até à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas durante 15 min. O sobrenadante foi retirado e centrifugado por um período adicional de 10 min. As soluções resultantes foram então utilizadas para a determinação da concentração de glucose.

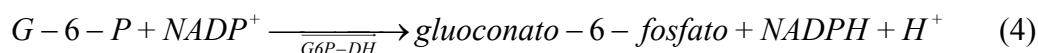
4.3.3 Determinação da D-Glucose

A D-glucose foi determinada com um *kit* de análise disponível comercialmente (D-glucose HK, *Megazyme International Ireland Ltd.*). Neste ensaio, a D-glucose é fosforilada pela enzima hexoquinase (HK) e pela adenosina-5'-trifosfato (ATP) em glucose-6-fosfato (G-6-P), com a formação simultânea de adenosina-5'-difosfato (ADP):



Na presença da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P-DH), o G-6-P é oxidado pela nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺) em gluconato-6-fosfato, com formação de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reduzido (NADPH)

¹ O procedimento de preparação das soluções de enzimas encontra-se descrito no Anexo I.



A quantidade de NADPH formada nesta reacção é estequiometricamente equivalente à quantidade de D-glucose. É então o NADPH que é medido pelo aumento da absorvância ao comprimento de onda de 340 nm.

O *kit* da Megazyme contém quatro frascos com as seguintes substâncias:

- **frasco 1:** 25 mL de tampão de imidazol (2 M, pH 7,6), cloreto de magnésio (100 mM) e azida de sódio 0,02 % (m/v), como conservante;

- **frasco 2:** nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺) (150 mg) e adenosina-5'-trifosfato (ATP) (440 mg);

- **frasco 3:** 2,25 ml de suspensão de hexoquinase (425 U/mL) e glucose-6-fosfato desidrogenase (212 U/mL);

- **frasco 4:** 5 mL de solução padrão de D-glucose (0,4 mg/mL).

Seguindo as instruções do fabricante, antes da utilização, o conteúdo do frasco 2 foi solubilizado em 12 mL de água desionizada. A solução resultante foi então dividida em alíquotas (o número depende da quantidade de amostras a analisar): uma para uso imediato e as restantes para determinações subsequentes, sendo, para o efeito, armazenadas em frascos de polipropileno a -20 °C.

Para a análise das soluções resultantes do processo de sacarificação seguiu-se uma adaptação do procedimento de utilização do *kit* da Megazyme, descrita por Marr (2005), e que se destina a melhorar sensibilidade da técnica analítica através da optimização dos volume de amostra e de soluções reagentes. Assim, de cada um dos tubos de centrífuga, transferiram-se 1050 µL do sobrenadante para *cuvettes* independentes. Adicionaram-se 50 µL da solução 1 (tampão de imidazol) e 50 µL da solução 2 (NADP⁺/ATP) e homogeneizou-se o seu conteúdo por agitação das *cuvettes*. Aguardaram-se 5 min e procedeu-se à leitura da primeira absorvância (A₁), a um comprimento de onda de 340 nm, em intervalos de 2 min, até que os valores de absorvância não variassem mais do que 0,001 unidades. Adicionaram-se então 10 µL da solução 3 (enzimas), homogeneizou-se o seu conteúdo, aguardaram-se mais 5 min, para que as reacções terminassem, e procedeu-se à

leitura da segunda absorvância (A_2), ao mesmo comprimento de onda, e seguindo o procedimento anterior até à estabilização das leituras.

Para efeitos de cálculo da concentração de D-glucose, estimaram-se, em primeiro lugar, as diferenças entre as leituras A_2 e A_1 para todos os extractos analisados. Os valores calculados para as amostras foram então corrigidos com as diferenças referentes aos brancos, obtendo-se assim o parâmetro $\Delta A_{D-glucose}$, aplicado no cálculo da concentração de D-Glucose, através da seguinte expressão:

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{D-glucose} \text{ [g / L]} \quad (5)$$

onde:

V = volume final [mL]

MW = massa molecular da glucose [g mol^{-1}]

ε = coeficiente de extinção do NADPH a 340 nm = 6300 [$\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

d = trajecto óptico [cm]

v = volume de amostra [mL]

Por fim, os teores de “celulose livre” foram estimados por conversão das concentrações de D-glucose em celulose, tendo em conta os pesos moleculares de ambos os compostos e o rendimento da sacarificação, de acordo com a equação seguinte:

$$\text{Celulose } [\mu\text{g}] = \text{D-glucose } [\mu\text{g}] \times \text{GF} \times (1/\text{SY}) \quad (6)$$

onde o GF é o factor de conversão da massa de glucose em celulose (0,9) e SY é o rendimento da sacarificação.

Por fim, convém referir que a solução de D-glucose presente no frasco 4 só é utilizada quando existe alguma dúvida sobre o funcionamento do método (e.g.: falha na resposta do espectrofotómetro; presença de substâncias inibidoras nas amostras), dado que a concentração do açúcar é determinada directamente a partir do coeficiente de extinção do NADPH.

5 Resultados e Discussão

5.1 Rendimento da sacarificação

O rendimento do processo de sacarificação foi determinado através da análise de padrões de celulose pura, sujeitando-os ao mesmo procedimento descrito para a quantificação do conteúdo em celulose nas amostras de aerossóis. As quantidades testadas variaram entre 150 e 1000 μg de celulose. O primeiro padrão usado nestes ensaios apresentava-se sob a forma de fibras de celulose de dimensão média (Sigma-Aldrich) e permitiu obter um rendimento médio de $39,1 \pm 3,3\%$. A Figura 8 apresenta a relação entre a massa de celulose estimada pelo método de análise e a massa de celulose sujeita a análise. O ajuste de uma recta de regressão linear permitiu obter a equação e o coeficiente de regressão constantes na figura. Os parâmetros obtidos permitem afirmar que o algoritmo explica 98% da variabilidade associada à massa de celulose que foi pesada.

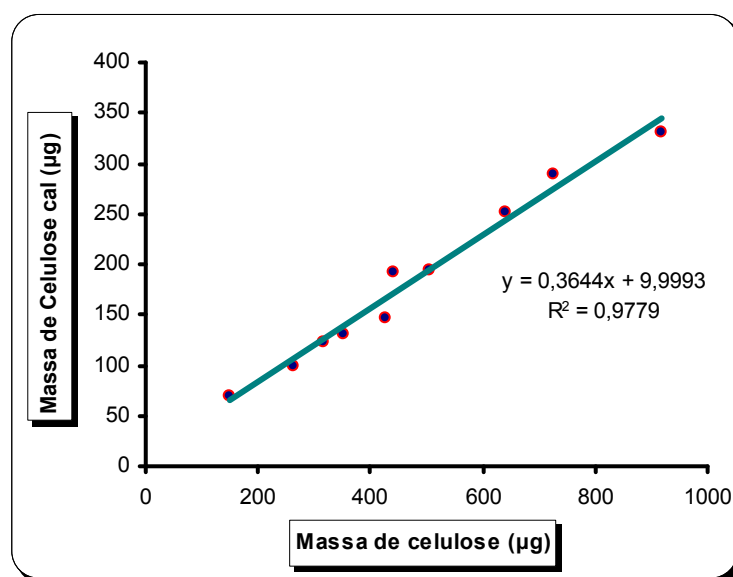


Figura - 8. Relação entre a massa de celulose quantificada pelo método de Kunit e Puxbaum (1996) e a massa de celulose pesada.

O rendimento de 39,1% obtido no primeiro ensaio corresponde a pouco mais de metade do rendimento obtido pelo grupo de investigação austríaco (Kunit e Puxbaum, 1996; Puxbaum e Tenze-Kunit, 2003). Para se verificar a consistência deste valor, procedeu-se à repetição do ensaio sem qualquer alteração ao procedimento inicial. O rendimento obtido foi idêntico, mostrando a regularidade da resposta do método quando executado em condições idênticas. Posteriormente realizaram-se novos ensaios, introduzindo sequencialmente pequenas alterações ao procedimento inicial, na perspectiva de se encontrar o factor que permitiria justificar as diferenças de rendimento obtidas. Na Tabela II apresentam-se os resultados destas experiências.

Tabela II – Rendimentos médios do processo de sacarificação obtidos com diferentes variantes do método de Kunit e Puxbaum (1996).

N.º do ensaio	Alterações ao procedimento inicial	Rendimento da sacarificação (%)	Desvio Padrão (%)
1	Ensaio inicial	39,1	3,3
2	Repetição do ensaio inicial	38,9	6,2
3	Nova diálise das enzimas	35,3	3,9
4	Aumento da temperatura para 50°C	37,7	9,3
5	Aumento da temperatura para 55°C	26,2	2,7
6	Adição do 200 µl de enzimas	36,2	4,3
7	Mudança de espectrofotómetro	36,9	3,8
8	Nova solução de eluição e diálise	39,2	4,9
9	Celulase 1/10 Celobiase 1/100	39,6	7,7
	Celulase 1/5 Celobiase 1/50	36,3	2,1
	Celulase 1/1 Celobiase 1/10	39,2	3,1
10	Celulose microcristalina	59,2	15,9
	Celulose microgranular	39,2	7,7
	Celulose em fibras médias	38,5	8,3
11	Celulose microgranular + nova solução de eluição e diálise	59,1	7,1
12	Celulose microcristalina	68,9	3,9
	Celulose microgranular	60,9	5,4
	Celulose em fibras médias	35,0	4,0
13	Celulose microgranular	62,5	7,3
	Celulose em fibras médias	40,4	5,3

Segundo Finch e Roberts (1985), o modelo cinético da acção enzimática num sistema sinérgico pode ser afectado pelos produtos de inibição, pelo grau de polimerização e tipo de celulose, por concentrações de enzimas em rácios constantes, pelas próprias relações entre endo e exo-enzimas e ainda pelo comprimento da cadeia. Assim sendo, os ensaios realizados nesta fase do trabalho procuraram, na medida do possível, incorporar alterações a alguns destes factores, como forma de se melhorar o rendimento da sacarificação.

A diálise referente ao terceiro ensaio foi realizada por se suspeitar de um erro na preparação das enzimas, relacionado com a temperatura a que decorreu o processo. Refira-se, a propósito, que esta diálise constitui um pré-tratamento das enzimas comerciais para utilização no método de Puxbaum e Tenze-Kunit (2003). Este procedimento é importante, na medida em que permite a remoção da glucose, substância que está presente nas enzimas comerciais e que pode inibir a acção enzimática (Finch e Roberts, 1985). Uma vez realizada a diálise, procedeu-se a nova digestão com padrões de celulose. O rendimento obtido foi da ordem de 35 %, não sendo substancialmente diferente do determinado nos ensaios 1 e 2.

Na realização do quarto e quinto ensaios foi avaliado o efeito da temperatura a que ocorreu a hidrólise enzimática. Primeiro, aumentou-se a temperatura de 45 para 50 °C e, posteriormente, para 55 °C. Os resultados obtidos comprovam que o valor da temperatura inicial se encontrava próximo do valor óptimo para o funcionamento das enzimas. Com o aumento da temperatura para 50 °C o rendimento da sacarificação não sofreu uma variação significativa. Todavia, a 55 °C já se registou uma diminuição expressiva do rendimento, que passou a ser cerca de 10% inferior ao valor inicial.

O ensaio número 6 foi realizado com o intuito de se verificar se as enzimas adicionadas anteriormente eram suficientes para a hidrólise. Assim, os volumes de cada uma das enzimas adicionadas (celulase e celobiase) foram aumentados para 200 µL. O resultado obtido neste ensaio mostrou que não existia uma relação entre a quantidade de enzimas testada e o rendimento da sacarificação (na gama de volumes usada), pelo que a quantidade de enzimas que tinha sido usada inicialmente era suficiente para as medições em causa.

Devido a uma falha de operação com o espectrofotómetro de UV/visível que era utilizado normalmente (Camspec, modelo M501), foi necessário recorrer a um

espectrofotómetro alternativo (Jasco, modelo 7800), o que constituiu uma oportunidade para se verificar se o problema se encontrava naquele instrumento (ensaio nº 7). Todavia, também esta mudança não implicou uma alteração substancial no rendimento da sacarificação.

Segundo Puxbaum e Tenze-Kunit (2003), não existem alterações no rendimento da sacarificação, durante o período de 2 anos, quando as soluções de enzimas resultantes da diálise são colocadas em frascos de polietileno e congeladas. Para se despistarem eventuais falhas no processo de diálise, realizou-se o ensaio nº 8, que é uma repetição do ensaio nº 1, antecedido da preparação de uma nova solução de eluição e de uma nova diálise de ambas as enzimas. O resultado final mostra que o rendimento não sofreu alteração (39,1 %).

O ensaio nº 9 teve como finalidade testar o efeito da concentração das enzimas. Este ensaio foi realizado com fibras de celulose médias e com três combinações de soluções de enzimas. A primeira corresponde à concentração de enzimas indicada no método inicial (1/10 de celulase e 1/100 de celobiase). Na segunda, as concentrações das enzimas foram reduzidas para metade. Na última, a celulase foi utilizada sem diluição e a celobiase com uma diluição de 1/10. Em qualquer das combinações foi mantida a relação de 1/10 entre as enzimas, seguindo o recomendado por Finch e Roberts (1985), quando referem que o processo sinérgico de actuação das enzimas apresenta um funcionamento óptimo para esta razão entre concentrações. As quantidades de enzimas adicionadas a cada tubo de teste foram de 100 µL. Mais uma vez, os resultados indicaram que o rendimento não sofreu grandes alterações e que as concentrações de enzimas inicialmente usadas foram as adequadas para o processo de sacarificação.

Como o rendimento do processo enzimático também pode ser condicionado pelo tipo de substrato, procedeu-se à aquisição de padrões de celulose com características diferentes da testada inicialmente (celulose em fibras médias), a fim de se realizar um ensaio que tivesse em conta este aspecto. Assim, em simultâneo com aquele tipo de celulose, testou-se a acção das enzimas sobre celulose microgranular e celulose microcristalina (ensaio nº 10). Os resultados obtidos mostraram que o rendimento era superior quando se usou celulose microcristalina (59,2 %) e que não havia diferenças entre os rendimentos obtidos com a celulose de fibras médias e a celulose microgranular. Mas esta observação é particularmente importante porque permite questionar o rendimento da sacarificação quando está em causa a análise de partículas do aerossol contendo celulose

de uma natureza desconhecida. Ora este é um aspecto que é ignorado em publicações anteriores. Puxbaum e Tenze-Kunit (2003) referem unicamente que o rendimento da sacarificação é cerca de 70% quando utilizaram celulose com um grau de polimerização de 900.

Entretanto, prepararam-se novas soluções de enzimas e de eluente. Procedeu-se também à preparação de novas soluções tampão, por se suspeitar da qualidade das que tinham sido usadas na aferição do pH das soluções de eluição anteriores. Com as novas soluções avaliou-se o rendimento da sacarificação de celulose microgranular (ensaio nº 11), o qual se verificou que tinha aumentado para 59,1 %. Este resultado sugeriu que o baixo rendimento encontrado em ensaios anteriores se encontraria relacionado com um incorrecto ajustamento do pH da solução de eluição, facto que motivou a realização de mais testes.

Os ensaios 12 e 13 serviram para confirmação dos resultados do ensaio anterior e para uma nova comparação do rendimento da sacarificação usando os três tipos de celulose. Verificou-se então que a celulose microcristalina apresentava um rendimento (68,9 %) muito próximo dos 71 % descritos por Puxbaum e Tenze-Kunit (2003), o que parece indicar que este terá sido o tipo de celulose utilizado naquele estudo. Saliente-se, por outro lado, que os resultados destes ensaios parecem contradizer observações anteriores, realizadas por Finch e Roberts (1985), que indicavam ser as fibras de celulose mais susceptíveis à acção enzimática do que as localizações microcristalinas, devido à rápida capacidade para hidrolisarem as zonas amorfas das fibras.

O rendimento considerado para as determinações de celulose no aerossol realizadas neste estudo foi o obtido com o substrato microgranular, por se considerar que as dimensões das partículas corresponderiam às vulgarmente encontradas nos aerossóis e por se admitir que a celulose com uma estrutura estritamente cristalina não se encontra disponível na natureza.

Note-se ainda que os ensaios descritos para a determinação do rendimento da sacarificação foram realizados em paralelo com a quantificação de celulose nas amostras de aerossóis, pelo que, tendo em conta as diferenças nas condições de análise, se usou um rendimento que variou entre 39,1 e 62,5 %.

A utilização de fibras de celulose microgranulares deveu-se ao facto das celulose natural ser constituída por fibras de celulose (Sjöström, 1993) e presentes na atmosfera numa gama de tamanhos mais reduzidos (Puxbaum e Kunit 2003).

5.2 Limites de Detecção

O limite de detecção (LD) é definido como três vezes o desvio padrão (DP) dos filtros brancos. Os brancos são determinações de fibras que não foram sujeitos à amostragem de partículas, de forma a estabelecer o mínimo valor detectável. Neste caso de estudo, o LD para a determinação da D-glucose é convertido para celulose equivalente pela equação 6. O LD da celulose atmosférica é assim obtido assumindo que o volume médio de amostragem foi de aproximadamente 25 m³. As concentrações para as três séries de filtros brancos encontram-se representadas na Tabela III.

Tabela III – Resultados das três series de determinação com filtros brancos.

	1. ^a Série	2. ^a Série	3. ^a Série
N.º de amostras	8	8	11
Massa média de D-glucose (µg)	1,84	1,73	1,70
DP	0,20	0,22	0,19
LD da D-glucose (µg)*	2,45	2,39	2,27
LD da celulose (µg)**	3,52	3,44	3,27
LD da celulose (µg m ⁻³)***	0,10	0,09	0,09

* LD D-glucose = Massa média de D-glucose + 3*DP

** LD Celulose = LD D-glucose*0,9/0,63

*** Para amostras de ar com um volume de amostragem de 25 m³.

Saliente-se, no entanto, que durante a determinação da celulose pelo método de Puxbaum e Tenze-Kunit (2003) os valores do LD variaram consoante o rendimento do processo de sacarificação e o volume de ar amostrado. Este facto condiciona o estabelecimento de um valor médio para o LD, pois o rendimento da sacarificação nas amostras variou entre 39 % e 63%, e o volume de ar amostrado dependeu do tempo e do caudal de amostragem. Estas condicionantes obrigaram a que se adequasse o limite de detecção à amostragem em causa.

Assim, aquando das determinações, as amostras eram comparadas com um LD da celulose (expresso em μg), devidamente corrigido para o rendimento (por exemplo, 5,62 μg com um rendimento de 39% e 3,52 com um rendimento de 63%). Se a concentração obtida fosse inferior ao LD, as amostras eram classificadas como tendo uma concentração inferior ao LD.

O método usado na determinação do LD da glucose foi semelhante ao descrito para a celulose. Neste caso usaram-se duas séries de 4 filtros brancos, mas com uma diferença: não foi adicionada nenhuma enzima comercial ao tubo de digestão. Os valores dos LD encontrados foram 0,03 $\mu\text{g m}^{-3}$ (com um rendimento de 39%) e 0,02 $\mu\text{g m}^{-3}$ (com um rendimento de 63%), para um volume médio de amostragem de 25 m^3 .

5.3 Reprodutibilidade do método

Tal como referido anteriormente, os testes de reprodutibilidade da técnica de medição de celulose em filtros foram realizados com um amostrador de caudal elevado. A opção por este equipamento prendeu-se com o facto da área dos filtros do amostrador de baixo caudal ser demasiado pequena para a realização de ensaios replicados. Foram realizados dois testes de reprodutibilidade.

Após a colheita da primeira amostra foram utilizadas 10 réplicas (contendo cada uma 4 fracções circulares com 12 mm de diâmetro) de diferentes zonas do filtro, 5 réplicas da parte central (amostras 1 a 5) e 5 de uma margem (amostras 6 a 10). As réplicas foram então sujeitas a análise do seu conteúdo em celulose, recorrendo ao método anteriormente descrito. Os resultados obtidos após a análise são apresentados na Figura 9.

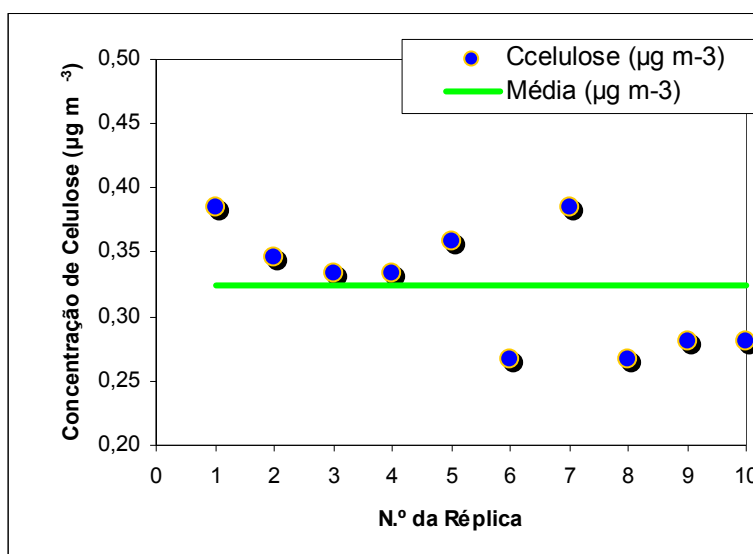


Figura - 9. Concentrações de celulose obtidas em réplicas da primeira amostra recolhida com um amostrador de alto caudal.

A concentração média determinada para o conjunto de réplicas foi de $0,324 \pm 0,047$ $\mu\text{g m}^{-3}$, a que corresponde um desvio padrão relativo de 14,5 %. A figura parece indicar também a existência de alguma variação na concentração de celulose dentro do filtro. Esta variação pode ser identificada com a presença de níveis superiores à média nas réplicas da

zona central do filtro, em oposição aos valores da parte marginal, que são, na sua maioria, inferiores à média.

Posteriormente, e na perspectiva de se encontrar uma menor variabilidade nas concentrações de celulose, a colheita com o amostrador de alto caudal foi repetida, tendo-se usado réplicas provenientes de diferentes sectores do filtro.

O segundo teste apresentou então uma concentração média de celulose de $0,057 \pm 0,024 \mu\text{g m}^{-3}$ (Figura 10), com um desvio padrão relativo superior ao do primeiro teste (42,0 %), indicando uma menor reprodutibilidade do método. Este resultado não surpreende, na medida em que a concentração de celulose na atmosfera exterior durante o período em que decorreu o ensaio foi cerca de uma ordem de grandeza inferior à encontrada na sequência da primeira colheita. Ou seja, como os níveis são baixos, e a sensibilidade da técnica tende a diminuir com o decréscimo das concentrações no ar ambiente, a variabilidade das medições tende a aumentar, o que resulta numa menor reprodutibilidade. Ora, como se verá mais adiante, as concentrações de celulose no ar interior são muito superiores às encontradas no ar exterior, pelo que é de esperar que a reprodutibilidade das medições naquele tipo de ambientes seja mais próxima, ou mesmo melhor, do que a determinada com a primeira amostragem.

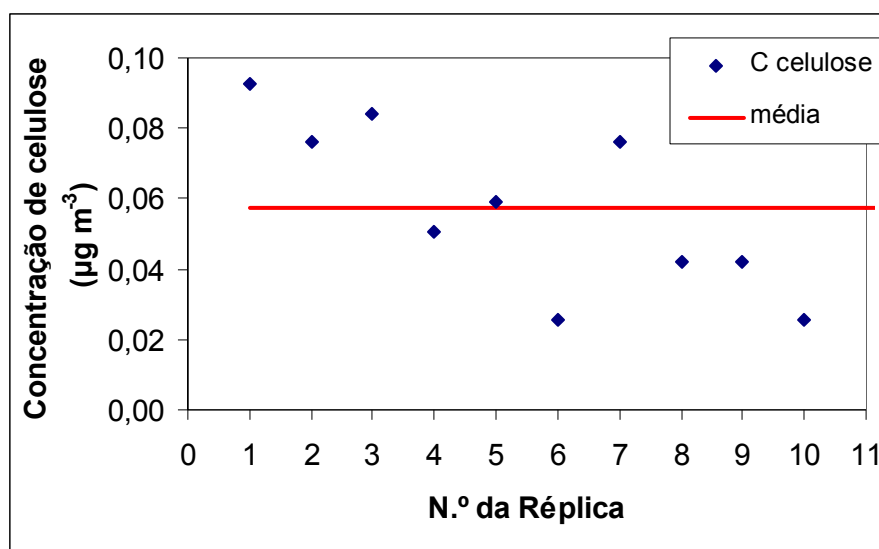


Figura - 10. Concentrações de celulose obtidas em réplicas da segunda amostra recolhida com um amostrador de alto caudal.

5.4 Concentrações de celulose nas partículas do aerossol

5.4.1 Residências universitárias

A Figura 11 representa a concentração de PM_{10} nos dois espaços interiores das residências universitárias caracterizados neste estudo. Em termos médios, as concentrações de PM_{10} na cozinha apresentaram valores de $43,4 \pm 25,1 \mu\text{g m}^{-3}$ e no quarto de $33,8 \pm 6,8 \mu\text{g m}^{-3}$. Tanto a análise do gráfico como a dispersão dos valores em torno do valor médio mostram que a variabilidade da concentração de partículas no ar interior da cozinha é mais acentuada do que no quarto. As oscilações detectadas na cozinha podem explicar-se pelo facto das amostragens terem sido feitas alternadamente durante o dia (das 11h00 às 23h00; amostras 2, 4 e 6) e à noite (das 23h00 às 11h00; amostras 3, 5 e 7), ou seja, abrangendo períodos em que a utilização daquele espaço foi claramente distinta. Efectivamente, durante o período diurno a cozinha foi utilizada pelos estudantes para a realização de duas refeições principais (almoço e jantar), enquanto no período nocturno foi usada unicamente para a realização de uma refeição menor (pequeno-almoço). Por outro lado, o facto de em termos médios, as concentrações de PM_{10} terem sido superiores na cozinha, deve-se, muito provavelmente, ao maior número de utilizadores, potencialmente responsáveis pela emissão de maiores quantidades de partículas para a atmosfera, nomeadamente através da confecção de alimentos e da resuspensão de poeiras depositadas no soalho e equipamentos em uso.

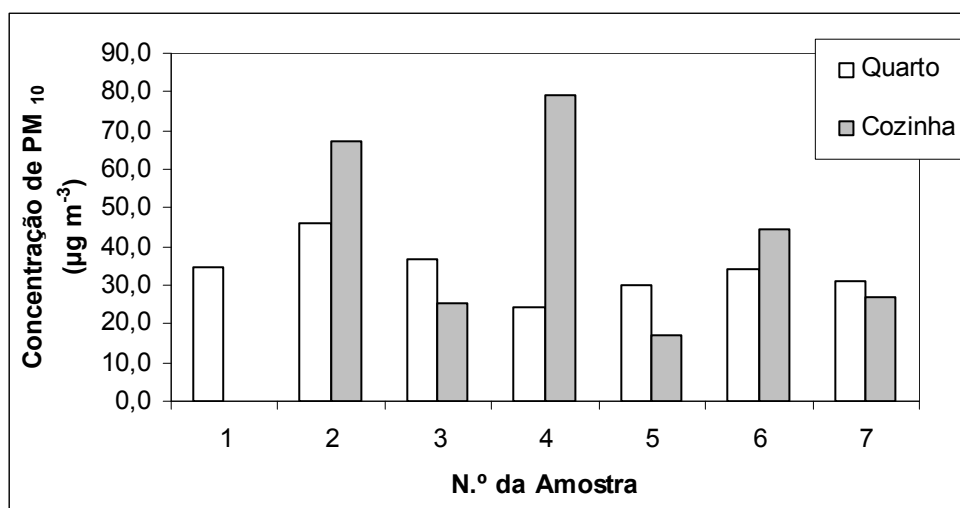


Figura - 11. Concentrações de PM₁₀ no ar interior das residências universitárias.

As concentrações de celulose nos dois compartimentos estudados apresentaram uma tendência distinta das concentrações de PM₁₀. Assim, foi determinada uma concentração média de celulose de $1,08 \pm 0,52 \mu\text{g m}^{-3}$, para o quarto, e $0,56 \pm 0,58 \mu\text{g m}^{-3}$, para a cozinha. Estes valores médios vão ao encontro dos resultados individuais descritos na Figura 12, dado que, globalmente, se registou uma tendência para ocorrerem concentrações de celulose mais elevadas no quarto do que na cozinha (a única exceção refere-se à amostragem 6). Estes resultados podem estar relacionados com a presença de um maior número de fontes de celulose nos quartos, como sejam a manipulação de vestuário de algodão e a utilização de material de escritório e livros de papel.

Refira-se ainda que, no caso da cozinha, as amostras 4, 5 e 7 apresentaram valores de concentração muito baixos, sendo mesmo inferiores ao limite de detecção do método. Assim, as concentrações apresentadas na Figura 12 correspondem ao valor do limite de detecção para a amostra em questão.

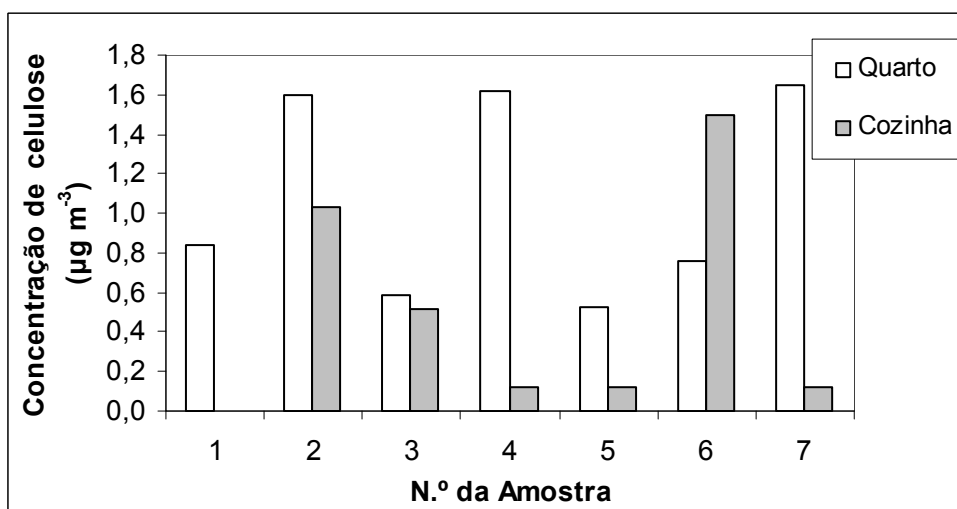


Figura -12. Concentrações de celulose no ar interior das residências universitárias.

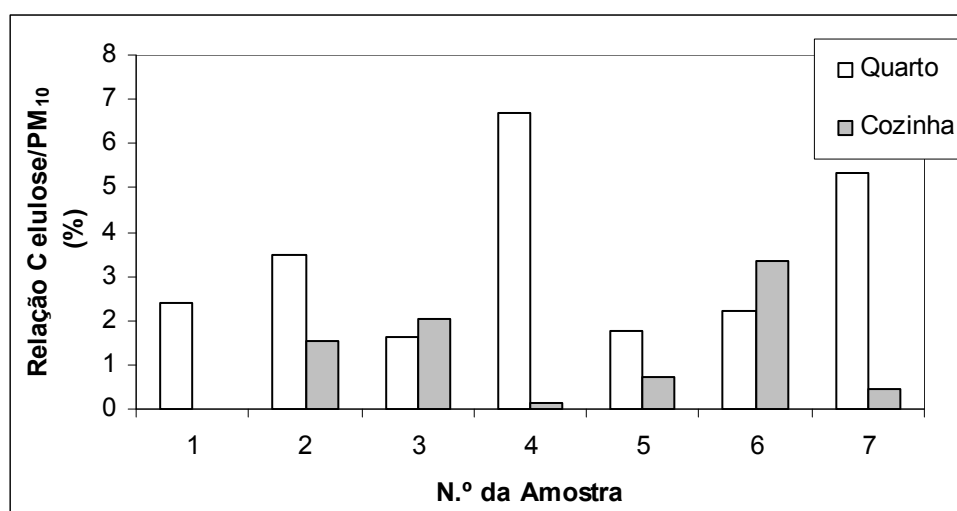


Figura -13. Relação entre as concentrações de celulose e PM_{10} no ar interior das residências universitárias.

A razão entre as concentrações de celulose e PM_{10} encontra-se representada na Figura 13, podendo verificar-se que as amostras recolhidas no quarto apresentam, frequentemente, um teor de celulose superior ao das amostras recolhidas na cozinha. Somente nas amostragens 3 e 6 se verificou o contrário. A percentagem média encontrada para a relação celulose/ PM_{10} foi de $3,4 \pm 1,9 \%$ e de $1,3 \pm 2,3 \%$, para o quarto e para a cozinha, respectivamente.

5.4.2 Departamento de Ambiente e Ordenamento

A Figura 14 mostra os resultados das medições da concentração de partículas PM_{10} no ar interior e exterior do edifício dos laboratórios do Departamento de Ambiente e Ordenamento. Da análise do gráfico parece notar-se uma tendência para as concentrações no interior acompanharem as concentrações no exterior.

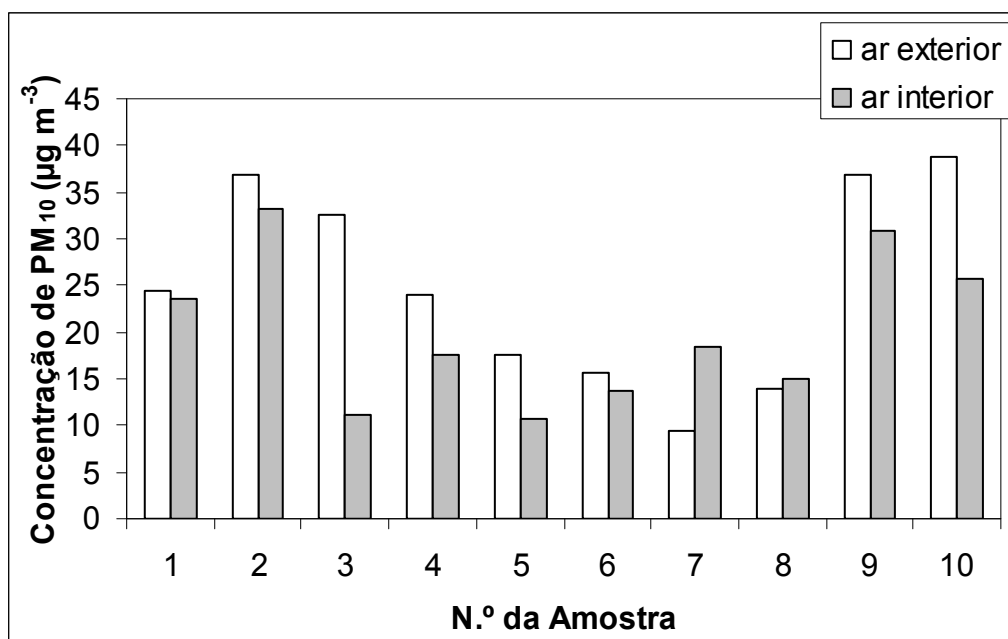


Figura - 14. Concentrações obtidas para as medições de PM_{10} no ar interior e exterior do edifício de laboratórios do Departamento de Ambiente.

Os dados recolhidos indicam que a concentração de partículas no ar exterior variou entre 9,5 e 38,9 $\mu\text{g m}^{-3}$, situando-se a média em $25,0 \pm 10,7 \mu\text{g m}^{-3}$. Por sua vez, no ar interior, a concentração variou entre 10,7 e 33,1 $\mu\text{g m}^{-3}$, sendo a média de $20,0 \pm 8,0 \mu\text{g m}^{-3}$. Na maioria dos dias caracterizados as concentrações no ar exterior foram superiores às concentrações no ar interior. Contudo, esta tendência não foi muito pronunciada, pelo facto dos valores do desvio padrão englobarem ambas as concentrações médias, que são muito próximas entre si (Figura 14). A razão entre as concentrações de PM_{10} no ar interior e exterior foi de $0,89 \pm 0,42$, o que aponta para uma influência de fontes exteriores nas concentrações interiores de partículas.

Na Figura 15 ilustra-se a variação das concentrações de celulose nas amostras de ar interior e exterior. Saliente-se que em duas das amostras recolhidas no exterior os valores encontrados foram inferiores ao limite de detecção do método. Em termos médios, a concentração de celulose no ar exterior foi de $0,12 \pm 0,06 \mu\text{g m}^{-3}$ (intervalo de variação compreendido entre $0,03$ e $0,20 \mu\text{g m}^{-3}$) e no ar interior de $0,27 \pm 0,14 \mu\text{g m}^{-3}$ (intervalo de variação compreendido entre $0,05$ e $0,49 \mu\text{g m}^{-3}$).

O teor de celulose nas partículas do aerossol é apresentado na Figura 16. Em termos médios, as partículas do ar exterior continham $0,5 \pm 0,3 \%$ de celulose, enquanto as partículas do ar interior continham $1,8 \pm 1,3 \%$ de celulose. Estes resultados estão em linha com os observados nas residências universitárias e sugerem, uma vez mais, que em ambientes interiores as fontes de celulose dão um maior contributo para a massa de partículas do aerossol. Quanto à razão entre as concentrações de celulose interior e exterior foi, em média 2,8, ou seja, muito superior à encontrada para as partículas PM_{10} , o que parece confirmar a importância das fontes internas de celulose para a massa das partículas suspensas.

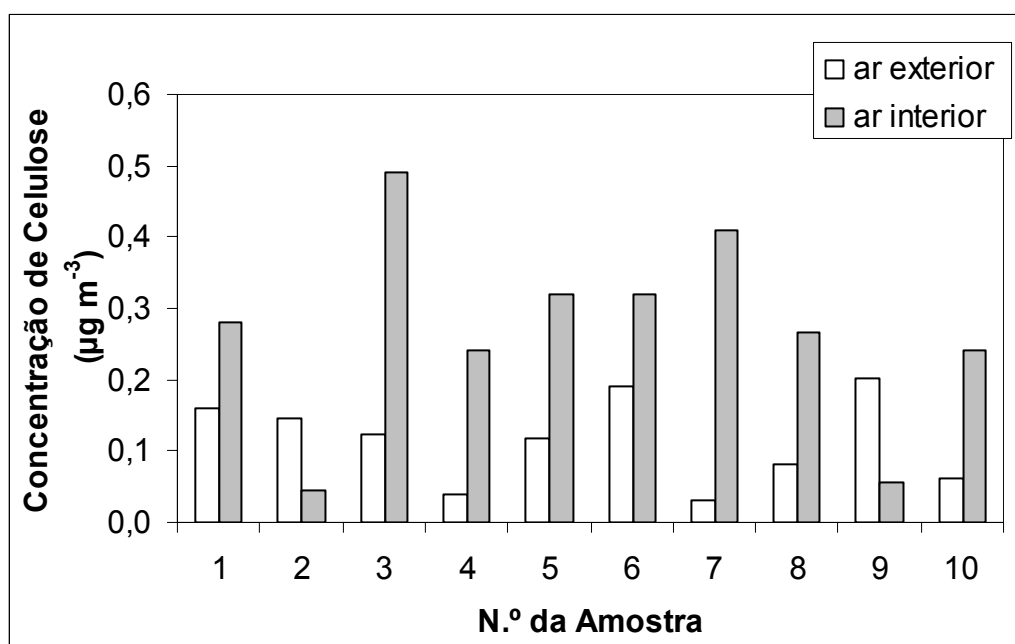


Figura -15. Concentrações de celulose no ar exterior e interior do edifício dos laboratórios do Departamento de Ambiente e Ordenamento.

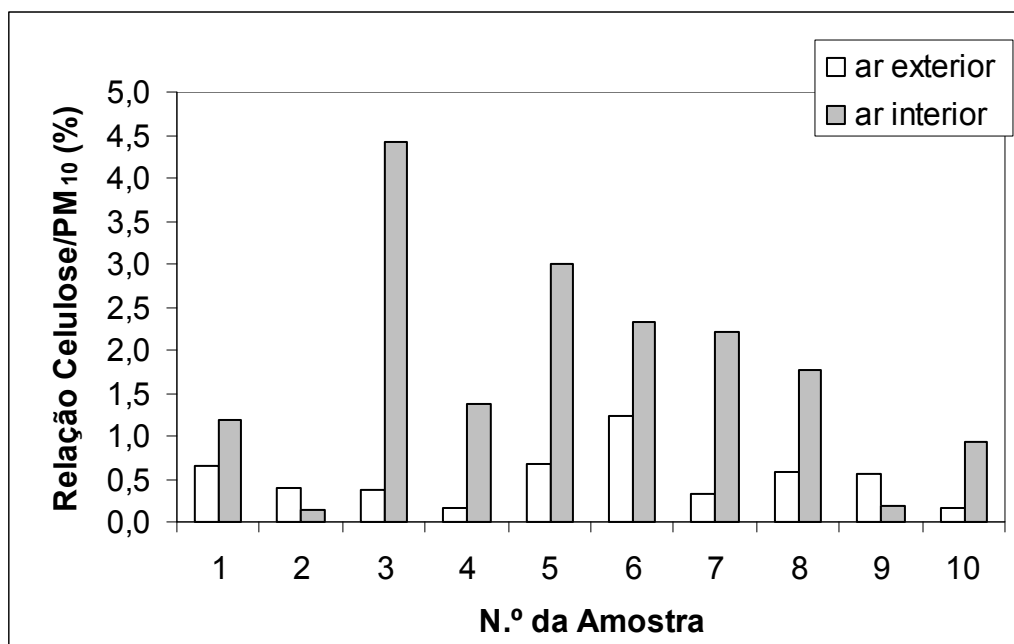


Figura - 16. Relação entre as concentrações de celulose e PM₁₀ no ar interior e exterior do edifício dos laboratórios do Departamento de Ambiente e Ordenamento.

5.4.3 Moradia (Cacia)

Conforme se referiu anteriormente, nas amostragens realizadas na habitação de Cacia ocorreu um erro na quantificação dos caudais, o que impossibilitou uma correcta medição da concentração de partículas do tipo PM₁₀. Como os caudais de amostragem foram 14 e 17 % inferiores ao recomendado para que a separação ocorresse a um diâmetro de corte de 10 µm, ter-se-ão colhido partículas com dimensões superiores ao pretendido. Ainda assim, tendo em conta que os caudais de amostragem foram próximos nos dois amostradores, entendeu-se que seria interessante mostrar estes resultados, sobretudo tendo em conta as diferenças de concentrações que se vieram a encontrar entre os dois ambientes caracterizados simultaneamente. Em todo caso, neste local, a designação PM₁₀ foi substituída pelo termo “partículas amostradas”, dado que não foi possível saber a que diâmetro de corte ocorreu a separação.

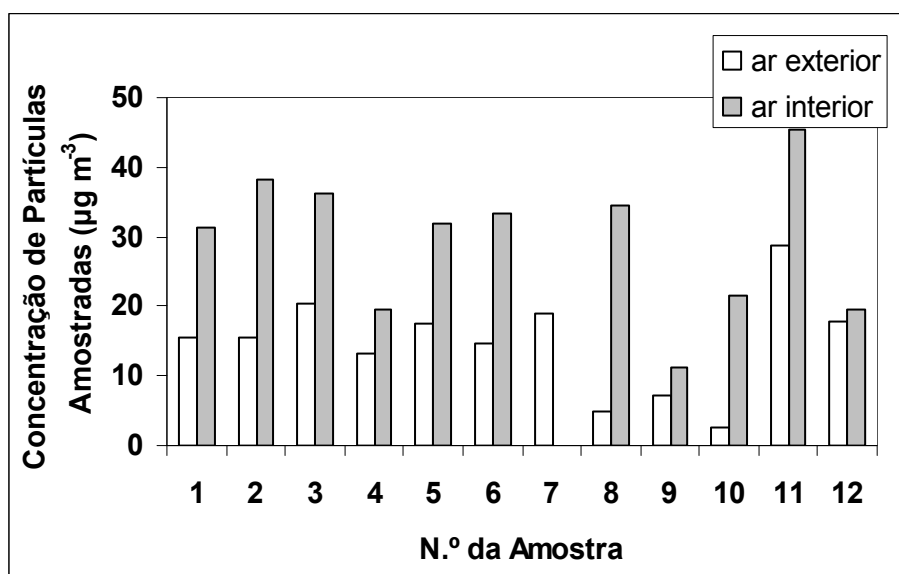


Figura - 17. Concentrações de partículas amostradas no ar interior e exterior da moradia de Cacia.

As concentrações de partículas amostradas no ar interior e no exterior encontram-se representadas na Figura 17. Na amostragem n.º 7 não se apresentou o valor de concentração devido a uma falha no equipamento de amostragem.

As concentrações médias encontradas situaram-se nos $29,3 \pm 10,1 \mu\text{g m}^{-3}$ (variação entre $11,2$ e $45,3 \mu\text{g m}^{-3}$), no ar interior, e nos $13,6 \pm 8,0 \mu\text{g m}^{-3}$, no ar exterior (variação entre $2,6$ e $28,6 \mu\text{g m}^{-3}$).

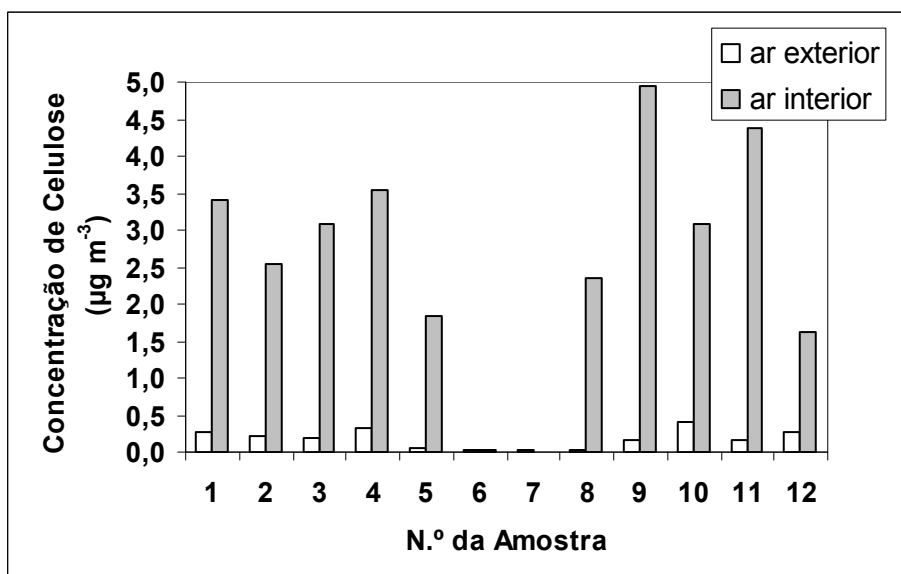


Figura - 18 Concentrações de celulose nas partículas amostradas no ar interior e exterior da moradia de Cacia.

Em relação aos valores médios da concentração de celulose (Figura 18), foi obtida para as amostras de ar interior uma média de $2,80 \pm 1,36 \mu\text{g m}^{-3}$ (mínimo de $0,04 \mu\text{g m}^{-3}$ e máximo de $4,95 \mu\text{g m}^{-3}$). Por sua vez, as partículas recolhidas no ar exterior apresentaram uma média de $0,17 \pm 0,13 \mu\text{g m}^{-3}$ (mínimo de $0,02 \mu\text{g m}^{-3}$ e máximo de $0,40 \mu\text{g m}^{-3}$).

Neste local, o teor de celulose nas partículas amostradas foi, em média de $12,1 \pm 11,6 \%$ e $2,3 \pm 4,3 \%$, para o ar interior e exterior, respectivamente (Figura 19).

Estas observações vêm sustentar os resultados anteriores e mostram claramente que a celulose pode contribuir de um modo significativo para a massa de partículas suspensas no ar interior. Também neste caso, as fontes de celulose terão sido o vestuário, a roupa de cama, as carpetes, os livros e o material de escritório.

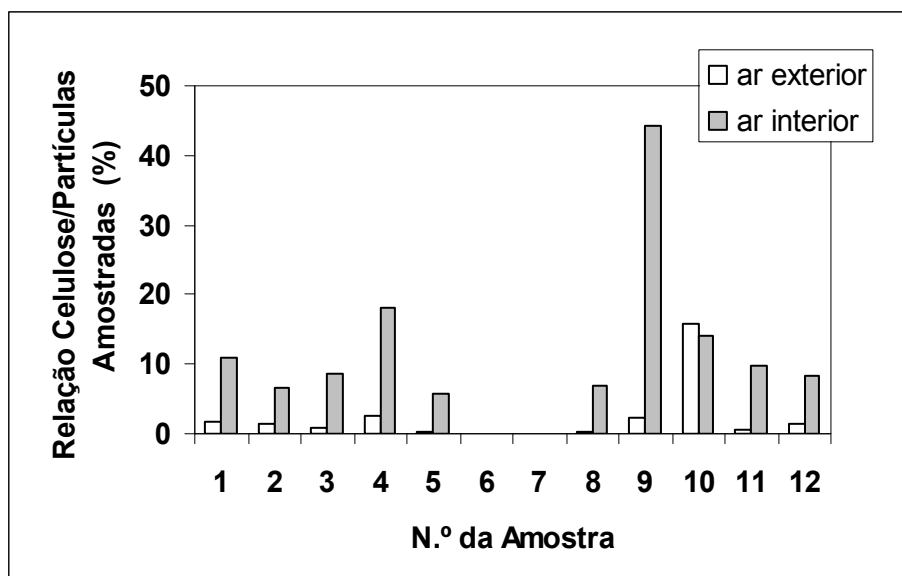


Figura - 19 – Relação entre as concentrações de celulose e partículas amostradas no ar interior e exterior da moradia de Cacia.

5.4.4 Apartamento (Vera-Cruz)

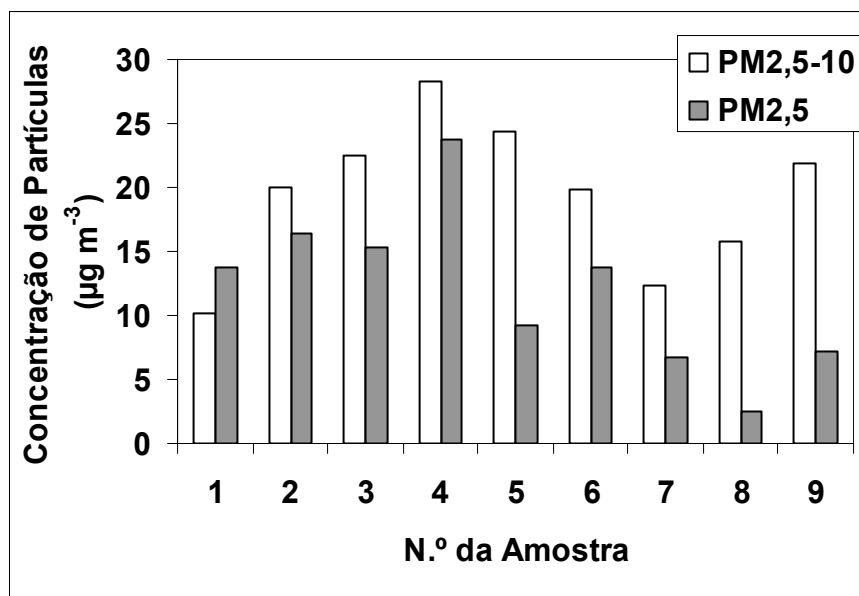


Figura - 20. Concentrações de partículas finas (PM_{2,5}) e grosseiras (PM_{2,5-10}) no ar interior do apartamento da Vera-Cruz.

No apartamento da freguesia da Vera-Cruz procedeu-se a realização de dois conjuntos de amostragens. O primeiro consistiu na determinação simultânea das concentrações mássicas de partículas do tipo PM₁₀ e PM_{2,5}, e dos correspondentes teores de celulose, em ambiente interior, a fim de se avaliarem as suas distribuições por tamanhos. O segundo consistiu na determinação das concentrações mássicas de partículas do tipo PM₁₀, e dos correspondentes teores de celulose, simultaneamente em ar interior e exterior, a fim de se confirmarem as tendências anteriormente observadas para os rácios de celulose interior/exterior.

Na Figura 20 mostram-se as concentrações mássicas de partículas no ar interior obtidas durante a primeira série de amostragens. Estas concentrações referem-se às fracções fina (PM_{2,5}) e grosseira (PM_{2,5-10}) do aerossol, sendo que, neste último caso, os valores apresentados resultaram da subtração da concentração de partículas PM_{2,5} à concentração de partículas PM₁₀.

Em termos médios, obteve-se uma concentração de PM_{2,5-10} de $19,5 \pm 5,8 \mu\text{g m}^{-3}$ (mínimo de $10,1 \mu\text{g m}^{-3}$ e máximo de $28,3 \mu\text{g m}^{-3}$) e uma concentração de PM_{2,5} de $12,1 \pm 6,4 \mu\text{g m}^{-3}$ (mínimo de $2,5 \mu\text{g m}^{-3}$ e máximo de $23,7 \mu\text{g m}^{-3}$). Estes resultados mostram que

as fontes primárias, emissoras de matéria particulada com dimensões maioritariamente grosseiras, são as principais contribuintes para a massa de partículas suspensas no ar interior.

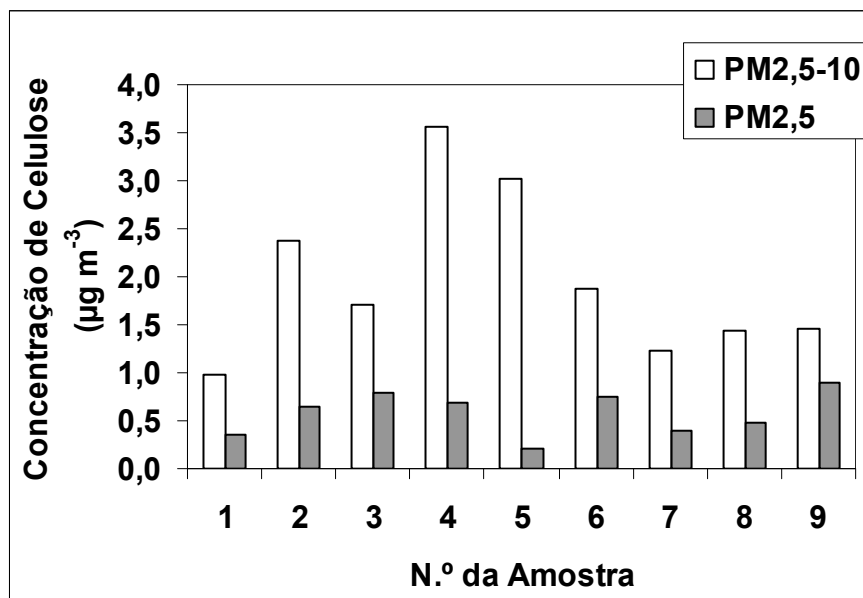


Figura - 21. Concentrações de celulose em partículas finas e grosseiras no ar interior do apartamento da Vera-Cruz.

A Figura 21 ilustra o modo como se distribui a celulose nas duas fracções do aerossol caracterizadas neste local. A concentração média de celulose nas partículas PM_{2,5} apresentou um valor de $0,58 \pm 0,23 \mu\text{g m}^{-3}$, enquanto nas partículas PM_{2,5-10} o valor médio ascendeu a $1,96 \pm 0,87 \mu\text{g m}^{-3}$. Com base nestes valores pode-se afirmar que a celulose se encontra maioritariamente associada à fracção grosseira do aerossol.

O teor de celulose nas partículas do aerossol é apresentado na Figura 22, onde se observa que a fracção grosseira possui uma percentagem do polímero que é, geralmente, superior à da fracção fina. Convém salientar que duas das amostras caracterizadas mostraram uma tendência diferente da maioria, ou seja, uma maior percentagem de celulose na fracção fina. Em termos médios, obtiveram-se teores de $6,6 \pm 5,7 \%$ e $9,9 \pm 2,1\%$, para PM_{2,5} e PM_{2,5-10}, respectivamente. Estes valores indicam que a quantidade de celulose presente nas partículas não varia significativamente consoante o tamanho das partículas recolhidas.

Determinando as razões PM_{2,5}/PM₁₀ para a massa de partículas atmosféricas e para a celulose obtiveram valores médios de $0,37 \pm 0,13$ e $0,24 \pm 0,09$, respectivamente. Estes resultados sustentam as interpretações anteriores sobre a relevância das partículas

grosseiras no ar interior e sobre a ocorrência maioritária de celulose nas partículas de maiores dimensões. Os dados aludem também à presença de fontes interiores de celulose, devido à dificuldade apresentada pelas partículas grosseiras em introduzir-se no interior dos edifícios. Este facto tornou necessária a caracterização da concentração de celulose no ar exterior, de forma a confirmar-se se ocorria uma tendência semelhante à apresentada no local de amostragem de Cacia.

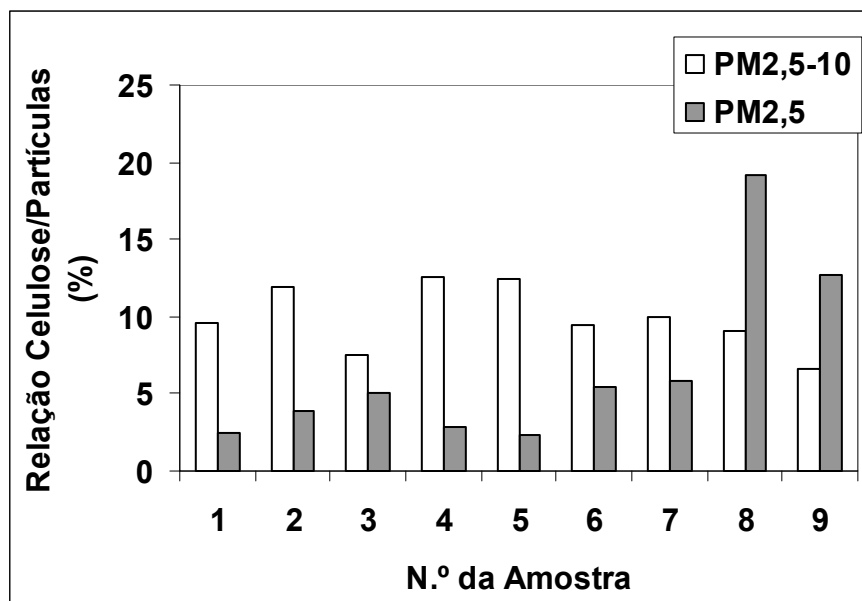


Figura - 22. Relação entre as concentrações de celulose e a massa de partículas finas e grosseiras em suspensão no apartamento da Vera-Cruz.

A segunda série de amostragens compreendeu então a colheita simultânea de partículas PM_{10} no quarto e na varanda do apartamento.

Assim, a Figura 23 apresenta os dados obtidos na sequência das amostragens realizadas no ar interior (quarto) e no ar exterior da habitação situada no edifício de apartamentos da Vera-Cruz. Os dados recolhidos indicam que a concentração de partículas no ar exterior foi, em média, de $22,82 \pm 7,33 \mu\text{g m}^{-3}$, variando entre um mínimo de $16,31$ e um máximo de $39,28 \mu\text{g m}^{-3}$. Por sua vez, as concentrações no ar interior apresentaram uma média de $25,01 \pm 4,28 \mu\text{g m}^{-3}$, variando entre um mínimo de $19,29$ e um máximo de $33,87 \mu\text{g m}^{-3}$. Na grande maioria dos dias caracterizados as concentrações no ar interior foram superiores às do ar exterior. Contudo, esta tendência parece ser circunstancial, visto que a variação da concentração de partículas no ar interior se encontra dentro dos limites de variação da concentração no ar exterior.

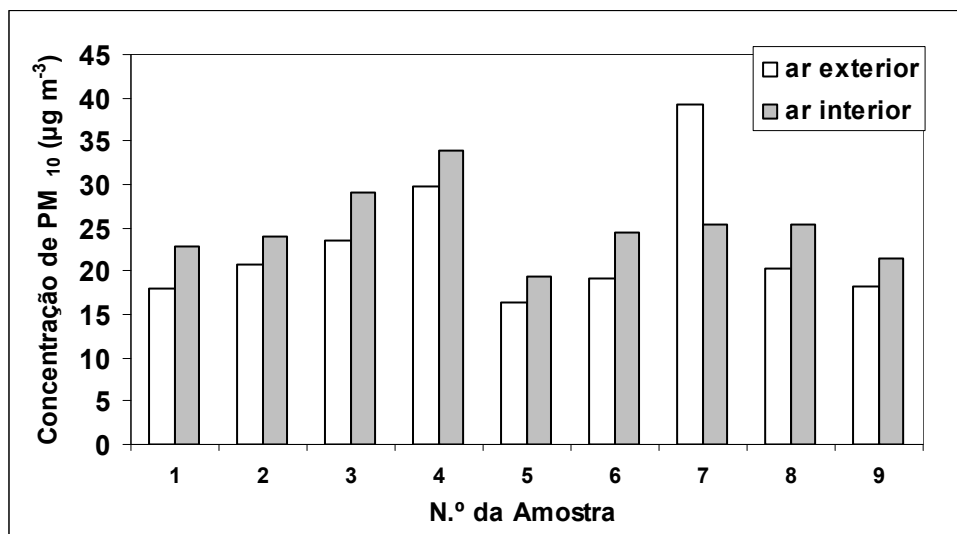


Figura - 23. Concentrações de partículas PM₁₀ no ar interior e exterior do apartamento da Vera Cruz.

A Figura 24 apresenta os resultados das medições de celulose obtidas nesta série de amostragens. A concentração média de celulose em partículas exteriores apresentou um valor de $69 \pm 39 \text{ ng m}^{-3}$ (mínimo de 14 ng m^{-3} e máximo de 120 ng m^{-3}) de celulose, com cinco amostras inferiores ao limite de deteção. Nas amostragens realizadas no interior obteve-se uma concentração média de $0,99 \pm 0,24 \text{ } \mu\text{g m}^{-3}$ (mínimo de $0,66 \text{ } \mu\text{g m}^{-3}$ e máximo de $1,37 \text{ } \mu\text{g m}^{-3}$). A comparação entre os dados obtidos simultaneamente nos dois ambientes mostra que a concentração de celulose no ar interior é claramente superior à concentração no ar exterior. Esta tendência é de tal modo expressiva, para esta série de amostragens, que o valor mínimo determinado para a concentração no ar interior é superior ao valor máximo detectado no ar exterior.

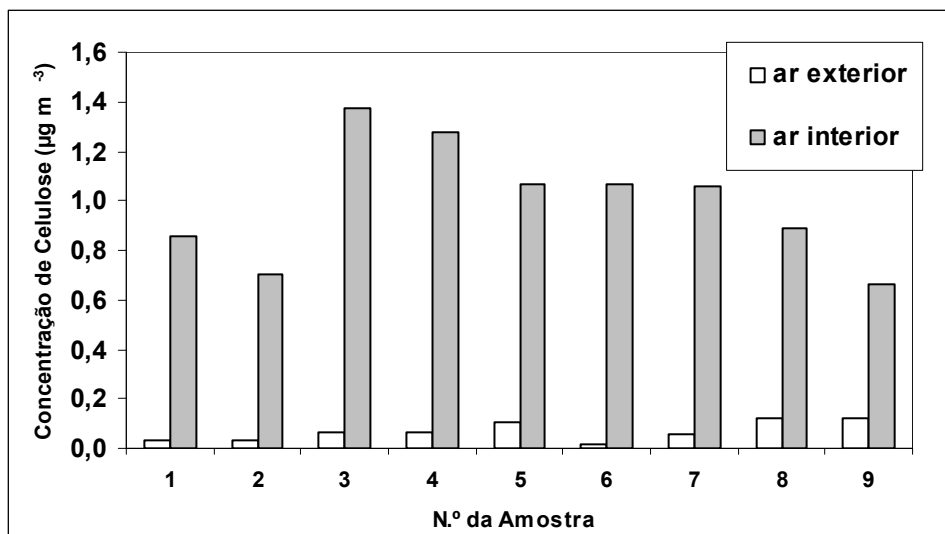


Figura - 24. Concentrações de celulose no ar interior e exterior do apartamento da Vera-Cruz.

Tendo em conta as diferenças de concentração celulose entre os ambientes exterior e interior, não surpreende que o contributo da celulose para a massa de partículas seja claramente superior para as amostras recolhidas no interior do apartamento (Figura 25). Assim, encontrou-se um teor médio de celulose de $4,0 \pm 0,8\%$ nas partículas recolhidas no ar interior e de $0,3 \pm 0,2\%$ nas partículas recolhidas no ar exterior. Confirma-se então que as fontes de celulose no interior do apartamento dão um contributo significativo para a massa de partículas em suspensão no ar ambiente.

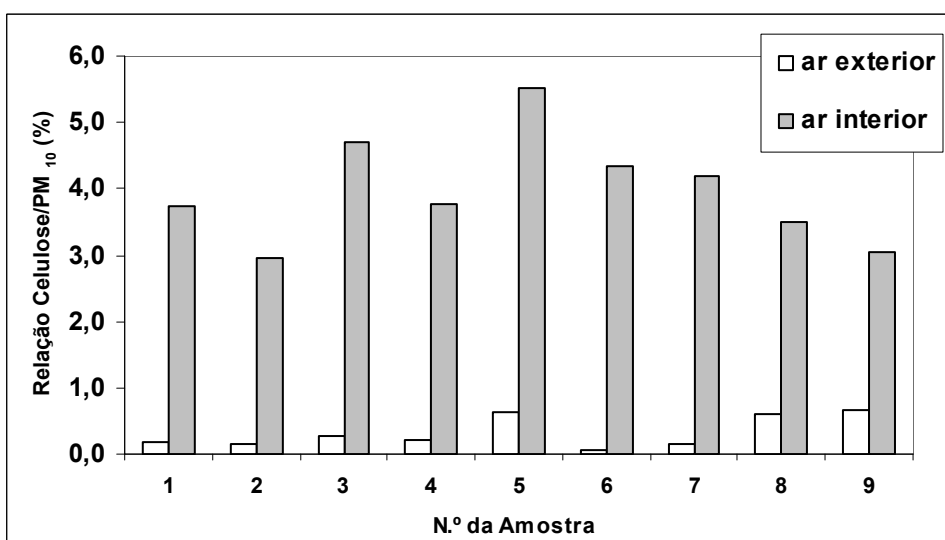


Figura - 25. Relação entre as concentrações de celulose e PM₁₀ no ar interior e exterior do apartamento da Vera-Cruz.

5.5 Resumo dos resultados obtidos e comparação com outros estudos

Na tabela seguinte resumem-se os resultados das medições da concentração mássica de partículas do aerossol e das correspondentes medições da concentração de celulose obtidas neste estudo. É necessário ter em consideração que nem todos os resultados das medições de celulose resumidas na tabela foram corrigidos para o teor de glucose no aerossol. Isto aconteceu especificamente nas medições realizadas nas residências universitárias. Todavia, este facto não compromete a interpretação global dos resultados, na medida em que a massa de glucose no aerossol é muito baixa e, por conseguinte, o erro resultante da contabilização da glucose para a massa de celulose pode considerar-se desprezável.

Tabela IV – Valores médios e correspondentes desvios-padrão das concentrações de PM₁₀, PM_{2,5} e celulose determinadas neste estudo.

Local	Espaço	Atmosfera	Tipo	Massa de partículas (µg/m ³)	Celulose (µg/m ³)	Razão Cel/Massa (%)
Residências universitárias	cozinha	interior	PM ₁₀	43,4 ± 25,1	0,57 ± 0,58	1,4
	quarto	interior	PM ₁₀	33,8 ± 6,8	1,08 ± 0,51	3,4
DAO - UA	laborat.	interior	PM ₁₀	20,0 ± 8,0	0,27 ± 0,14	1,8
	terraço	exterior	PM ₁₀	25,0 ± 10,7	0,11 ± 0,06	0,5
Moradia (Cacia)	quarto	interior	PM ₁₀ *	29,3 ± 10,1	2,80 ± 1,36	12,1
	terraço	exterior	PM ₁₀ *	13,6 ± 8,0	0,17 ± 0,13	2,3
Apartamento (Vera-Cruz)	quarto	interior	PM ₁₀	31,5 ± 10,5	2,54 ± 0,90	8,1
	quarto	interior	PM _{2,5}	12,1 ± 6,3	0,58 ± 0,23	6,6
	quarto	interior	PM ₁₀	25,1 ± 4,3	0,99 ± 0,24	4,0
	varanda	exterior	PM ₁₀	22,8 ± 7,3	0,07 ± 0,04	0,3
Global	todos	interior	PM ₁₀	29,4 ± 12,9	1,47 ± 1,26	5,6
	todos	exterior	PM ₁₀	20,4 ± 9,5	0,12 ± 0,10	1,1

* o caudal de amostragem não foi especificado para o equipamento em causa, pelo que o diâmetro de corte não correspondeu exactamente a 10 µm.

Neste estudo, a concentração média da massa de partículas PM_{10} no ar interior variou entre 20,0 e 43,4 $\mu\text{g m}^{-3}$. O valor mais baixo foi encontrado nos laboratórios do Departamento de Ambiente e Ordenamento, enquanto o máximo ocorreu na cozinha das residências universitárias. Em certa medida, estes eram resultados esperados, tendo em conta que o laboratório caracterizado não apresenta fontes importantes de partículas – para além das decorrentes da movimentação de pessoas e da manipulação de material diverso não gerador de emissões –, enquanto na cozinha há uma actividade regular de confecção de alimentos, a qual é sabido que resulta na libertação de partículas para o ar ambiente.

No interior dos quartos as concentrações médias de PM_{10} apresentaram alguma regularidade, oscilando entre 25,0 e 31,5 $\mu\text{g m}^{-3}$. Quanto à concentração média encontrada para as partículas $PM_{2,5}$, foi de 12,1 $\mu\text{g m}^{-3}$, o que corresponde a pouco mais de 30% do valor médio da concentração de PM_{10} relativa ao mesmo espaço interior.

Os valores das concentrações de partículas $PM_{2,5}$ e PM_{10} encontrados neste estudo enquadram-se nos resultados anteriormente referidos na literatura. Breysse e colaboradores (2005) encontraram concentrações médias de $PM_{2,5}$ e PM_{10} de 45,1 e 56,5 $\mu\text{g m}^{-3}$, respectivamente, depois de terem realizado um conjunto de medições em cerca de 100 habitações da cidade de Baltimore (EUA). O facto dos teores médios encontrados naquelas habitações serem algo superiores aos valores obtidos em Aveiro pode, eventualmente, ser explicado pelo facto dos autores terem contemplado no seu trabalho casas com fumadores. Jones *et al.* (2000) referem concentrações médias de 7,9 e 16,5 $\mu\text{g m}^{-3}$, para $PM_{2,5}$ e PM_{10} , respectivamente, numa série de residências domésticas de Birmingham (Reino Unido). Por sua vez, Chao e Wong (2002) obtiveram concentrações médias de 45,0 e 63,3 $\mu\text{g m}^{-3}$, para $PM_{2,5}$ e PM_{10} , respectivamente, em habitações de Hong Kong (China). Os autores assinalaram ainda que os teores médios de partículas aumentavam cerca de 20% nas residências de fumadores. Todavia, em nenhuma das publicações aqui referenciadas é feita uma análise em separado das concentrações por divisão das habitações, o que torna difícil o confronto com os resultados do presente trabalho.

Relativamente às concentrações de partículas PM_{10} no exterior, verificou-se que variaram entre 13,6 $\mu\text{g m}^{-3}$ (Cacia) e 25,0 $\mu\text{g m}^{-3}$ (Universidade). A concentração de partículas no exterior do laboratório apresentou um valor superior ao interior, com uma relação interior/exterior de 0,8 enquanto que na habitação de Vera Cruz, esta relação foi superior à unidade (1,1).

No que se refere à celulose, obtiveram-se valores médios de concentração interior que variaram entre 0,27 e 2,80 $\mu\text{g m}^{-3}$, sendo que o mínimo ocorreu no laboratório do DAO e o máximo no quarto da habitação de Cacia. As concentrações encontradas nas residências foram muito próximas nos dois compartimentos caracterizados, com valores médios ligeiramente superiores nos quartos.

Em termos globais, as concentrações médias de “celulose livre” no ar interior e exterior foram 1,47 e 0,12 $\mu\text{g m}^{-3}$, respectivamente. Os correspondentes teores de celulose nas partículas do aerossol foram, em média, 6,2 e 1,5 %, indicando que este polímero contribuía de um modo mais expressivo para a massa de partículas em suspensão no ar interior do que no ar exterior. Conforme se referiu anteriormente, as diferenças entre o interior e o exterior parecem relacionar-se com a diversidade de materiais contendo algodão e papel existentes nos espaços interiores.

As concentrações referentes ao ar exterior parecem enquadrar-se nas medições efectuadas anteriormente por Kunit e Puxbaum (1996), em Viena, que se situaram no intervalo 0,1 - 0,9 $\mu\text{g m}^{-3}$ e corresponderam, em média, a cerca de 0,6% da massa total de partículas suspensas. Ainda assim, é necessário ter em conta que os autores determinaram celulose total, enquanto neste estudo se determinou somente a “celulose livre”. Ora, segundo Puxbaum e Tenze-Kunit (2003), esta componente corresponde a cerca de 75% da celulose total.

No ar exterior de Cacia, e não obstante o caudal de amostragem ter sido inferior ao pretendido, a concentração média de celulose foi praticamente o dobro da encontrada no ar exterior do Campus Universitário. Até certo ponto, é possível que esta diferença possa estar relacionada com a presença de uma grande indústria de produção de pasta de papel a menos de 1 km do local onde se procedeu às colheitas. Outra explicação pode encontrar-se no carácter semi-urbano do local, cuja proximidade a áreas rurais pode justificar um aumento de partículas atmosféricas de origem vegetal. Resultados contrários ao deste estudo, ou seja, com valores de celulose mais altos em áreas urbanas do que em áreas rurais foram descritos por Puxbaum e Tenze-Kunit (2003), sem que, no entanto, tivessem sido apresentadas explicações muito consistentes para as diferenças observadas.

A concentração de celulose total em amostras do aerossol recolhidas numa zona rural de Aveiro foi determinada por Sánchez-Ochoa e colaboradores (2007), tendo-se obtido concentrações médias de 80 e 45 ng m^{-3} , para a Primavera e Verão,

respectivamente. Aplicando a estes valores o factor de conversão de 0,75 usado pelos autores, obtêm-se concentrações de “celulose livre” de 60 e 34 ng m⁻³, respectivamente, que são mais baixos do que os encontrados no ar exterior de Cacia ou do campus universitário. Todavia, é necessário ter em consideração que naquele estudo as amostras colhidas foram do tipo PM_{2,5}, pelo que as concentrações correspondentes em partículas PM₁₀ terão sido superiores.

5.6 Influência da celobiose nas determinações de celulose em partículas do aerossol

Numa fase inicial do trabalho experimental descrito nesta dissertação as determinações de celulose seguiram exactamente a metodologia descrita por Puxbaum e Tenze-Kunit (2003). Todavia, de acordo com Caseiro (comunicação pessoal), o aerossol atmosférico pode conter glucose, pelo que, numa fase mais adiantada do trabalho começaram a realizar-se medições regulares de glucose – em conformidade com o método anteriormente descrito no procedimento experimental –, as quais foram usadas para a correcção da “celulose livre” resultante da aplicação directa da técnica desenvolvida pelos investigadores austríacos.

Já no final do trabalho experimental que aqui se descreve, admitiu-se que também seria interessante avaliar a presença de celobiose nas partículas do aerossol e estimar o modo como este dissacarídeo afectava as medições de celulose aquando da aplicação do método de Puxbaum e Tenze-Kunit.

Assim sendo, recorreu-se a um filtro contendo partículas do aerossol recolhidas com um amostrador de elevado caudal, do qual se retiraram três conjuntos de 10 fracções circulares, sujeitando-se cada um desses conjuntos a uma variante do método de análise. Determinou-se então a concentração de glucose (sem adição de enzimas), de glucose e celobiose (através da adição de 90 µl de celobiase), e de glucose, celobiose e celulose (através da adição de celobiase e celulase; conforme o descrito por Puxbaum e Tenze-Kunit).

Os resultados obtidos após a realização deste ensaio são apresentados na Figura 26, e as linhas apresentadas correspondem às médias determinadas para cada parâmetro.

Neste teste foram utilizadas 10 amostras para cada determinação. No caso da glucose, algumas amostras apresentaram um valor inferior ao limite de detecção, devido à baixa sensibilidade do método para determinação de concentrações deste açúcar em partículas atmosféricas.

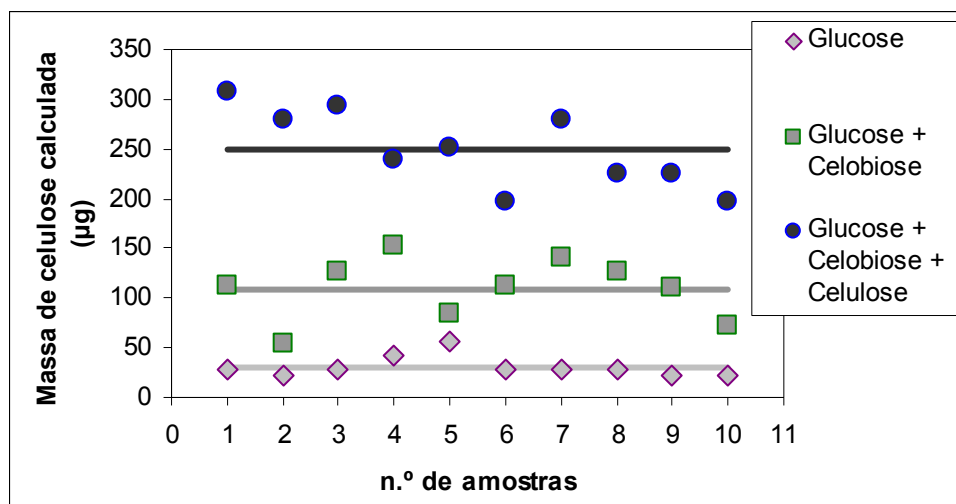


Figura -26. Comparação entre as massas equivalentes de celulose usando os três métodos de medição diferentes. As linhas horizontais correspondem ao valor médio das 10 determinações.

As massas médias equivalentes de celulose encontradas para estes conjuntos de dados são as seguintes; para a glucose foi calculada em $30,6 \pm 10,5 \mu\text{g}$, a glucose mais a celobiose apresentou um valor de $109,5 \pm 30,8 \mu\text{g}$ e, finalmente, a soma das três componentes, uma massa de $249,5 \pm 39,2 \mu\text{g}$ (estes valores correspondem à massa de celulose calculada)

Com base nestes valores, é possível recalculer a massa correspondente para cada uma das espécies presentes. Assim, obtêm-se os valores médios de $34,0 \mu\text{g}$ de glucose, $166,6 \mu\text{g}$ de celobiose e $140,0 \mu\text{g}$ de celulose. Por outro lado, a massa total proveniente da soma das contribuições da glucose e celobiose constitui cerca de 44 %, da massa de celulose total determinável através do método em causa.

A utilização do teste de reprodutibilidade indicou a existência de três espécies claramente identificáveis com o método de Puxbaum e Tenze-Kunit (2003): celulose, glucose e celobiose, o que indicia a necessidade de realização de mais testes deste tipo de forma a estabelecerem-se os níveis atmosféricos médios para estas espécies.

6 Conclusões e recomendações

Neste trabalho procedeu-se à implementação, em laboratório, de um procedimento de medição de “celulose livre”, baseado numa sacarificação enzimática e posterior análise do conteúdo em D-glucose, tendo em vista a sua posterior aplicação a amostras do aerossol atmosférico. O método tinha sido anteriormente proposto e aplicado com sucesso por uma dupla de investigadores austríacos (Kunit e Puxbaum, 1996; Puxbaum e Tenze-Kunit; 2003). Os primeiros ensaios realizados no âmbito desta dissertação, conduzidos com padrões de celulose, revelaram uma boa reprodutibilidade analítica e uma grande consistência entre determinações consecutivas, mas rendimentos de sacarificação muito inferiores aos descritos por aqueles autores. Procedeu-se então a modificações consecutivas das condições em que decorreram os ensaios, tendo-se verificado que era possível chegar a um rendimento semelhante ao referido anteriormente quando se adoptou como padrão fibras de celulose de tipo microgranular, provavelmente a estrutura que mais se assemelha à presente nas partículas do aerossol atmosférico.

O método foi então avaliado com amostras de aerossóis, tendo-se concluído que apresentava uma reprodutibilidade comparável à de estudos anteriores (cerca de 15%).

Numa fase posterior procedeu-se à aplicação daquele método à quantificação do conteúdo em “celulose livre” em partículas do aerossol interior. Efectuaram-se colheitas de partículas do tipo PM₁₀ em três locais distintos do concelho de Aveiro (*campus* universitário, moradia em Cacia e apartamento na Vera-Cruz), e, sempre que possível, em paralelo com colheitas de partículas do ar exterior.

Em termos globais, as concentrações médias de PM₁₀ no ar interior e exterior foram 29,4 e 20,4 $\mu\text{g m}^{-3}$, respectivamente. Por sua vez, as concentrações médias de “celulose livre” no ar interior e exterior foram 1,47 e 0,12 $\mu\text{g m}^{-3}$, respectivamente. Os correspondentes teores de celulose nas partículas do aerossol foram, em média, 5,6 e 1,1 %, indicando que este polímero contribuía de um modo mais expressivo para a massa de partículas em suspensão no ar interior do que no ar exterior.

As razões entre a concentração de celulose e a concentração de partículas PM₁₀ em ambientes interiores foram claramente mais altas nos quartos da moradia de Cacia e do

apartamento da Vera-Cruz, e mais baixas no laboratório do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro e na cozinha das residências universitárias. Estes resultados estão, muito provavelmente, associados ao facto de, nestes compartimentos, existir uma grande disponibilidade de materiais contendo celulose na forma de algodão (vestuário, carpetes e cortinas) ou na forma de papel (livros e material de escritório), cuja manipulação frequente é uma importante fonte emissora de partículas para a atmosfera.

Para um dos ambientes interiores (quarto do apartamento da Vera-Cruz) procedeu-se ainda à determinação simultânea das concentrações de “celulose livre” em partículas com duas classes de tamanhos ($PM_{2,5}$ e PM_{10}). Os resultados obtidos mostraram que a maior parte da “celulose livre” se encontrava associada à fracção grosseira do aerossol ($PM_{2,5-10}$), o que se explica com o facto da celulose ter uma origem maioritária em fontes de tipo primário, neste tipo de ambiente interior.

Saliente-se ainda que os resultados apresentados nesta dissertação têm alguma originalidade, na medida em que existe pouca informação sobre a química das partículas suspensas em espaços fechados, e, até ao presente, não há registo de trabalhos a reportarem medições da concentração de celulose no ar interior. Por outro lado, este estudo merece também algum relevo na medida em que mostra que o contributo da celulose para a massa de partículas em suspensão em ambientes interiores pode ser significativo, pelo que as estratégias de controlo dos níveis de poluição interior devem ter em consideração as fontes de celulose nesses espaços.

As medições de celobiose efectuadas já no final deste estudo abrem alguma discussão sobre o erro de que podem estar afectadas algumas das determinações aqui descritas, ou até mesmo as que são referidas na literatura, em consequência da presença de outros compostos açucarados nas partículas do aerossol. Este é claramente um aspecto que merece ser investigado em futuros trabalhos neste domínio.

Outro aspecto que necessita de ser explorado é o da relação entre a celulose total e a “celulose livre” em amostras do aerossol interior, algo que parece difícil de alcançar, tendo em conta as limitações do método de deslenhificação descrito por Kunit e Puxbaum (1996).

Não menos importante seria o aprofundar de conhecimentos sobre o contributo da celulose para a massa do aerossol em atmosferas exteriores, pois não é ainda claro onde é

que se podem encontrar as principais fontes deste polímero: se em atmosferas urbanas ou rurais.

Por fim, tendo em conta as diferenças entre as concentrações de celulose interior e exterior encontradas neste estudo, seria igualmente interessante diversificar os espaços interiores a caracterizar, nomeadamente contemplar outras divisões das habitações ou avançar no sentido da caracterização de atmosferas industriais.

7 Referências Bibliográficas

- APA**, Agência Portuguesa do Ambiente, Ambiente e Saúde, **2008**, URL: <http://www.apambiente.pt/>, [acedido a 11 de Agosto de 2008].
- Abt**, E., Suh, H. H., Allen, G. e Koutrakis, P., “Characterization of Indoor Particle Sources: A Study Conducted in the Metropolitan Boston Area”, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 108, pp. 35-44, **2000**.
- Bernstein**, J. A., Alexis, N., Bacchus, H., Bernstein, I. L., Fritz, P., Horner, E., Li, N., Mason, S., Nel, A., Oullette, J., Reijula, K., Reponen, T., Seltzer, J., Smith A., e Tarlo, S. M., “The health effects of nonindustrial indoor air pollution”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol. 121, pp. 585-591, **2008**.
- Brimblecombe**, P., *Air Composition and Chemistry*, Cambridge University Press, Cambridge, UK. **1986**.
- Breyse**, P. N., Buckley, T. J., Williams, D., Beck, C. M., Jo, S. J., Merriman, B., Kanchanaraks, S., Swartz, L. J., Callahan, K. A., Butz, A. M., Rand, C. S., Diette, G. B., Krishnan, J. A., Moseley, A.M., Curtin-Brosnan, J., Durkin, N. B. e Eggleston, P. A., “Indoor exposures to air pollutants and allergens in the homes of asthmatic children in inner-city Baltimore”, *Environmental Research*, Vol. 98, pp. 167-176, **2005**.
- Chao**, C. Y. e **Wong**, K. K., “Residential indoor PM₁₀ and PM_{2.5} in Hong Kong and the elemental composition”, *Atmospheric Environment*, Vol. 36, pp. 265-277, **2002**.
- EEA**, European Environmental Agency, *Europe's environment The fourth assessment*, Office for Official Publications of the European Communities, Copenhagen, **2007a**.
- EEA**, Report 2, European Environment Agency, *Air pollution in Europe 1990-2004*, Copenhagen, Denmark, **2007b**.
- EPA**, Environmental Protection Agency, *Particle Pollution*, **2007**, [online data], URL: <http://www.epa.gov/air/particlepollution/> [acedido a 13 de Novembro de 2007].
- Envspgroup**, Environmental Specialties Group, *Indoor Air Quality Monitoring/Testing*, **2008**, URL: <http://www.envspgroup.com/Services/>, [acedido a 21 de Setembro de 2008]

- Finch, P. e Roberts, J. C.**, “Enzymatic degradation of cellulose”, Nevell, T. P. e Zeronian, S.H. (eds), *Cellulose Chemistry and its applications*, Ellis Horwood Limited, Chichester, West Sussex, England, **1985**.
- Finlayson-Pitts, B. J. e Pitts, J. N., Jr.**, *Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere*, Academic Press, Orlando, Florida, **1999**.
- Foyle, T., Jennings, L. e Mulcahy, P.**, “Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw”, *Bioresource Technology*, Vol. 98, pp. 3026–3036, **2007**.
- Gould, M. J.**, “Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification”, *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 26, pp. 46-52. **1984**.
- Holopainen, R., Hautamäki, M., Hämeri, K., Kukkonen, E., Kulmala, I., Kurnitski, J., Lehtimäki, M., Lähde, T., Palonen, J., Pasanen, P., Seppänen, O., Säteri, J., Taipale, A. e Vartiainen, E.**, *Mitigating The Adverse Impact of Particulates on Indoor Air*, Tekes, Libris Oy, Helsinki, **2006**.
- Jacobson, M. C., Hansson, H.C., Noone, K. J. e Charlson, R. J.**, “Organic Atmospheric Aerosols: Review and State of the Science”, *Reviews of Geophysics*, Vol. 38, pp. 267-294, **2000**.
- Jones, N. C., Thornton, C. A., Mark, D. e Harrison R. M.**, “Indoor/outdoor relationships of particulate matter in domestic homes with roadside, urban and rural locations”, *Atmospheric Environment*, Vol. 34, pp. 2603-2612, **2000**.
- Kenill, C. J. e Kennedy, J. F.**, Degradation of cellulose under alkaline conditions, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 51, pp. 281–300, **2003**.
- Kunit, M. e Puxbaum, H.**, "Enzymatic Determination of the Cellulose content of Atmospheric Aerosols”, *Atmospheric Environment*, Vol. 30, pp. 1233 1236, **1996**.
- Lunden, M. M., Kirchstetter, T. W., Thatcher, T. L., Hering, S. V. e Brown, N. J.**, “Factors affecting the indoor concentrations of carbonaceous aerosols of outdoor origin”, *Atmospheric Environment*, Vol. 42, pp. 5660– 5671, **2008**.
- Malešič, J., Kolar, J., Strlič, M., Kočar, D., Fromageot, D., Lemaire, J. e Hailant, O.**, “Photo-induced degradation of cellulose”, *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 89, pp. 64-69, **2005**.

- Malm**, W. C., *Introduction to Visibility*, Cooperative Institute for Research in the Atmosphere (CIRA), Colorado State University, Fort Collins, **1999**.
- Manahan**, S.E., *Fundamentals of Environmental Chemistry*, 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, **2001**.
- Marr**, I., “Procedure Style Guide”, *Quality Manual*, AQUELLA Project, **2005**.
- Mølhave**, L., Kjærgaard, S. K., Attermann, J., “Respiratory effects of experimental exposure to office dust”, *Indoor Air*, Vol. 14, pp. 376–384, **2004**.
- Nevell**, T. P., “Degradation of cellulose by acids, alkalis, and mechanical means”, Nevell, T. P. e Zeronian (eds), S.H., *Cellulose Chemistry and its applications*, Ellis Horwood Limited, Chichester, West Sussex, England, **1985a**.
- Nevell**, T. P., “Oxidation of cellulose”, Nevell, T. P. e Zeronian, S.H. (eds), *Cellulose Chemistry and its applications*, Ellis Horwood Limited, Chichester, West Sussex, England, **1985b**.
- Puxbaum**, H., e **Tenze-Kunit**, “Size distribution and seasonal variation of atmospheric cellulose”, *Atmospheric Environment*, Vol. 37, pp. 3693–3699, **2003**.
- QUARG - Quality of Urban Air Review Group**, *Airborne Particulate Matter in the United Kingdom*, 3rd Report of the Quality of Urban Air Review Group to the Department of the Environment, London, 1996.
- REA**, *Relatório do Estado do Ambiente Portugal 2006*, Cap. 3, Outubro de **2007**, URL: <http://www.apambiente.pt/>, [acedido a 13 de Novembro de 2007].
- Reynolds**, K. A., “Indoor Air Quality”, Pepper, I. L., Gerba, C. P. e Bausseau M. L. (eds), *Environmental & Pollution Science 2nd Ed.*, Pepper, I. L., Gerba, C. P., Brusseau, M. L., Elsevier, Oxford, UK, **2006**.
- Rosgaard**, L., Pedersen, S., Cherry, J.R., Harris, P. e Meyer, A.S., “Efficiency of New Fungal Cellulase Systems in Boosting Enzymatic Degradation of Barley Straw Lignocellulose”, *Biotechnology Progress*, Vol. 22, pp. 493-498, **2006**.
- Sánchez-Ochoa**, A., Kasper-Giebl, A., Puxbaum, H., Gelencser, A., Legrand M. e Pio, C., Concentration of atmospheric cellulose: A proxy for plant debris across a west-east transect over Europe”, *Journal of Geophysical Research*, Vol. 112, D23s08, Doi:10.1029/2006jd008180, **2007**.

- Shafizadeh**, F., “Thermal degradation of cellulose”, Nevell, T. P. e Zeronian (eds), S.H., *Cellulose Chemistry and its applications*, Ellis Horwood Limited, Chichester, West Sussex, England, **1985**.
- Sjöström**, E., *Wood Chemistry Fundamentals and Application*, 2nd Ed., Academic Press, San Diego, California, **1993**.
- TECORA**, *Accessories for Ambient Sampling*, TCR TECORA, Itália, **2005**, URL: <http://www.tecora.it/en/pdf/>, [acedido a 29 de Abril de 2008].
- Weschler**, C. J. e **Shields**, H. C., “Experiments probing the influence of air exchange rates on secondary organic aerosols derived from indoor chemistry”, *Atmospheric Environment*, Vol. 37, pp. 5621–5631, **2003**.
- Wilson**, W., Claiborn, C. S. e Hemming, B. L., “Physics, Chemistry, and Measurement of Particulate Matter”, *Air Quality Criteria for Particulate Matter Vol. II*, National Center for Environmental Assessment-RTP Office, Office of Research and Development, Research Triangle Park, NC, **2004**.

Anexos

1. Procedimento de determinação da celulose
2. Calibração dos amostradores
3. Procedimento de lavagem do material
4. Artigo de Puxbaum e Tenze-Kunit (2003)

Procedimento de determinação da celulose

1. Objectivo do procedimento

O procedimento refere-se à determinação de celulose em partículas atmosféricas recolhidas previamente em filtros de fibra de quartzo.

2. Referência

Marr, I., “Procedure Style Guide”, *Quality Manual*, AQUELLA Project, 2005

3. Princípio

Após a eluição com uma solução tampão de ácido cítrico 0,05 M (pH = 4,8), uma extracção com um banho ultrasónico e a sacarificação em glucose, com a acção de duas enzimas (celulase de *Trichoderma reesei* e celobiase de *Aspergillus niger*), a celulose é analisada fotometricamente usando um *kit* de análise disponível comercialmente (D-glucose HK, *Megazyme International Ireland Ltd.*).

4. Reagentes

Cellulose, microgranular (Sigma-Aldrich C6413)

Cellulose, fibrous, medium (Sigma-Aldrich C6288)

Cellulose, microcrystalline, powder (Sigma-Aldrich 435236)

Ácido cítrico monohidratado, cristalino, extra puro, Pronalab

Citrato de tri-sódio dihidratado, Riedel-de Haën

Hidróxido de sódio, lentilhas, Panreac

Timol, cristalino, extra puro, Riedel-de Haën

Tubo de diálise de membrana de celulose, 100 *ft.*, Sigma Aldrich, D9277

Celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921, Cellulclast 1.5L, Sigma Aldrich CAS 9012-54-8, EC No 232-734-4, C2730

Celobiase de *Aspergillus niger*, Novozym 188, Sigma Aldrich EC No 232-589-7, C6105

Glicerol, 99% (glicerina), May & Barker

Megazyme D-Glucose - HK, K-GLUHKR (110 determinações) e K-GLUHKL (220 determinações), *Megazyme International Ireland Ltd.*

Padrões de Celulose: Pesar 10 porções independentes de celulose (entre 200 e 800 μ g) e dissolver em 3 mL de solução de eluição em frascos de plástico de 5 mL.

Solução de Eluição (solução tampão de ácido cítrico, 0.05 M, a pH = 4.8, com timol a 0.05%): pesar 10,507 g de ácido cítrico monohidratado, dissolver em água desionizada (cerca de 40 mL) e ajustar o pH para 3 com uma solução de hidróxido de sódio a 50 % (w/v). Diluir com um volume próximo de 1L e adicionar 0,5 g de timol (com o auxílio da agitação ultrasónica). Ajustar o pH para 4,8 usando a solução de hidróxido de sódio.

Preparação das Enzimas: Pesar 20,34 g de ácido cítrico monohidratado e 35,01 g de citrato tri-sódio e diluir em 4,5 L de água desionizada. Colocar o recipiente a uma temperatura entre 2 e 6 °C, durante cerca de 15 h (durante a noite). Cortar dois pedaços do tubo de diálise e colocar em água desionizada durante 1 hora. Após o fecho da extremidade de um tubo de diálise, com um nó, proceder ao enchimento do mesmo com as enzimas, e, seguidamente, fechar a outra extremidade também com um nó. Colocar os tubos de diálise, unidos por um fio de *nylon*, na solução de ácido cítrico / citrato de tri-sódio, previamente inserida num banho de gelo (a solução tem que estar sempre a uma temperatura inferior a 10 °C), com agitação (Figura 1).

Cerca de 12 horas depois (todo o dia), transferir o recipiente para o frigorífico, a uma temperatura de 2 a 6 °C, onde fica durante 15 horas (durante a noite). Finalmente, cortar uma extremidade do tubo de diálise e transferir as enzimas para pequenos tubos de plástico, adicionar 4% (v/v) da solução de glicerina e armazenar no congelador.



Figura. 1 – Solução de diálise num banho de gelo

Megazyme Test Kit Solução 2: Conforme o descrito no manual do Megazyme Test Kit, é necessário proceder à diluição do conteúdo do frasco 2 com 12 mL água desionizada, que é então dividida em penas fracções (com o volume necessário) para armazenamento no frigorífico em frascos de plástico.

5. Equipamento para análise

Espectrofotómetro de UV/visível (M501, Camspec)

Banho termostaticado (B/M3, Lauda)

Centrifugadora

Tubos de ensaio de 10 mL e frascos de plástico de 5 mL,

Cuvetes PMMA, Halbmikro, 1,5 – 3 mL, VWR, N.º 6340001,

Balança (AG245, Mettler Toledo)

Medidor de pH

Banho ultrasónico (RK156, Bandelin Sonorex)

6. Amostras

Introduzir filtros de fibra de quartzo (4,7 cm de diâmetro) em invólucros de alumínio devidamente identificados. Submeter os filtros a uma temperatura de 500 °C, durante um período aproximado de 2 horas.

Colocar os filtros, dentro de uma caixa de Petri aberta, no interior de uma caixa com temperatura e humidade aproximadamente constantes, durante 24 h. Estimar a massa dos filtros. A massa é obtida como a média de três pesagens (filtro + alumínio) com variação entre si não superior a 0,00001 g.

Transportar os filtros para o local de amostragem dentro de uma caixa de Petri fechada. No local, retirar os filtros dos invólucros e colocar nos amostradores.

Após a amostragem, transferir os filtros para os invólucros respectivos, colocar em caixas de Petri, fechar, transportar para o laboratório e congelar para posterior análise.

Quando o número de filtros for suficiente para a análise de um lote de amostras, descongelar, acondicionar na caixa com temperatura e humidade controladas, durante 24h, e repetir a pesagem.

7. Análise das amostras de celulose

Preparação do espectrofotómetro

Ligar o espectrofotómetro, com cerca de 2 h de antecedência, e ajustar o comprimento de onda para 340 nm. Depois de estabilizado, acertar o zero do aparelho com água destilada.

Sacarificação e extracção

Recolher quatro fracções circulares de cada filtro¹, com o auxílio de um vazador de 12 mm de diâmetro, executando a tarefa sobre uma placa de vidro, previamente limpa com água desionizada e etanol. Transferir 4 fracções de cada filtro para um frasco de plástico de 5 mL e adicionar 2,7 mL da solução de eluição. Fechar o frasco com a respectiva tampa e colocar num banho ultra-sónico (Figura 2), durante 40 min, a fim de se proceder à extracção das partículas acumuladas no filtro. Proceder de modo idêntico com 4 ou 5 filtros não amostrados, para servirem de brancos.



Figura. 2 – Frascos de plástico com as amostras no banho ultra-sónico

Durante o tempo em que decorre a extracção, proceder às diluições das enzimas. Diluir a celulase 10 vezes e a celobiase 100 vezes, usando, em ambos os casos, água desionizada.

Retirar os tubos de plástico do banho e agitar vigorosamente durante aproximadamente 1 min. Adicionar 90 µL de cada uma das preparações de enzimas diluídas. Tapar os frascos com a tampa correspondente e envolver a zona do gargalo com Parafilme®, para se garantir que a mesma não salta durante a fase de desnaturação das enzimas.

Transferir os frascos para um banho termostaticado, e deixá-los a uma temperatura constante de 45,5 °C, durante 24 horas.

¹ Cada filtro permite a recolha de oito fracções circulares: metade é usada para a determinação da celulose; a outra metade pode ser usada para a determinação de glucose ou celobiose.

Análise

Aquecer as amostras a 85 °C, durante pelo menos 10 minutos, por forma a desnaturar as enzimas e dar por concluída a sua actividade. Para se garantir que as tampas não saltam, devido ao aumento de pressão no interior dos tubos de plástico, é aconselhável que estes fiquem entalados dentro do banho termostaticado, por exemplo, colocando um objecto entre o topo dos tubos e tampa do equipamento.

Retirar as amostras do banho termostaticado e transferi-las para um frigorífico, a 4 °C, para que arrefeçam, durante cerca de 30 min.

Centrifugar as amostras durante 15 min e transferir a suspensão para tubos de ensaio de vidro, centrifugar novamente durante 10 min.

Determinar a glucose seguindo o procedimento apresentado no manual do *kit* da Megazyme, com as modificações descritas de seguida.

Transferir 1000 µL dos extractos sobrenadantes para *cuvettes* independentes.

Adicionar a cada uma das *cuvettes* 50 µL de água desionizada, 50 µL da solução 1 do *kit* (padrão de imidazol), 50 µL da solução 2 (NADP⁺/ATP) e agitar.

Aguardar 5 e proceder à medição da absorvância das amostras a um comprimento de onda de 340 nm. As leituras da absorvância devem ser repetidas até que a variação na série não seja superior a 0,001 unidades de absorvância..

Adicionar 10 µL da solução 3 do *kit* (glucose-6-fosfato desidrogenase) e agitar. Aguardar novamente 5 a 10 minutos, para que as reacções se completem, e proceder a nova leitura da absorvância, a 340 nm, conforme o descrito para a primeira medição

8. Cálculos

A concentração de D-glucose é calculada de seguinte forma:

$$C_{D-Glucose} = \frac{V \times M_w}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{D-Glucose}$$

Onde,

V = volume final (mL)

M_w = massa molecular da glucose (g/mol)

ε = coeficiente de extinção do NADPH a 340 nm= 6300 [L × mol⁻¹ × cm⁻¹]

d = trajecto óptico [cm]

v = volume de amostra [mL]

$\Delta A_{D-Glucose}$ = diferença das leituras da absorvância

Calcular a concentração de D-glucose para ambas as séries de amostras e de brancos. Após a conversão em massa de celulose, subtrair à massa das amostras a massa dos brancos.

9. Determinação do rendimento da sacarificação

O rendimento do processo de sacarificação é determinado através da análise de padrões de celulose pura, sujeitando-os a um procedimento idêntico ao descrito para a quantificação do conteúdo em celulose nas amostras de aerossóis.

Neste caso, os padrões de celulose são transferidos directamente para os frascos de plástico. As quantidades a pesar devem estar compreendidas, preferencialmente, entre 200 e 800 μg de celulose.

Por outro lado, o volume de solução de eluição deve ser superior (3 mL). Da mesma forma, a quantidade de enzimas diluídas também é superior, 100 μL de cada solução.

Na etapa relativa à centrifugação, o processo decorria uma única vez, durante 15 min, devido à quantidade de sobrenadante a transferir para as *cuvettes*.

Como a solução de eluição apresenta uma concentração de glucose tipicamente superior à das amostras, o volume a transferir para as *cuvettes* é inferior. Assim, nesta fase, o volume de sobrenadante a transferir varia entre 50 e 100 μL , dependendo da concentração de glucose, e o volume de água desionizada varia entre 950 e 1000 μL , dependendo do volume de sobrenadante adicionado.

10. Determinação de outros açúcares nas amostras

A determinação de glucose nas amostras do aerossol é possível recorrendo às fracções não utilizadas dos filtros iniciais. O procedimento a seguir é semelhante ao descrito para a celulose. A única alteração corresponde à etapa da adição de enzimas, que não ocorre nesta determinação.

Alternativamente, aquelas fracções podem ser usadas para a determinação do conteúdo em glucose e celobiose nas amostras. O procedimento a seguir é também o descrito para a celulose. A única diferença reside na supressão da adição da enzima celulase às amostras.

Procedimento de calibração dos amostradores

1. Objectivo do procedimento

O procedimento refere o modo de determinação do caudal usado nas colheitas do aerossol com os amostradores de baixo caudal TECORA, recorrendo, para o efeito, a um medidor de caudal mássico calibrado. Este passo permite fornecer uma estimativa mais aproximada do caudal utilizado na amostragem.

2. Material

Amostrador de baixo caudal (TECORA, ECHO PM, N.º E0343029)

Amostrador de baixo caudal (TECORA, ECHO PM, N.º E0638134)

Medidor de fluxo mássico (Aalborg, GFM)

3. Procedimento

Ligar o medidor de fluxo mássico alguns minutos antes de dar início à calibração, para que o equipamento estabilize, e unir, com uma tubagem adequada, a saída do medidor à entrada do porta-filtros do amostrador (Figura 1).

Programar uma amostragem com a duração de 10 min, dar a instrução de início no equipamento de colheita e registar o valor médio do caudal fornecido pelo medidor. No final deste período, consultar o registo da amostragem e anotar o caudal nas condições de calibração, o caudal nas condições normais (0 °C e 1 atm), pressão e temperatura média.

Repetir o procedimento com 5 caudais de amostragem diferentes, com incrementos de 2 L min^{-1} , de forma a estabelecer uma relação entre os dados do medidor de caudal mássico e os do amostrador.

4. Cálculos

Uma vez concluído o conjunto de determinações, proceder à sequência de cálculos apresentada na Figura 2 e determinar a relação matemática entre o caudal do amostrador e o caudal do medidor de fluxo mássico. Esta relação permite a determinação de um valor de caudal para a calibração interna de cada amostrador.



Figura.- 1 – Montagem para calibração do amostrador TECORA.

	Caudal do medidor de caudal mássico ($L \text{ min}^{-1}$) (Q_m)	
$Q_{19^\circ\text{C}} = 1,999 \times Q_m \square 1,512$	↓	
	Caudal da calibração do medidor ($Q_{19^\circ\text{C}}$)	
$Q_0 = \frac{Q_{19^\circ\text{C}} \times T_0}{T_p}$	↓	$T_0 = 273,15 \text{ K}$ $T_p = 292,15 \text{ K}$
	Caudal do medidor normalizado (Q_0)	
$Q_a = Q_0 \times \frac{P_0 \times T_a}{P_a \times T_0}$	↓	$P_0 = 101325 \text{ Pa}$ $P_a = \text{pressão da amostragem}$ $T_a = \text{temperatura da amostra}$
	Caudal actual (Q_a)	

Figura 2.- Esquema utilizado para o cálculo do caudal de amostragem

Procedimento de lavagem do material

1. Objectivo do procedimento

O procedimento refere a lavagem do material utilizado para a colheita e análise de celulose, de forma a minimizar possíveis interferências

2. Princípio

Se o material utilizado apresentar alguma quantidade de celulose, glucose ou celobiose, podem ocorrer intereferência na determinação analítica. A eliminação destas espécies do material é realizada com a acção de água, detergente de limpeza e um banho ultra-sónico, e apresenta diferenciação dependente do seu envolvimento no processo.

3. Procedimento

O material de vidro (caixas de Petri, varetas, copos, balões volumétricos, fracos, material de filtração), de plástico (pinças, tampas, copo de 5 L) e metal (pinça, vazador, espátulas e dispositivo de recolha da água da chuva) é sujeito ao mesmo procedimento de lavagem.

Derramar uma pequena quantidade de detergente sobre cada um dos diferentes materiais, depois de terem sido molhados com água da torneira. Esfregar com um escovilhão, previamente molhado, e enxaguar com água corrente da torneira, por forma a remover completamente os resíduos de detergente.

Lavar com água destilada (repetir esta etapa três vezes para o material a usar no armazenamento de substâncias), e, seguidamente, com água bidestilada (igualmente três vezes para o material a usar no armazenamento de substâncias), antes do material ser colocado a escorrer num local adequado.

O material de digestão e de análise (tubos de ensaio em vidro, tubos de plástico e *cuvettes*) segue um procedimento de lavagem diferente.

Lavar com água da torneira e colocar num copo de vidro.

Lavar três vezes com água destilada.

Colocar água destilada no copo, submergir todo o material, e inserir num banho ultra-sónico durante 15 min.

Por fim, deixar escorrer o material e completar a secagem num exsiccador.



Size distribution and seasonal variation of atmospheric cellulose

Hans Puxbaum*, Monika Tenze-Kunit¹

Institute for Chemical Technology and Analytics, Vienna University of Technology, Getreidemarkt 9/1164AC, A 1060 Vienna, Austria

Received 6 January 2003; received in revised form 30 April 2003; accepted 12 May 2003

Abstract

Atmospheric cellulose is a main constituent of the insoluble organic aerosol and a “macrotracer” for plant debris. A time series of the cellulose concentration at a downtown site in Vienna showed a maximum concentration during fall and a secondary maximum during spring. The fall maximum appears to be associated with leaf litter production, the spring maximum with increased biological activity involving repulsion of cellulose-containing particles, e.g. seed production. The grand average of the time series over 9 months was $0.374 \mu\text{g m}^{-3}$ cellulose, respectively, $0.75 \mu\text{g m}^{-3}$ plant debris. Compared to an annual average of $5.7 \mu\text{g m}^{-3}$ organic carbon as observed at a Vienna downtown site it becomes clear that plant debris is a major contributor to the organic aerosol and has to be considered in source attribution studies. Simultaneous measurements at the downtown and a suburban site indicated that particulate cellulose is obviously not produced within the city in notable amounts, at least during the campaign in December. Size distribution measurements with impactors showed the unexpected result that “fine aerosol” size particles ($0.1\text{--}1.6 \mu\text{m}$ aerodynamic diameter) contained 0.7% “free cellulose” on a mass basis, forming a wettable, but insoluble part of the accumulation mode aerosol.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Biopolymers; Particulate matter; Organic aerosol; Impactor sampling; Enzymatic analysis

1. Introduction

There is recent evidence that a large fraction of the continental organic aerosol consists of polymeric or oligomeric substances. Rogge et al. (1993a) and Zappoli et al. (1999) have shown that a considerable part of the organic aerosol is not soluble in water and organic solvents, which points to larger molecular sizes of the insoluble compounds. Matthias-Maser and Jaenicke (1995) have demonstrated that up to 40% of the number of particles $> 0.2 \mu\text{m}$ aerodynamic diameter (AD) over a

continental site were considered of “biogenic origin”. The high contribution of biogenic material to the particle number concentration might point to biopolymers as a main source for the insoluble organic constituents in the atmospheric aerosol. Fungal spores were found in the size fraction of $2.15\text{--}10 \mu\text{m}$ of organic background aerosol at a mountain site forming on the average 6% of the organic carbon (OC) of the “coarse” size fraction (Bauer et al., 2002). The main constituents of the organic aerosol according to current knowledge are the humic like substances (HULIS), present ubiquitously in continental aerosol samples at concentrations (HULIS-carbon) from 7% to 24% of the OC (Havers et al., 1998; Zappoli et al., 1999; Facchini et al., 1999). HULIS are definitely macromolecular substances, possibly with manifold origin (e.g. from biomass burning—Facchini et al., 1999; or from secondary reactions in the atmosphere—Gelencser et al., 2003).

*Corresponding author. Tel.: +43-1-58801-151-70;
fax: +43-1-58801-15199.

E-mail address: hpuxbaum@mail.zserv.tuwien.ac.at
(H. Puxbaum).

¹Presently at: Mansteinverlag, Wiedner Hauptstrasse 61,
A-1040 Vienna, Austria.

The most frequently occurring biopolymer in terrestrial environments is cellulose, as green plants contain, in leaves, around 50% of dry weight cellulose (Butler and Bailey, 1973). Due to the seasonal cycles of the canopies of deciduous trees in temperate regions and the decay processes of the leaf litter, large fluxes of the decay products in the atmosphere have been invoked (Brimblecombe, 1986). Kunit and Puxbaum (1996) described a method for the determination of atmospheric cellulose at the microgram-level and showed that cellulose is a major organic species in urban aerosol from Vienna. These observations were made on open-face filter-samples with total suspended particles (TSP) sampling characteristics. Here we report about the size distribution of atmospheric cellulose and the seasonal variation of the atmospheric cellulose concentration at the same urban site. Unexpectedly, a large fraction of the cellulose occurred in the fine aerosol size fraction ($<1.6 \mu\text{m AD}$).

2. Cellulose in aerosols—terminology

Cellulose in green plants occurs as macromolecules with a polymerisation degree generally in the range of 300–3000; in some cases, e.g. in fibres of cotton seeds up to 15,000 (Kürschner, 1966). The cellulose molecules are formed from D-glucose units in β -(1,4)-glucosidic bonding. The linear macromolecules form micelles via hydrogen bondings, which then associate to micro fibrils (Denffer, 1978). In many plant seeds the visible white fibres are pure cellulose. This type of cellulose is referred to as *free cellulose*, as it is directly accessible to saccharification. The cellulose micelles in leaves and wooden material are to a certain extent encapsulated by lignin and in bark also by suberin. Lignin, a mixed polymer of phenylpropane derivatives, adds pressure strength to the tensile strength of the fibrous cellulose (Kirk and Obst, 1988). Green leaves and wooden parts of plants contain free as well as encapsulated cellulose. For the determination of the *total cellulose*, a delignification step is performed prior to the saccharification procedure (Wood and Saddler, 1988). Thus, “free cellulose” is a fraction of “total cellulose”. In cases where “total cellulose” cannot be determined due to analytical constraints, “free cellulose” is determined, and the amount of “total cellulose” is derived via a conversion factor separately determined by comparing amounts of “free” and “total cellulose” in atmospheric samples. Each of the analytical steps—delignification, saccharification, and enzymatic determination of the D-glucose has to be carefully tested for the respective efficiency, which have to be taken into account for the evaluation of the results of atmospheric samples (Kunit and Puxbaum, 1996).

In leaves of terrestrial plants the content of cellulose is around 50%, while lignin amounts to $<20\%$ and

hemicelluloses 20–30% (Butler and Bailey, 1973). As we assume that the major fraction of cellulose in continental aerosol originates from decomposition processes of leaves, the portion of plant debris in aerosols is proposed to be estimated according to the mass fraction of cellulose in leaves by the following relation:

$$\text{“plant debris”} = 2 * \text{cellulose.} \quad (1)$$

Plant debris appears to be an important contributor to OC in atmospheric aerosols (Kunit and Puxbaum, 1996). Cellulose is also contained in pollen at concentrations of 3–7% in dry mass (Stanley and Linsken, 1985), and it can be produced by some bacteria, e.g. *Acetobacter xylinum*; their contribution has to be assessed in future studies.

3. Experimental

3.1. Experimental sites

Aerosol samples were from downtown Vienna, collected at a balcony in 9 m elevation at the Institute site (VUT); and from a site at the northwesterly city border in the Wienerwald (Vienna Forest). The sampling site was in a garden area near “Jubilaumswarte”, around 9 km north west of the downtown site.

3.2. Sampling methods

Aerosol samples were collected on glass fibre filters (Gelman Type A, 47 mm diameter) with Low Volume Aerosol samplers with open face sampling heads, in the downward position. The air sampling rate was $2 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$, sampling periods 24 h.

Size-segregated sampling was performed with a 5-stage “Berner” low pressure impactor LPI80/0.1. The size range achieved was 0.1–25 $\mu\text{m AD}$, size cuts 0.1, 0.4, 1.6, 6.5, and 25 μm . The sampling rate was $4.8 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$, collection periods 3–6 d. Substrates were aluminium foils.

3.3. Cellulose determination method

The method of Kunit and Puxbaum (1996) was used for the analysis of cellulose aerosol on the filter and impactor samples. “Total cellulose” was determined on the filters, involving delignification with alkaline peroxide, enzymatic saccharification (hydrolysis) of the cellulose, and enzymatic determination of the formed glucose. For impactor samples the “total cellulose” method was not applicable as aluminium foils would dissolve in the delignification procedure. Instead, “free cellulose” was determined involving the procedures as described before except the delignification step. The

“total cellulose” can be estimated by applying the conversion factor described below. We followed in detail the procedure of Kunit and Puxbaum (1996), and describe below the analytical figures of merit.

3.4. Reagents

Ultrapure water (UP) from MILLI-Q Plus 185. Alkaline 1% H₂O₂ solution: H₂O₂ 30% Merck p.a. is diluted to a 1% solution with UP water, adjusted to pH 11.5 by adding concentrated NaOH dropwise. The NaOH solution was obtained by dissolving a few NaOH pellets, Merck p.a. in the 1% H₂O₂ solution. For each analytical series a fresh solution had to be prepared. Warning: H₂O₂ 30% oxidises skin tissue and is highly dangerous for the eye. Likewise NaOH pellets and concentrated solutions (caustic soda) disintegrate skin tissue and are highly dangerous for the eye.

Citric acid buffer (0.05 M pH 4.8): 210 g citric acid monohydrate (Merck extra pure) was dissolved in 750 ml UP water, NaOH was added to obtain pH 4.3, and filled to 1000 ml (stock solution, 1 M citrate buffer pH 4.5). The buffer was diluted to 0.05 M prior to use, and Thymol (Merck cryst. puriss.) was added to obtain a 0.05% solution for conserving and sterilising the incubate.

D-Glucose test kit was from Boehringer-Mannheim.

Cellulose hydrolysing enzymes: Celluclast 1.5L and Novozym 188 from Novo Nordisk. Celluclast 1.5L is a *Trichoderma reesei* cellulase for technical use (e.g. saccharification of straw). The optimum enzyme activity is reported to be 50–60°C, at pH 4.5–6.0. Novozym 188 is a cellobiase suspension obtained from *Aspergillus niger*. The optimum enzyme activity is at around 50°C, at pH 4.8. Hydrolysis of cellulose with cellulase yields D-glucose and cellobiose. The cellobiase then hydrolyses the cellobiose and increases the total yield of D-glucose in the assay. The producer recommends the following amounts of enzymes relative to cellulose: 1–2% Celluclast 1.5L; 0.2% Novozym 188. The enzyme suspensions are stored frozen as obtained. For analytical use the suspensions are diluted (1:10 for Celluclast 1.5L and 1:100 for Novozym 188).

Note: cellulase and cellobiase enzymes may contain D-glucose from the production process and for stabilisation. Enzymes from several suppliers were tested and those described above exhibited the lowest blank value of D-glucose.

3.5. Analytical method—parameters

3.5.1. Yield of saccharification—enzyme activity

The yield of the saccharification of pure cellulose was determined as % glucose-carbon obtained from a given amount of cellulose-carbon from a standard of pure cellulose with a degree of polymerisation of around 900

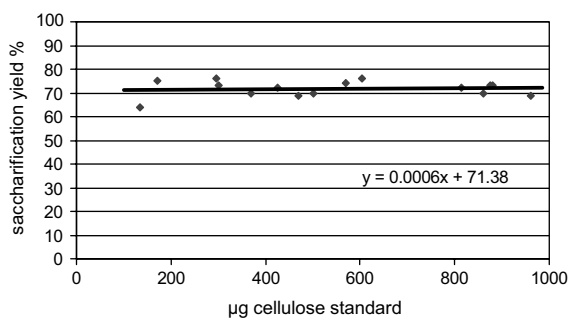


Fig. 1. Saccharification yield of “Cellulose 900” under standard analytical conditions (24 h incubation at 45°C).

(Cellulose 900). From results from a time series (6 samples, amounts of 190, 400, 410, 910, 1900 and 8400 µg for each incubation time interval tested) at the time interval of 24 h for the “standard assay” was derived (Kunit and Puxbaum, 1996). Although the amounts of enzymes in the saccharification assay were considered for up to 1000 µg cellulose, the saccharification yield of the 8400 µg sample was within 1 SD of the average yields (data not shown). For the “standard analytical conditions” the yield of saccharification was determined from 15 samples of 134–960 µg “Cellulose 900” with an average value of 71.7%, standard deviation (SD) 3.2%, respectively, relative standard deviation (RSD) 4.5%. The invariance of the saccharification yield in the tested range of 134–960 µg cellulose is indicative of a constant enzyme activity over the tested working range (Fig. 1). The saccharification yield as an indicator for the enzyme activity was tested before each sample series was analysed. No change of the saccharification yield of the enzymes was observed over the time period of 2 years (enzymes were kept frozen in small portions in vials; fresh dilutions were prepared before each test series).

3.6. Analytical procedure for filter samples

Step 1: Delignification

Glass fibre filters were treated with 5 ml alkaline 1% H₂O₂ solution in a disposable plastic Petri dish for 24 h at room temperature, occasionally slightly moving the dish in circles. Then the supernatant solution was decanted, the filters washed carefully several times with UP water, until the washing water was neutral (to the same pH as the water used for washing). Then the filter in the Petri dish was dried 2 h at 120°C.

Step 2: Saccharification of the cellulose

The filters were folded and placed in 5 ml disposable vials. 3 ml of pH 4.8 0.05 M citric acid buffer with thymol, and 100 µl of each of the enzymes preparations (1:10 for Celluclast 1.5L and 1:100 for Novozym 188) were added. The amount of enzymes is considered with

Table 1
Pipetting scheme for D-glucose determination in assays of filter samples—for details see text

	Reagent blank	Sample	D-Glucose standard
BM solution 1	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Sample from step 2	—	0.5 ml	—
BM glucose standard			0.05 ml
UP water	1.0 ml	0.5 ml	0.95 ml
	Determination of Absorbance 1		
BM solution 2	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml
After 15 min	Determination of Absorbance 2		

regard to the producer's recommendations for a maximum content of cellulose of 1000 µg. The samples were incubated 24 h at 45°C; the hydrolysis was stopped by putting the vials in a boiling water bath for 45 min. After 10 min centrifugation of the supernatant fluid was performed for glucose determination.

Step 3:

The Boehringer-Mannheim (BM) test kit contains two "solutions" and a glucose standard. Solution 1 contains triethanolamin buffer pH 7.6, NADP, ATP and magnesium sulphate; solution 2 contains an enzyme suspension of hexokinase and glucose-6-phosphate-dehydrogenase. The prescribed assay was modified with regard to the volumes of sample and solutions. The pipetting scheme is indicated in Table 1.

Reagent blank, samples, and (D-glucose) standard were prepared according to the pipetting scheme in Table 1 by adding the components to be measured to solution 1 in a disposable 1 cm cuvette; the cuvette was covered with Para film. For each of these assays the absorbance before the reaction (A_1) was determined at 340 nm; starting the series 3 min after the last addition. Then, solution 2 was added, and after 10 min (or later) the developed colour of NADH at 340 nm was determined (A_2). A detailed description of the underlying chemistry is given in Kunit and Puxbaum (1996). Results were derived from the differences between the A_2 and A_1 readings for each measured vial; and correcting the sample values for the reagents blank values. The value for the D-glucose standard was used as a validity check of the calibration function of D-glucose, set up for a working range of 50–1100 µg.

The calculation of "total" cellulose from the result of the D-glucose determination was performed according the following equation:

$$\text{Cellulose}[\mu\text{g}] = \text{D-Glucose}[\mu\text{g}] * \text{GF} * (1/\text{SY}), \quad (2)$$

where GF—glucose/cellulose weight conversion factor: 0.90, SY—saccharification yield: 0.717.

3.7. Detection limit

The glass fibre filters exhibited neither for D-glucose nor for cellulose a discernible signal from the reagent

blank. Thus the reagent blank was the most influential on the detection limit, due to D-glucose content of the saccharification enzymes. Reagent blanks were determined before each test series.

The average D-glucose blanks of three test sets ranged from 50.4–55.3 µg D-glucose, standard deviations for the three series ranged from 0.62–1.51 µg D-glucose per test set (Table 2). Converted to cellulose equivalents, the detection limit obtained for the test sets were 2.32–5.70 µg cellulose/test. From this, for an atmospheric sample of 50 m³, a DL of 0.11 µg m⁻³ cellulose (or 0.05 µg m⁻³ cellulose-carbon) was derived for the two test series with the highest SD.

3.8. Impactor samples

Impactor samples differ from the filter samples, for which the method was originally set up in such a way that sampling substrates were aluminium foils, and sampled air volumes were larger, e.g. 280–580 m³. In impactor samples "free cellulose" was determined. By analysing an aerosol sample without delignification the "free" cellulose content is obtained. A certain part of the cellulose is encapsulated by lignin and thus not directly accessible to the enzymes. The relationship between "free" and "total" cellulose determined for 4 filter samples was 0.72 (SD 0.16). The relationship determined for TSP on filters is an averaged factor, while size-resolved aerosol exhibits probably a size dependence of the "free cellulose", e.g. finer particles may contain a higher fraction of "free cellulose", than larger sizes, which has to be kept in mind when interpreting the size-resolved cellulose results. Therefore, for the impactor samples we report the "free cellulose" value, which is a lower limit estimate for cellulose, up to 28% lower than the "total cellulose" value.

4. Results

4.1. Seasonal variation

Results from a time series of the cellulose and the TSP concentration from filter samples collected at the

Table 2
Results of three blank determination series

	Blank series 1	Blank series 2	Blank series 3
Number of samples	4	6	4
Average $\mu\text{g D-glucose}/3.2 \text{ ml}$	52.0	50.4	55.3
SD	0.62	1.51	1.48
$3 \times \text{SD} \sim \text{DL D-glucose}$	1.85	4.54	4.43
DL $\mu\text{g cellulose}^a$	2.32	5.70	5.56
DL cellulose $\mu\text{g}/\text{m}^3^b$	0.05	0.11	0.11

SD is the standard deviation of the assay (3.2 ml) in μg . The detection limit (DL) is defined as 3SD of the blank. The DL for the D-glucose determination is converted to cellulose equivalent by using Eq. (2); the DL of the cellulose in the atmospheric sample is obtained by assuming a 50 m^3 air sample.

^a D-glucose $\times 0.909/0.717$.

^b Derived for an air sample of 50 m^3 .

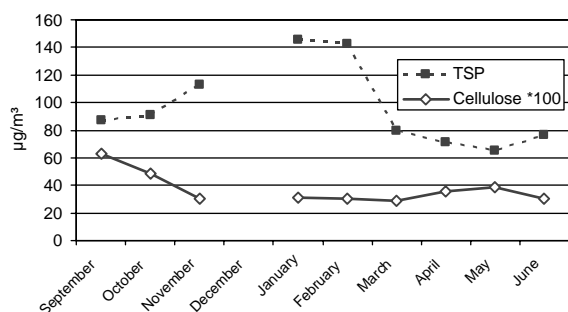


Fig. 2. Atmospheric cellulose and TSP time trends at a Vienna downtown site (September 1993–June 1994).

Institutes site in downtown Vienna is shown in Fig. 2. The monthly averages were formed from approximately seven 24 h filter samples per month in the time from September 1994 to June 1995. The grand average of the monthly data is $0.374 \mu\text{g m}^{-3}$ total cellulose (SD $0.115 \mu\text{g m}^{-3}$). The highest monthly average of the atmospheric cellulose concentration was observed in September ($0.63 \mu\text{g m}^{-3}$), the lowest in winter (January–March, approx. $0.3 \mu\text{g m}^{-3}$). The occurrence of higher values during autumn is consistent with the production of leaf litter during fall. However, the ratio between the highest and lowest monthly average levels was only around 2, indicating an active source during the cold season also. The secondary maximum in spring might originate from seed production and from repulsing of other cellulose containing plant material.

The green leaves of plants (dry mass) contain around 50% cellulose and 50% other biogenic material such as lignin and hemicelluloses. Taking cellulose as “macro-tracer” for debris of green plants, the calculated conversion factor from the cellulose result to “plant debris” is 2. The derived grand average of the monthly

data is $0.75 \mu\text{g m}^{-3}$ “plant debris”. The monthly results range from 0.58 to $1.26 \mu\text{g m}^{-3}$, with the same variation as described for the cellulose.

4.2. Dual site intercomparison

Fine particles of plant debris in a city might be enhanced by automotive traffic milling leaf fragments down to small sized particles. We investigated the “city effect” by simultaneously sampling for 6 days at the city site and a forested site on the northwesterly city border in the “Vienna Forest”. The cellulose in TSP averages ($0.50 \mu\text{g m}^{-3}$, SD $0.247 \mu\text{g m}^{-3}$ at the city site, $0.47 \mu\text{g m}^{-3}$, SD $0.254 \mu\text{g m}^{-3}$ at the urban background site) differed less than 5%, while the mass of total suspended particulates values were higher at the city site by around a factor of 7. Thus, there was no indication that the city might act as a source of atmospheric cellulose at the time of the measurements (December).

4.3. Size distribution measurements

Most questions about the atmospheric properties of particulate cellulose were with regard to the size distribution. As mechanical destruction of materials leads generally to particles in the coarse mode (e.g. $> 2 \mu\text{m AD}$), occurrence of cellulose in the fine particle size fractions ($< 2 \mu\text{m AD}$) was not considered to be of importance. To check the size distribution of cellulose six impactor runs with a Berner impactor were performed at the city site, between 13 October and 30 November 1993. The duration of the runs was 3–6 days each.

The size distributions of cellulose from 6 impactor runs is indicated in Fig. 3. Highest concentrations were observed at the 2nd ($0.4\text{--}1.6 \mu\text{m AD}$) and 3rd ($1.6\text{--}6.5 \mu\text{m AD}$) impactor stages. Concentrations obtained for the size fraction $6.5\text{--}25 \mu\text{m AD}$ might be underestimated to a certain extent due to some particle loss from bounce off effects. However, unexpectedly, a

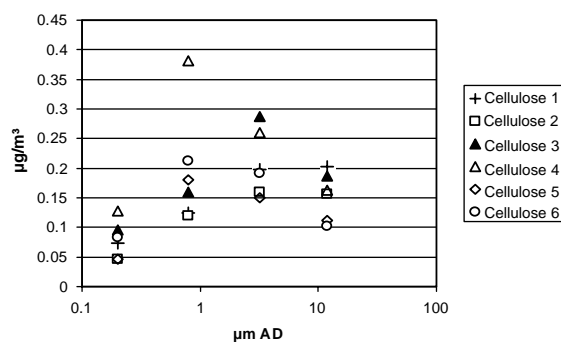


Fig. 3. Size distribution of atmospheric “free cellulose” concentration (Vienna downtown) as determined from 6 impactor runs (October–November 1993).

Table 3

Averaged aerosol mass and cellulose size distribution from 6 impactor runs (October–November 1993) in Vienna downtown (Institute site)

Size range ($\mu\text{m AD}$)	Aerosol mass (SD) ($\mu\text{g m}^{-3}$)	Cellulose (SD) ($\mu\text{g m}^{-3}$)	Cellulose % of particle mass	Plant debris % of particle mass
0.1–0.4	8.7 (1.23)	0.079 (0.031)	0.91	1.8
0.4–1.6	30.3 (13.1)	0.196 (0.097)	0.65	1.35
1.6–6.5	14.0 (4.78)	0.208 (0.055)	1.49	3.0
6.5–25	11.4 (3.53)	0.154 (0.040)	1.35	2.7
Σ	64.4	0.637	0.99	2.0

considerable fraction of the atmospheric cellulose appeared in the small size fractions $<1.6 \mu\text{m AD}$ (Table 3). “Fine aerosol” size particles (0.1–1.6 $\mu\text{m AD}$) contained 0.7% “free cellulose” on a mass basis, forming a wettable, but insoluble part of the accumulation mode aerosol. For the generation of such small bio-particles no explanation is currently available. One might speculate that the large amount of leaf litter forms to a certain extent fine particles during the biological decomposition processes involving micro organisms, and other decomposers.

The average contribution of “free cellulose” to the aerosol in the size range 0.1–25 $\mu\text{m AD}$ was around 1%, which converts to a plant debris contribution of around 2% (Table 3).

4.4. Conclusions

Together with fungal spores forming around 1% of wintry continental background aerosol in Mid-Europe (Bauer et al., 2002), plant debris with a contribution of around 2% to the atmospheric aerosol at present appear to be the only quantified insoluble organic constituents of the continental aerosol. HULIS belong to the extractable compounds of the aerosol (e.g. Zappoli et al., 1999), although a certain fraction of humic material (“humins”) in aerosol might likewise be part of the insoluble fraction (Havers et al., 1998).

Compared to the annual mean of “organic material” (OM) at a downtown site in Vienna of $9.2 \mu\text{g m}^{-3}$ OM (derived from organic carbon $5.74 \mu\text{g m}^{-3}$ and a conversion factor to OM of 1.6; measured June 1999–May 2000 in Vienna, site Central Hospital; unpublished data), the annual average for plant debris of $0.75 \mu\text{g m}^{-3}$ would form 8.1% of the OM, or around 16% of the insoluble organic material, when assuming an insoluble OM fraction of 50%. The tentatively derived relative fraction of plant debris forming 16% of the insoluble organic material indicates that plant debris is a major

contributor to the organic aerosol and has to be considered in source attribution studies.

For aerosol source receptor models a source of vegetative detritus is considered, based on the higher molecular weight alkanes C27–C33 as marker compounds (Rogge et al., 1993b). It would be of interest to examine whether cellulose might be of equal use as a marker for vegetative detritus. Or, it might well be that cellulose represents further sources of vegetative material in the atmosphere (e.g. from destruction processes involving microbes, beetles, etc.).

Acknowledgements

We acknowledge the discussions with Ch. Kubicek and K. Messner concerning the enzymatic method, Novo Nordisk for free samples of the enzyme-solutions Celluclast 1.5L and Novozym 188.

References

- Bauer, H., Kasper-Giebl, A., Löflund, M., Giebl, H., Hitzemberger, R., Zibuschka, F., Puxbaum, H., 2002. The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. *Atmospheric Research* 64, 109–119.
- Brimblecombe, P., 1986. *Air Composition and Chemistry*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Butler, G.W., Bailey, R.W., 1973. *Chemistry and Biochemistry of Herbage*, Vol. I. Academic Press, New York.
- Denffer, D., 1978. *Lehrbuch der Botanik*, 31. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Frankfurt/Main.
- Facchini, M.C., Fuzzi, S., Zappoli, S., Andracchio, A., Gelencser, A., Kiss, G., Krivacsy, Z., Meszaros, E., Hansson, H.-C., Alsberg, T., Zebuhr, Y., 1999. Partitioning of the organic aerosol component between fog droplets and interstitial air. *Journal of Geophysical Research* 104, 26821–26832.
- Gelencser, A., Hoffer, A., Kiss, G., Tombacs, E., Kurdi, R., Bencze, L., 2003. In-situ formation of light-absorbing organic matter in cloud water. *Journal of Atmospheric Chemistry* 45, 25–33.
- Havers, N., Burba, P., Lambert, J., Klockow, D., 1998. Spectroscopic characterisation of humic-like substances in airborne particulate matter. *Journal of Atmospheric Chemistry* 29, 45–54.
- Kirk, K., Obst, J.R., 1988. Lignin determination. *Methods in Enzymology* 161, 87–136.
- Kunit, M., Puxbaum, H., 1996. Enzymatic determination of the cellulose content of atmospheric aerosols. *Atmospheric Environment* 30, 1233–1236.
- Kürschner, K., 1966. *Chemie des Holzes*. Akademie Verlag, Berlin.
- Matthias-Maser, S., Jaenicke, R., 1995. The size distribution of primary biological aerosol particles with radii $>0.2 \mu\text{m}$ in an urban/rural influenced region. *Atmospheric Research* 39, 279–286.

- Rogge, W.F., Mazurek, M.A., Hildemann, L.M., Cass, G.R., Simoneit, B.R.T., 1993a. Quantification of urban aerosols at a molecular level: identification, abundance and seasonal variation. *Atmospheric Environment* 27A, 1309–1330.
- Rogge, W.F., Hildemann, L.M., Mazurek, M.A., Cass, G.R., Simoneit, B.R.T., 1993b. Sources of fine organic aerosol, 4. Particulate abrasion products from leaf surfaces of plants. *Environmental Science and Technology* 27, 2700–2711.
- Stanley, R.G., Linsken, H.F., 1985. *Pollen*. URS Freund Verlag. Greifenberg-Ammersee, Deutschland.
- Wood, T.M., Saddler, J.N., 1988. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. *Methods in Enzymology* 160, 11–30.
- Zappoli, S., Andracchio, A., Fuzzi, S., Facchini, M.C., Gelencser, A., Kiss, G., Krivacsy, Z., Molnar, A., Meszaros, E., Hansson, H.-C., Rosman, K., Zebühr, Y., 1999. Inorganic, organic and macromolecular components of fine aerosol in different areas of Europe in relation to their water solubility. *Atmospheric Environment* 33, 2733–2743.