CARMEN SILVIA KIRA

**Determinação de valores de referência para chumbo, cádmio,
mercúrio e níquel em sangue de crianças e adultos da cidade de
São Paulo**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de:
Medicina Preventiva

Orientador:
Prof. Dr. Nelson da Cruz Gouveia

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Kira, Carmen Silvia

Determinação de valores de referência para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel em sangue de adultos e crianças da cidade de São Paulo / Carmen Silvia Kira. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Medicina Preventiva.

Orientador: Nelson da Cruz Gouveia.

Descritores: 1.Valores de referência 2.Chumbo 3.Cádmio 4.Mercúrio
5.Níquel 6.Sangue 7.Monitoramento biológico 8.Adulto 9.Criança

USP/FM/DBD-181/14

Dedicatória

Dedico esta tese à minha família, por todo apoio e compreensão.

Em especial à minha mãe (in memoriam), exemplo de força e
perseverança

Agradecimentos

À Deus, em primeiro lugar por me dar força para continuar, mesmo nos momentos mais difíceis durante essa fase da vida.

À minha família, em especial à minha irmã Anna, pelo apoio incondicional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nelson da Cruz Gouveia, primeiramente por me aceitar como sua aluna, e também pela orientação tranquila e paciência durante esses anos de convivência.

Ao Instituto Adolfo Lutz por me permitir realizar esse trabalho.

À Alice Sakuma pelas inestimáveis sugestões que foram muito pertinentes e disposição em ajudar na realização e conclusão deste estudo.

À Franca Durante de Maio pelas sugestões dadas com relação à redação do trabalho.

Ao Rogério Ruscitto do Prado, pelas análises estatísticas.

À Suely da biblioteca por me ajudar a configurar a tese e com as referências bibliográficas.

À Valéria da biblioteca, que prontamente fez a ficha catalográfica deste trabalho.

A todos que de uma forma ou de outra torceram pelo meu sucesso.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas
Lista de Quadros
Lista de Figuras
Lista de Tabelas
Resumo
Abstract

APRESENTAÇÃO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Estabelecimento de valores de referência no Brasil e em outros países ..	4
1.1.1 Estabelecimento de valores de referência no Brasil	4
1.1.2 Estabelecimento de valores de referência em outros países.....	7
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4 REVISÃO DE LITERATURA	22
4.1 Antecedentes	22
4.2 Toxicologia dos metais	43
4.2.1 Toxicologia do chumbo	43
4.2.2 Toxicologia do cádmio	51
4.2.3 Toxicologia do mercúrio	57
4.2.4 Toxicologia do níquel	65
5 MÉTODOS	71
5.1 Período e desenho do estudo	71
5.2 Tamanho de amostra e população de estudo	71
5.3 Trabalho de campo	72
5.4 Critérios de inclusão e exclusão.....	74
5.4.1 Questionários utilizados.....	75
5.5 Plano de amostragem	76
5.6 Aspectos éticos	79
5.7 Método analítico	79
5.7.1 Princípio da técnica analítica espectrometria de massa com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-MS).....	80
5.7.1.1 Interferências em ICP-MS	83

5.7.2 Análise de metais em sangue.....	86
5.8 Tratamento dos dados	88
5.9 Análise Estatística	88
5.9.1 Teste de normalidade	88
5.9.2 Análise univariada	89
5.9.3 Análise multivariada	89
5.10 Estabelecimento dos valores de referência para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel em sangue	91
 6 RESULTADOS	 93
6.1 População estudada	93
6.2 Resultados de chumbo, cádmio, mercúrio e níquel em sangue	95
6.3 Valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue	107
 7 DISCUSSÃO	 124
7.1 Valores de referência propostos para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel em sangue	124
7.1.1 Chumbo	131
7.1.2 Cádmio	141
7.1.3 Mercúrio	147
7.1.4 Níquel	152
7.2 Considerações Finais	155
 8 CONCLUSÕES	 160
 9 ANEXOS	 161
 10 REFERÊNCIAS	 176

Lista de Abreviaturas

ALA – Enzima ácido δ -aminolevulínico sintetase

ALAD – Enzima ácido δ -aminolevulínico desidratase

Ar – Argônio

As – Arsênio

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry

CC – Cella de colisão

Cd – Cádmio

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

Cetesb – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CGVAM – Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental

CHMS – Canadian Health Measures Survey

Cl – Cloro

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Co – Cobalto

Cu – Cobre

CV – Coeficiente de variação

CZ-HBM – Projeto de biomonitorização humana da República Tcheca

DRC – Cella de reação dinâmica

EPA – Environmental Protection Agency

EUA – Estados Unidos

EURO TERVIHT – Trace Element Reference Values in Human Tissues

eV – Elétron volt

Ge – Germânio

GerES – German Environmental Survey

HBM – Human Biological Monitoring – valores de biomonitorização humana estabelecidos pela Alemanha

HBM I – Valor estabelecido pela Alemanha, abaixo do qual não há risco de efeitos adversos à saúde

HBM II - Valor estabelecido pela Alemanha, acima do qual há um aumento do risco de efeitos adversos à saúde

Hg – Mercúrio

HgS – Sulfeto de mercúrio, minério cinábrio

IARC – International Agency for Research on Cancer

IC – Intervalo de confiança

ICP-MS – Espectrometria de massa com plasma de argônio acoplado indutivamente

IESC – Instituto de Estudos de Saúde Coletiva

IFCC – International Federation of Clinical Chemistry

In – Índio

ISO – International Organization for Standardization

K – Kelvin

KNHANES – Korean National Health and Nutrition Examination Survey

kPa – Quilopascal, unidade de pressão

L.min⁻¹ – Litro por minute

m/z – Relação massa/carga

MA – Média aritmética

MG – Média geométrica

mg/kg – Miligrama por kilograma

MHz – Mega hertz

MLG – Modelo linear generalizado

Mn – Manganês

NHANES – National Health and Nutrition Examination Survey, estudo populacional dos EUA

Ni – Níquel

NTP – Programa nacional de toxicologia americano

P10 – Percentil 10

P5 – Percentil 5

P50 – Percentil 50

P90 – Percentil 90

P95 – Percentil 95

Pb – Chumbo

pH – Potencial de hidrogênio

PROBE – Program for Biomonitoring of the Exposure

Pt – Platina

Re – Rênio

RMSP – Região metropolitana da cidade de São Paulo

Sb – Antimônio

Sc – Escândio

Se – Selênio

SIVR – Società Italiana per I Valori di Riferimento

Sn – Estanho

Tl – Tálho

U – Urânio

u.m.a – Unidade de massa atômica

UBA – Umwelt Bundes Amt, agência ambiental federal da Alemanha

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

UPA – Unidade Primária de Amostragem

μg – Micrograma

$\mu\text{g.L}^{-1}$ – Micrograma por litro

$\mu\text{g/dL}$ – Micrograma por decilitro

VR – Valor de referência

W – Watt

WHO – World Health Organization

Lista de quadros

Quadro 1 - Variáveis independentes que apresentaram associação significativa com as concentrações de níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue, na análise univariada (teste de Mann-Whitney ou teste de Kruskal-Wallis).....	98
---	----

Lista de Figuras

Figura 1 -	Relações entre os termos relacionados a “valores de referência” de acordo com a IFCC.....	27
Figura 2 -	Gráfico dos quantis da distribuição normal versus concentrações de níquel (a), cádmio (b), chumbo (c) e mercúrio (d) no sangue da população estudada.....	96
Figura 3 -	Gráfico dos resíduos deviance padronizado gerado para verificar o ajuste do modelo multivariado para níquel em sangue.....	104
Figura 4 -	Gráfico dos resíduos deviance padronizado gerado para verificar o ajuste do modelo multivariado para cádmio em sangue.....	104
Figura 5 -	Gráfico dos resíduos deviance padronizado gerado para verificar o ajuste do modelo multivariado para chumbo em sangue.....	105
Figura 6 -	Gráfico dos resíduos deviance padronizado gerado para verificar o ajuste do modelo multivariado para mercúrio em sangue.....	105

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	População estudada, segundo faixa etária, nível de escolaridade, renda familiar e ramo de atividade, por gênero...	94
Tabela 2 -	Resultado do ajuste do modelo linear generalizado entre as variáveis explicativas e a concentração de níquel no sangue...	100
Tabela 3 -	Resultado do ajuste do modelo linear generalizado entre as variáveis explicativas e a concentração de cádmio em sangue.	101
Tabela 4 -	Resultado do ajuste do modelo linear generalizado entre as variáveis explicativas e a concentração de chumbo em sangue.....	102
Tabela 5 -	Resultado do ajuste do modelo linear generalizado entre as variáveis explicativas e a concentração de mercúrio em sangue.....	103
Tabela 6 -	Resultado do teste de correlação de Spearman para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue.....	107
Tabela 7 -	Percentis, médias e valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total, derivados segundo o gênero (em µg/L).....	109
Tabela 8 -	Percentis, médias e valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total, derivados segundo a faixa etária (em µg/L).....	110
Tabela 9 -	Percentis, médias e valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total, derivados segundo o hábito de fumar (em µg/L).....	111
Tabela 10 -	Percentis, médias e valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total, derivados segundo o consumo de peixes (em µg/L).....	112
Tabela 11 -	Percentis e médias obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com o consumo de vísceras e miúdos (em µg/L).....	113

Tabela 12 -	Percentis e médias obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com o consumo de frutos do mar (em µg/L)..	114
Tabela 13 -	Percentis e médias obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com o consumo de carne (em µg/L).....	115
Tabela 14 -	Percentis e médias obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com o consumo de frango (em µg/L).....	116
Tabela 15 -	Percentis e médias obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com o consumo de bebida alcoólica destilada (em µg/L).....	117
Tabela 16 -	Percentis e médias obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com o consumo de vinho (em µg/L).....	118
Tabela 17 -	Percentis e médias obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com o consumo de cerveja (em µg/L).....	119
Tabela 18 -	Percentis, médias e valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue, derivados segundo gênero e faixa etária (em µg/L).....	120
Tabela 19 -	Concentrações mínima e máxima obtidas para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel em sangue da população do município de São Paulo e número de amostras com concentração abaixo do limite de quantificação do método.....	121
Tabela 20 -	Distribuição da população de acordo com a faixa etária e o gênero em relação aos valores de referência para chumbo em sangue propostos neste estudo.....	122
Tabela 21 -	Distribuição da população de acordo com a faixa etária e o gênero em relação aos valores de referência para cádmio em sangue propostos neste estudo.....	122

Tabela 22 -	Distribuição da população de acordo com a faixa etária e o gênero em relação aos valores de referência para mercúrio em sangue propostos neste estudo.....	123
Tabela 23 -	Distribuição da população de acordo com a faixa etária e o gênero em relação aos valores de referência para níquel em sangue propostos neste estudo.....	123
Tabela 24 -	Valores de referência/Intervalos de referência propostos para chumbo em sangue em diversas populações.....	124
Tabela 25 -	Concentrações de chumbo em sangue de adultos obtidas de estudos de biomonitorização (em µg/L).....	125
Tabela 26 -	Concentrações de chumbo em sangue de crianças e adolescentes obtidas de estudos de biomonitorização (em µg/L).....	125
Tabela 27 -	Valores de referência/Intervalos de referência propostos para cádmio em sangue em diversas populações.....	126
Tabela 28 -	Concentrações de cádmio em sangue de adultos, crianças e adolescentes obtidas de estudos de biomonitorização (em µg/L).....	126
Tabela 29 -	Valores de referência propostos para mercúrio em sangue em diversas populações.....	127
Tabela 30 -	Concentrações de mercúrio em sangue de adultos, crianças e adolescentes obtidas de estudos de biomonitorização (em µg/L).....	127
Tabela 31 -	Concentrações de níquel em sangue de adultos e crianças obtidas de estudos de biomonitorização (em µg/L).....	128

RESUMO

Kira, CS. Determinação de valores de referência para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel em sangue de crianças e adultos da cidade de São Paulo [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2014.

O aumento da emissão de poluentes no meio ambiente tem gerado preocupação com a exposição humana a esses contaminantes, refletindo-se no aumento significativo de pesquisas envolvendo biomonitorizações. De modo geral, o método mais apropriado para interpretar resultados de biomonitorização é descrever tendências ou distribuições dos valores observados na população, e compará-los com uma população de referência, utilizando os valores de referência (VR). Porém, muitos países, incluindo o Brasil, ainda não têm disponíveis valores de referência de base populacional. Dessa forma, para a interpretação dos resultados obtidos em estudos de biomonitorização no Brasil, comumente são utilizados valores preconizados na literatura internacional, que não refletem a realidade da nossa população dificultando o diagnóstico e a solução do problema. O objetivo deste estudo foi derivar valores de referência para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel em sangue de crianças e adultos saudáveis, sem exposição ocupacional a esses metais, residentes no município de São Paulo. Amostras de sangue de 786 adultos (14 a 70 anos) e 538 crianças (6 a 13 anos) foram coletadas entre 2007 e 2008. Questionários foram aplicados para se obter informação a respeito de variáveis que poderiam influenciar os níveis dos metais estudados no sangue. Os valores de referência foram estabelecidos considerando o limite superior do intervalo de confiança a 95% para o percentil 95 da distribuição dos dados obtidos para cada metal. Os VR derivados por faixa etária e gênero para chumbo foram: 32,6 e 42,3 µg/L para o grupo masculino abaixo de 11 anos e acima de 20 anos, respectivamente; no grupo feminino nas mesmas faixas etárias os VR derivados foram 26,2 e 31,1 µg/L. Para cádmio os VR foram de 0,42 e 0,62 µg/L para homens e para mulheres os VR foram 0,19 e 0,56 µg/L, para a mesma faixa etária mencionada. No caso do mercúrio para o grupo masculino os VR foram 1,5 e 3,1 µg/L e para o grupo feminino os VR foram 1,6 e 3,2 µg/L, respectivamente para as faixas etárias mencionadas e, para níquel os VR para homens foram de 3,60 e 3,63 µg/L e para mulheres foram de 3,64 e 3,50 µg/L, respectivamente para as faixas etárias mencionadas. Gênero, idade e hábito de fumar foram as variáveis que apresentaram associação significativa com as concentrações de chumbo e cádmio em sangue. Além dessas, consumo de vísceras e miúdos e área de moradia mostraram estar associados com os níveis de chumbo em sangue e, consumo de destilados para os níveis de cádmio em sangue. Para mercúrio, idade, consumo de peixes e vísceras e miúdos foram os fatores que apresentaram associação significativa com os níveis do metal no sangue. Para níquel em sangue os fatores determinantes foram idade, consumo de peixe, vísceras e miúdos e frango. Os valores de referência obtidos neste estudo poderão subsidiar os diagnósticos de exposição ambiental ao chumbo, cádmio, mercúrio e níquel.

Descritores: Valores de referência; Chumbo; Cádmio; Mercúrio; Níquel; Sangue; Monitoramento biológico; Adulto; Criança.

ABSTRACT

Kira, CS. Determination of reference values for lead, cadmium, mercury and nickel in the blood of children and adults in the city of São Paulo [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2014

The increase in the emission of pollutants in the environment has raised concern with human exposure to these contaminants, reflected in the significant increase of research involving biomonitoring. In general, the most appropriate method for interpreting biomonitoring results is to describe trends or distributions of observed values in the population, and compare them with a reference population using reference values (RV). However, many countries, including Brazil, still do not have population-based reference values available. Thus, for the interpretation of results obtained in biomonitoring studies in Brazil, values commonly encountered in the international literature are used, which do not reflect the reality of our country's population, making difficult to diagnose and fix the problem. The aim of this study was to derive reference values for lead, cadmium, mercury and nickel in blood of healthy children and adults without occupational exposure to these metals residing in the city of São Paulo. Blood samples from 786 adults (14-70 years old) and 538 children (6-13 years old) were collected between 2007 and 2008. Questionnaires were applied to obtain information regarding variables that could influence the levels of the studied metals in blood. Reference values were established considering the upper limit of the 95% confidence interval for the 95th percentile of the distribution of data for each metal. The RV derived by age and gender for lead were: 32.6 and 42.3 µg/L for males below 11 years old and above 20 years old respectively; for females in the same age groups RV were 26.2 and 31.1 µg/L. For cadmium the RV were 0.42 and 0.62 µg/L for men and for women were 0.19 and 0.56 µg/L for the same age groups mentioned. In the case of mercury for the males the RV were 1.5 and 3.1 µg/L and for females were 1.6 and 3.2 µg/L, respectively for the mentioned age groups and for nickel RV for men were 3.60 and 3.63 µg/L and for women were 3.64 and 3.50 µg/L, respectively for the mentioned age groups. Gender, age and smoking were the variables significantly associated with the concentrations of lead and cadmium in blood. Besides these, consumption of viscera and offal and area of residence were associated with levels of lead in blood, and consumption of spirits with levels of cadmium in blood. For mercury, age, consumption of fish, viscera and offal were the factors significantly associated with levels of that metal in the blood. Determinants of nickel in blood were age, consumption of fish, chicken and viscera and offal. The reference values obtained in this study may support the diagnosis of environmental exposure to lead, cadmium, mercury and nickel.

Descriptors: Reference values; Lead; Cadmium; Mercury; Nickel; Blood; Biological monitoring; Adult; Child.

APRESENTAÇÃO

A proposta desta tese foi baseada no projeto FAPESP multiusuário “Projeto para aquisição de espectrômetro com plasma de argônio indutivamente acoplado para avaliação de exposição humana a metais e formação de recursos humanos”, processo nº 2004/08852-7, aprovado em 01/04/2005.

O projeto FAPESP tinha como principais objetivos avaliar os níveis de metais em amostras de sangue e urina de uma população não exposta a excesso de contaminantes metálicos residente no município de São Paulo, além de modernizar a infraestrutura do laboratório de saúde pública para atender às demandas de avaliação da exposição de trabalhadores a esses metais, e avaliação da qualidade da água de hemodiálise e de consumo humano. O conhecimento dos níveis desses elementos químicos no organismo daria suporte a investigações de possíveis efeitos ainda não bem esclarecidos em exposições rotineiras, e orientar medidas de controle ambiental quanto a possível contaminação em grau aumentado, em relação ao usual.

O projeto contou com a participação de várias instituições de saúde, pesquisa e ensino: Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

(UNICAMP), Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP).

O projeto se enquadra dentro da missão do Instituto Adolfo Lutz que é desenvolver pesquisas e ações conjuntas com as vigilâncias sanitária e epidemiológica em prol da saúde pública. Uma das atividades é a avaliação da exposição humana a contaminantes presentes no ambiente. Para a interpretação dos resultados obtidos em estudos de biomonitorização é importante conhecer o valor de referência para o contaminante analisado. No Brasil usamos os valores preconizados na literatura internacional, que não reflete a realidade da população do país, o que muitas vezes dificulta o diagnóstico e a solução do problema.

A oportunidade do Instituto Adolfo Lutz de realizar um trabalho conjunto com a UNICAMP, o Centro de Vigilância Epidemiológica e a Faculdade de Saúde Pública da USP e a chamada pública para o equipamento multiusuário favoreceu o desenvolvimento desse projeto.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico ocorrido nos últimos anos tem causado impacto no meio ambiente ocasionando um aumento na emissão de contaminantes, devido ao aumento na produção de compostos químicos e também de novos produtos e seus subprodutos. Outro fator que contribuiu foi a intensificação na exploração de recursos naturais e o aumento da industrialização, que resultaram na liberação de resíduos para o ambiente. Como consequência, a poluição ambiental e as preocupações relacionadas à saúde humana têm alcançado um nível crítico em várias áreas do mundo. Muitas substâncias têm efeitos tóxicos à saúde e ao ambiente, e a exposição humana a essas substâncias pode ocorrer durante os processos de produção, armazenamento, manuseio, transporte, uso e disposição, bem como por derramamentos acidentais (Conti, 2008).

Nesse sentido, programas voltados à biomonitorização, controle e prevenção da exposição populacional a substâncias perigosas estão sendo realizados em muitos países. Isto tem ocorrido porque está se tornando imprescindível conhecer os níveis de contaminação próximos a áreas de despejo perigoso, fontes de emissão industriais e outras fontes, a fim de efetivar esforços

para a promoção da saúde, como também para validar políticas de saúde pública para a redução da exposição ambiental à qual a população está sujeita.

A partir de dados de avaliação ambiental resultantes das análises de contaminantes em solo, ar e água, pode-se proceder à biomonitorização para determinação das substâncias químicas ou de seus metabólitos em fluidos biológicos ou tecidos, a fim de obter evidências da exposição humana a esses compostos (National Research Council, 2006; Clewell et al., 2008). A interpretação dos resultados obtidos nesses estudos é fundamental para o estabelecimento de ações de remediação ou definição de políticas ambientais ou de saúde pública para a redução da contaminação ou exposição.

De modo geral, o método mais apropriado para interpretar resultados de biomonitorização é descrever tendências ou distribuições dos valores observados numa população, e compará-los com uma população de referência, utilizando os “valores de referência”. Porém, muitos países, incluindo o Brasil, ainda não têm disponíveis valores de referência de base populacional. Muitos grupos de pesquisa geralmente comparam os resultados obtidos na população em estudo com grupos controle para realizar a interpretação dos dados (Paoliello et al., 2002; Mayan et al., 2006; Freitas et al., 2007; Hogervorst et al., 2007; Coelho et al., 2013; Madeddu et al., 2013).

Quando a interpretação de resultados de exposição é feita com grupos controle, devem ser tomados cuidados para se conseguir uma referência adequada. Estes cuidados referem-se às características do grupo controle, como

idade, gênero, condição de saúde, estilo de vida, e ocupação, que devem ser similares às do grupo exposto, com exceção do fator de exposição.

Apesar de válidos, valores derivados de grupo “controle” não são necessariamente obtidos por meio de metodologia e definição de número amostral, como os valores de referência.

Pelo exposto acima, pode-se afirmar que a interpretação de achados epidemiológicos em áreas contaminadas, seria conduzida de forma mais adequada com o conhecimento de valores de referência da população (Poulsen et al., 1994; Hamilton et al., 1994; Pivetta et al., 2001; Paoliello et al., 2001a, 2002; Alimonti et al., 2005).

Na indisponibilidade de definição de valores de referência nacionais ou regionais, muitos grupos de pesquisa têm também realizado a avaliação da exposição comparando os resultados obtidos com valores de referência estabelecidos em outros países (Gil et al., 2006; Bazzi et al., 2008; Moreno et al., 2010; Ikeda et al., 2011; Lin; Wu, 2011). Dessa forma, a interpretação de resultados de biomonitorização pode levar a conclusões errôneas, seja pelo resultado final de contaminação positiva, como para a falsa definição de ausência de problema. Mesmo nos casos de definição de exposição excessiva por meio da comparação com valores de referência de outros países, a magnitude do problema pode ser subestimada ou superestimada. Isso porque a exposição às substâncias ou contaminantes varia entre as diferentes regiões geográficas, além da influência das condições socioeconômicas e hábitos alimentares (Poulsen et al., 1994).

A necessidade da definição de valores de referência torna-se fundamental, uma vez que os resultados obtidos na mensuração de determinados contaminantes numa população podem ser comparados a esses valores, permitindo uma interpretação mais consistente dos dados de biomonitorização.

O panorama sobre o estabelecimento de valores de referência no Brasil e também em outros países é apresentado a seguir.

1.1 Estabelecimento de valores de referência no Brasil e em outros países

1.1.1 Estabelecimento de valores de referência no Brasil

No Brasil não são realizados inquéritos populacionais em grande escala, onde os dados produzidos poderiam ser utilizados para o estabelecimento de valores de referência, como em outros países. Porém, merece destaque o estudo piloto, realizado no final de 2007 e início de 2008, para avaliar a exposição humana a substâncias químicas, o Projeto Piloto do I Inquérito Nacional de Populações Expostas a Substâncias Químicas. Este projeto foi elaborado pelo Ministério da Saúde, por meio da Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental (CGVAM). O Inquérito Nacional tinha como objetivo determinar o nível de exposição humana a substâncias químicas de interesse à saúde pública e a identificação de subgrupos com exposição aumentada. Até o presente momento somente foi realizado o projeto piloto com o objetivo de examinar a possibilidade de execução desse grande inquérito nacional, sendo constituído por três

subprojetos: “doadores de sangue”, “crianças escolares” e “conscritos das forças armadas” (IESC/UFRJ, 2011).

No subprojeto “doadores de sangue” foi avaliada a exposição da população a substâncias químicas, como Hg, As, Cd, Co, Cu, Mn, Pb, Se, Tl, U, Pt e Sb determinados no sangue total e cabelo, além de resíduos de organoclorados em soro sanguíneo. A população do estudo foi constituída por doadores de sangue, com idade entre 18 e 65 anos, residentes na Região Metropolitana de São Paulo. O estudo envolveu a coleta de 373 amostras de sangue total, 360 amostras de cabelo e 542 amostras de soro de doadores de sangue.

No caso do subprojeto “crianças escolares” o estudo envolveu a biomonitorização de 270 crianças, com idades entre 8 e 10 anos, matriculadas em duas escolas da rede municipal de ensino do município do Rio de Janeiro para avaliação da concentração de metais, os mesmos do subprojeto “doadores de sangue” porém utilizando amostras de sangue capilar e unha.

O subprojeto “conscritos das forças armadas” teve o objetivo de avaliar a exposição de conscritos do exército brasileiro, residentes no município do Rio de Janeiro, aos mesmos metais e organoclorados do subprojeto “doadores de sangue”. Este estudo envolveu a participação de jovens do gênero masculino, que se apresentaram às comissões de seleção do exército brasileiro no município do Rio de Janeiro. Neste estudo foram coletadas 512 amostras de sangue, 322 amostras de cabelo e 306 amostras de soro sanguíneo.

Embora o Brasil não tenha definido valores de referência de base populacional, alguns estudos particulares tentaram estabelecer valores de referência regionais para metais.

Valor de referência para chumbo em sangue foi estabelecido para adultos residentes na cidade de Londrina, Paraná, com amostras coletadas entre 1994 e 1996. Na época do estudo o chumbo já tinha sido eliminado da gasolina há pelo menos dez anos, dessa forma essa fonte de contaminação havia sido extinta. A cidade de Londrina apresentava baixo nível de industrialização, possuindo como possíveis fontes de exposição ao chumbo duas fábricas de baterias de médio porte e várias retificadoras. O estudo envolveu 538 adultos selecionados de forma não aleatória. Os critérios de exclusão aplicados foram: exposição ocupacional ao chumbo, fumar mais de dez cigarros por dia e morar perto de indústrias ou locais que utilizavam o chumbo em seus processos produtivos. O método de seleção da população de referência escolhida foi “a posteriori” a partir da população geral, isto é, somente após as análises realizadas é que seriam decididos quais indivíduos fariam parte da população de referência, para então proceder à análise estatística. O valor de referência foi definido como sendo o valor médio mais ou menos dois desvios padrão (Paoliello et al., 2001a).

Um trabalho mais recente estabeleceu valores de referência para chumbo, cádmio e mercúrio em sangue de doadores de sangue da região metropolitana do município de São Paulo. A derivação foi feita com 653 adultos não fumantes, com idades entre 18 e 65 anos, e as amostras foram coletadas em 2006. Os valores de referência foram derivados a partir dos valores arredondados do limite superior do

intervalo de confiança a 95% do percentil 95. Foram incluídos no estudo os doadores de sangue que residiam na região metropolitana de São Paulo há pelo menos um mês, não fumantes, e sem exposição ocupacional aos metais estudados (Kuno et al., 2013).

Na literatura pesquisada observou-se escassez de trabalhos nacionais envolvendo a derivação de valores de referência. Em contrapartida, em outros países, estudos de biomonitorização de base populacional em número muito maior do que os existentes no Brasil, tem proporcionado o estabelecimento de valores de referência.

Programas nacionais de biomonitorização com amostragens representativas são importantes para descrever a distribuição das exposições, estabelecer banco de dados para derivar valores de referência, estabelecer tendências nos níveis de exposição populacional no tempo, ajustar prioridades para pesquisa sobre efeitos à saúde humana, avaliar a efetividade de esforços para redução da exposição, entre outros (Becker et al., 2002). Esses programas devem ser contínuos, pois os valores de referência devem ser atualizados com frequência devido à variação na exposição ambiental.

1.1.2 Estabelecimento de valores de referência em outros países

A seguir são apresentados os principais programas de biomonitorização, em âmbito nacional, realizados em outros países para o estabelecimento de valores de referência representativos da população.

- Programa de biomonitorização da República Tcheca

Em 1994 a República Tcheca lançou o projeto de biomonitorização humana (CZ-HBM) para avaliar a exposição a vários contaminantes ambientais (metais e agrotóxicos) na população geral (Cerná et al., 2007). Até o presente momento o projeto cobriu períodos entre 1996 e 2009. O programa de biomonitorização envolveu a participação dos seguintes grupos: adultos (doadores de sangue com idade entre 18 e 58 anos) e crianças com idades entre 8 e 10 anos. Questionário foi aplicado para obter informação sobre a idade, peso, altura, moradia, medicação, e estilos de vida. Dentre os vários objetivos do projeto destaca-se o estabelecimento de valores de referência para a população geral do país (Cerná et al., 2012). O valor do percentil 95 foi utilizado para estabelecer os valores de referência (Batariová et al., 2006). Valores de referência para chumbo e cádmio em sangue foram derivados, pela primeira vez, para o período de 1996 a 1998, e mais recentemente foram atualizados para o período de 2005 a 2009. Para mercúrio em sangue, valores de referência foram estabelecidos para o período de 2001 a 2003, e foram atualizados para o período de 2005 a 2009 (Cerná et al., 2012).

- Programa de biomonitorização da Alemanha

A Alemanha é outro país que tem realizado estudos populacionais em grande escala, onde são obtidos dados representativos do país com relação à

exposição humana a contaminantes ambientais, como metais e poluentes orgânicos. O estudo de biomonitorização populacional conhecido como German Environmental Surveys (GerES) conduzido pela agência federal ambiental da Alemanha vêm ocorrendo desde a metade dos anos 80 e tem envolvido um grande número de participantes, que são entrevistados, e seus materiais biológicos como sangue, urina ou cabelos analisados. As amostras do GerES são representativas da população da Alemanha com relação à região (parte oriental ou ocidental), tamanho da comunidade, idade e gênero. Questionários são aplicados para se obter informação relacionada às condições de exposição, alimentação e condições de moradia (Becker et al., 2007). O GerES I foi realizado entre 1985 e 1986, e esteve voltado ao monitoramento de 2731 adultos, com idades entre 25 e 69 anos, da Alemanha Ocidental. O GerES IIa também realizado na Alemanha Ocidental, entre 1990 e 1991, avaliou 2524 adultos com a mesma faixa de idade dos participantes do GerES I; enquanto o GerES IIb realizado entre 1991 e 1992, avaliou 1763 adultos com idades entre 18 e 79 anos na Alemanha Oriental, e também 359 crianças e adolescentes com idades entre 6 e 17 anos e 238 crianças de 6 a 14 anos. O GerES III foi realizado em 1998 e foi conduzido na Alemanha reunificada, com o monitoramento de 4822 adultos com idades entre 18 e 69 anos. O GerES IV conduzido em cooperação com o National Health Survey for Children and Adolescents (KiGGS) foi realizado entre 2003 e 2006 e esteve focado nas crianças entre 3 e 14 anos (1800 participantes). O GerES V está previsto para ocorrer entre 2014 e 2017 com foco nas crianças e adolescentes entre 3 e 17

anos. Segundo a agência ambiental da Alemanha, UBA, será realizado ainda um pré-teste para o GerES V (UBA, 2013).

Os relatórios desses estudos populacionais trazem uma breve descrição das substâncias medidas e são apresentadas tabelas com parâmetros estatísticos da distribuição dos contaminantes analisados com médias (aritmética e geométrica), percentis, além do intervalo de confiança para a média geométrica. Percentis da faixa de medida superior foram utilizados para derivar os valores de referência (Angerer et al., 2011). O GerES é o estudo mais importante usado pela comissão alemã de biomonitoramento humano para a definição de valores de referência (Becker et al., 2002). Os principais objetivos do GerES são gerar, atualizar, avaliar dados representativos da exposição humana a contaminantes e estabelecer valores de referência na Alemanha, que são revisados periodicamente, em decorrência de mudanças na exposição ambiental da população em geral, com relação aos poluentes (Becker et al., 2007; Schulz et al., 2009; Kuno et al., 2010).

Para avaliar dados de biomonitorização a Comissão de Biomonitoramento Humano da Alemanha recomenda o uso de dois tipos diferentes de valores guia: os valores de biomonitoramento humano (HBM) e os valores de referência.

Os valores HBM são derivados de estudos toxicológicos e epidemiológicos. De acordo com a comissão alemã, dois diferentes níveis podem ser identificados: HBM I e HBM II. O valor de HBM I representa a concentração da substância no material biológico humano abaixo da qual não há risco de efeitos adversos à saúde e consequentemente não há necessidade de intervenção. O valor HBM II

representa a concentração da substância no material biológico humano acima da qual há um aumento de risco de efeitos adversos à saúde, sendo necessário reduzir de forma urgente a exposição e fornecer cuidado médico individual. O valor de HBM I pode ser considerado um valor de verificação ou controle enquanto que o valor de HBM II pode ser considerado como um nível de intervenção ou ação. Níveis de concentração maiores que os valores de HBM I e menores que os valores de HBM II requerem análises adicionais com a identificação das fontes de exposição e necessidade de redução da exposição, pois não se podem excluir efeitos adversos à saúde (Ewers et al., 1999; Schulz et al., 2007; D'Illio et al., 2013).

Para níveis de concentração maiores que os valores de referência e menores que os valores de HBM I, a comissão alemã de biomonitoramento recomenda que se considerem os seguintes aspectos:

- se os valores de HBM I não forem excedidos, do ponto de vista toxicológico não há urgência de ação;
- por outro lado, se os valores de referência são excedidos, isto indica que a exposição é maior que a usual e, então deve ser ponderado se a exposição pode ser reduzida, levando-se em consideração se a fonte de exposição pode ser evitada, ou procurar outras explicações para este valor alto, não usual. Níveis encontrados acima dos valores de referência podem ser considerados como vindos de uma fonte específica.

Estas considerações se aplicam a achados individuais. No caso de valores altos serem encontrados para grupos de pessoas, devem-se verificar os seguintes

aspectos: se todas as amostras vêm de uma área específica; se as amostras foram colhidas após determinado evento, ou se houve um aumento na exposição num determinado período. Isto poderia prover indicação de uma fonte específica (Schulz et al., 2012).

Até o presente momento a comissão de biomonitoramento alemã, no caso de metais, derivou valores de HBM para chumbo e mercúrio em sangue de adultos e crianças. No entanto, em 2009 a mesma comissão suspendeu os valores de HBM (HBM I e II) para chumbo em sangue, para crianças e adultos. Essa decisão foi tomada em vista de evidências que mostraram não haver um nível seguro, especialmente para crianças, para o desenvolvimento de efeitos tóxicos causados pelo chumbo (Wilhelm et al., 2010; Schulz et al., 2011).

A comissão de biomonitoramento humano da Alemanha derivou valores de HBM para mercúrio no sangue, fornecendo o valor de 5 ug/L para o valor de HBM I e de 15 ug/L para o valor de HBM II, tanto para crianças quanto para adultos (Schulz et al., 2007; D'Illo et al., 2013).

- Programa de biomonitorização dos Estados Unidos (EUA)

Os EUA são um dos países que tem conduzido periodicamente programas de biomonitorização em grande escala, em amostras representativas da população geral. Um exemplo disso é o National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), programa organizado pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e que vem sendo realizado de forma contínua desde 1999, com

amostragens anuais. Esta pesquisa examina cerca de 5000 pessoas a cada ano, em diversas localidades do país para avaliar o estado nutricional e de saúde de adultos e crianças americanas. A pesquisa combina a realização de entrevistas e exames. A entrevista aplicada aborda questões demográficas, socioeconômicas, de dieta e de saúde. Além disso, exames médicos, dentais, fisiológicos bem como testes laboratoriais são realizados (CDC, 2013b).

O CDC realiza avaliação sobre a exposição ambiental da população americana a diversas substâncias, a partir de análises feitas no sangue, soro ou urina de subamostras aleatórias de cerca de 2500 participantes do NHANES. Os dados obtidos são compilados em ciclos de dois anos num relatório, o National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. A primeira edição foi lançada em março de 2001 e a revisão mais atualizada deste relatório está na sua quarta edição e foi publicada em 2013, apresentando todos os resultados obtidos das biomonitorizações realizadas em períodos anteriores. O relatório apresenta estatística descritiva dos níveis das substâncias analisadas no sangue, soro ou urina. A estatística inclui média geométrica e percentis com intervalo de confiança. Tabelas são apresentadas com resultados para a população total, bem como para grupos categorizados segundo a idade, gênero e etnia, conforme definido no NHANES (CDC, 2013a). Os resultados obtidos nessa biomonitorização estão sendo utilizados para estabelecer valores de referência, que podem ser usados para determinar se uma pessoa ou grupo de pessoas tem uma exposição não usual.

- Programa de biomonitorização do Canadá

O Canadá também está conduzindo estudos de biomonitorização de base populacional, e um desses é o Canadian Health Measures Survey (CHMS), que fornece dados nacionais sobre a exposição ambiental e estado nutricional, e de saúde da população. No primeiro ciclo do CHMS (2007-2009) foram coletados dados socioeconômicos, demográficos e informação sobre estilo de vida, histórico médico, estado de saúde, condições de moradia, além de amostras de sangue e urina, de amostra representativa de cerca de 5600 canadenses, com idades entre 6 e 79 anos. Parte da pesquisa de biomonitorização avaliou diferentes substâncias químicas e seus metabólitos, incluindo metais, agrotóxicos, e bisfenol A no sangue e na urina da população. A média geométrica foi utilizada como valor de referência para comparação com outros estudos (Haines et al., 2011; Haines; Murray, 2012).

- Programa de biomonitorização da Itália

Apesar dos programas nacionais de biomonitorização serem internacionalmente reconhecidos como pilares para avaliação da exposição humana a contaminantes, a Itália carece de pesquisas nacionais de monitorizações, predominando campanhas restritas a certas áreas do país (Bocca et al., 2011; Forte et al., 2011). Estas pesquisas regionais de monitorização estabeleceram valores de referência na população estudada, muitas delas orientadas pela Società Italiana per i Valori di Riferimento, SIVR, que vem atuando

e colaborando para a atualização do conhecimento e reforçando a relevância de valores de referência em saúde ambiental e ocupacional (Minoia et al., 1990; Apostoli et al., 2002; Alimonti et al., 2005; Bocca et al., 2011; Forte et al., 2011). Um programa de biomonitorização sobre a exposição ambiental a metais na população geral da Itália, o Program for biomonitoring of the exposure (PROBE), iniciado em 2008, tornou possível obter dados representativos da exposição a diversos metais na população italiana.

- Programa de biomonitorização da Eslovênia

A Eslovênia é um país do sul da Europa, que nas últimas três décadas praticamente realizou biomonitorizações em áreas altamente poluídas. Em 2007 seguindo as recomendações da Organização Mundial da Saúde preparou uma proposta para realização de programa de biomonitorização nacional. Com os dados obtidos neste programa pretendeu-se estabelecer valores de referência nacionais para cádmio, chumbo, dioxinas e furanos no sangue e em leite materno. Os resultados deste programa ainda não estão disponíveis (Perharic; Vracko, 2012).

- Projeto envolvendo diversas regiões da Europa

O projeto EURO TERVIHT (Trace Element Reference Values in Human Tissues) foi estabelecido no início dos anos 80, com os objetivos de determinar e

comparar concentrações de elementos-traço em tecidos e fluidos biológicos de indivíduos da população de diversos países da Europa, além de propor valores de referência, baseados nessas medidas. Estudos realizados dentro deste projeto envolveram a revisão de dados de concentrações de elementos obtidos nos materiais biológicos da população geral, com avaliação crítica dos fatores analíticos, pré-analíticos e de seleção dos indivíduos envolvidos no estudo.

Poulsen et al. (1994) analisaram criticamente estudos realizados na Dinamarca sobre as concentrações de elementos-traço (cádmio, cobalto, cromo, mercúrio, níquel, chumbo e selênio) no sangue da população do país, que poderiam servir como valores de referência. Com relação ao cádmio, mercúrio, níquel, selênio e cobalto no sangue os dados da literatura mostraram-se não válidos como valores de referência para a população geral da Dinamarca por não descrever adequadamente as populações com relação à idade, gênero, estilo de vida ou por não garantir a qualidade dos resultados gerados.

Após avaliar criticamente trabalhos realizados na Eslováquia e na República Tcheca, Kucera et al. (1995) verificaram que muitos dados apresentados nesses trabalhos não preenchiam critérios para derivar valores de referência, especialmente no quesito referente ao número de indivíduos, seleção do grupo de referência, e procedimentos de garantia de qualidade. Os autores chegaram à conclusão que havia então a necessidade de padronização de metodologias para contornar os problemas levantados.

- Programa de biomonitorização da Coreia do Sul

Uma das iniciativas mais recentes com relação à realização de programas de biomonitorização humana nacional está ocorrendo na Coreia do Sul, que está centrando esforços para medir os níveis de poluentes ambientais na população, por meio de monitorizações regulares. O Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) é um de uma série de programas relacionados com a saúde dos coreanos, patrocinado pelo centro para a prevenção e controle de doenças (CDC) do país. O KNHANES tem sido usado para avaliar o estado nutricional e de saúde da população coreana desde 1998. A pesquisa é composta de quatro partes: a componente de entrevista e comportamento de saúde para determinar as características demográficas e socioeconômicas, incluindo questionamentos sobre idade, nível de educação, ocupação, renda, hábitos de fumo, consumo de bebida alcoólica, prática de exercício, histórico de doença do participante e da família; pesquisa sobre a nutrição, e o exame de saúde, que inclui a medição de altura, peso, massa corpórea, pressão, além de coleta de material para exames laboratoriais (colesterol, LDL, HDL e triglicérides). O programa KNHANES começou em 1998 e cinco rodadas foram realizadas até o presente momento. As três primeiras edições do programa aconteceram em intervalos de aproximadamente três anos (KNHANES I em 1998, KNHANES II em 2001 e KNHANES III em 2005). A quarta edição (KNHANES IV) foi realizada entre 2007 e 2009 e a quinta edição do programa, KNHANES V, foi realizada entre 2010 e 2012. Em 2005 dentro do KNHANES III foi incluída a primeira biomonitorização

para chumbo, cádmio e mercúrio (Korean National Human Exposure and Biomonitoring Examination). Os dados dessa biomonitorização foram utilizados para estabelecer valores de referência para chumbo, cádmio e mercúrio no sangue da população geral adulta coreana (1997 participantes com idade acima de 20 anos). A média geométrica foi utilizada como valor de referência (Kim e Lee, 2011). Entre 2007 e 2008 foi realizada a segunda biomonitorização para os mesmos metais avaliados na primeira biomonitorização (Son et al., 2009).

Em resumo, podemos observar que os diferentes programas realizados para monitorizar a população geral a diversos grupos de substâncias são importantes fontes para derivação de valores de referência para a população geral ou subgrupos da população estratificados por classes de idade, gênero, etnia, hábitos, entre outras.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Os processos de urbanização e de industrialização têm levado ao aparecimento de áreas contaminadas em diferentes regiões. No Estado de São Paulo já foram detectadas mais de 4,5 mil áreas contaminadas (Cetesb, 2012). Dentre os principais contaminantes estão os agrotóxicos (20%), derivados de petróleo (16%), resíduos industriais (12%) e metais (11%) (Ministério da Saúde, 2010). Estima-se que mais de dois milhões de pessoas estejam expostas a substâncias tóxicas nestes locais. A divulgação da ocorrência de grandes incidentes de contaminação tem despertado a atenção por parte das autoridades e da sociedade, que passaram a exigir a realização de monitorizações para avaliação das populações expostas. Diante deste contexto, evidencia-se a necessidade de definições de valores de referência, com os quais os resultados obtidos na biomonitorização da população em estudo podem ser interpretados. Considerando que valores de referência produzidos no Brasil são escassos, os resultados produzidos neste estudo irão contribuir com esses valores, que podem ser utilizados nas avaliações de episódios de exposição humana devido à contaminação ambiental ou ocupacional, e definição de políticas públicas para evitar riscos à saúde humana devido à presença de metais no ambiente.

Seleção dos elementos a serem estudados

Os elementos metálicos, chumbo e mercúrio, envolvidos neste estudo foram selecionados levando em consideração a toxicidade, e também sua presença como poluentes ambientais. A seleção do cádmio no presente estudo levou em consideração sua toxicidade e o níquel foi selecionado, pois há poucos dados na literatura sobre os níveis basais na população geral.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo propor valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue de adultos e crianças, residentes no município de São Paulo.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar concentrações de níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue de uma amostra da população residente no município de São Paulo;
- Verificar a influência de variáveis sócio demográficas e de estilo de vida nas concentrações dos elementos estudados.

REVISÃO DE LITERATURA

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Antecedentes

O conceito de “valores de referência” foi introduzido em 1969 por dois pesquisadores escandinavos, Grasbeck e Saris, para descrever as concentrações de analitos no sangue de um grupo definido de indivíduos, que poderiam servir como controles ou referências para outros indivíduos sob estudo e, também para substituir o termo “valores normais” (Grasbeck, 1990; Apostoli, 1999; Geffré et al, 2009).

Tradicionalmente resultados de laboratório eram interpretados por comparação com os chamados valores normais, porém este termo apresentava ambiguidades e era vago com relação ao seu conceito e, portanto não mais seria considerado apropriado, o que propiciou a introdução e uso de um novo conceito, o de valores de referência (Grasbeck, 1988; Apostoli et al., 1998; Geffré et al, 2009).

Segundo Grasbeck (1988) a expressão valores normais apresentava muitas interpretações, como o de mais frequente, ou o que seguia uma distribuição Gaussiana ou ainda, que não apresentava patologia, conforme sua conotação fosse popular, estatística ou clínica (Sunderman Junior, 1975). Em virtude disso, para a interpretação dos dados laboratoriais, estes deveriam ser comparados com valores derivados de indivíduos classificados como controles, que não necessariamente seriam indivíduos “sadios”, mas que teriam características definidas e declaradas (Apostoli et al., 1998; Apostoli, 1999).

O termo valores de referência é freqüentemente usado de forma inadequada e seu significado tem sido confundido com o termo “valores normais”, conforme exposto acima ou com o termo valores limite. Valores limite servem para identificar os níveis de exposição para os quais não ocorrem danos à saúde das pessoas expostas e de seus descendentes. Já os valores de referência são derivados a partir de cálculos estatísticos e não de dados de saúde ou toxicológicos, sendo assim, não podem ser utilizados como valores orientadores baseados em efeitos à saúde (Ewers et al., 1999; Wilhelm, 2003; Schulz et al., 2009; Ceriotti et al., 2009).

Os valores de referência, entretanto permitem avaliar a exposição de indivíduos ou grupos de indivíduos comparando-os à exposição basal (background) a uma dada substância num dado período (Ewers et al., 1999; Alimonti et al., 2000). Portanto, os valores de referência podem ser usados como critérios para classificar os valores medidos como sendo elevados ou não,

conforme o caso (Schulz et al., 2009). Além disso, os valores de referência definem níveis dos indicadores biológicos na população geral que não é exposta diretamente por razões ocupacionais (Alessio, 1993; Alessio et al., 1994; Ewers et al., 1999).

Recomendações da IFCC

Cerca de vinte anos após a introdução do conceito sobre valores de referência, a International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) publicou o primeiro documento oficial com recomendações para a produção de valores de referência, seu tratamento e uso. Essas recomendações foram divididas em seis publicações:

- Parte 1: conceito de valores de referência (Solberg, 1987a);
- Parte 2: seleção dos indivíduos para a produção de valores de referência (Petitclerc; Solberg, 1987);
- Parte 3: preparação dos indivíduos e coleta de amostras para a produção de valores de referência (Solberg; Petitclerc, 1988);
- Parte 4: controle da variação analítica na produção, transferência e aplicação de valores de referência (Solberg; Stamm, 1991);

- Parte 5: tratamento estatístico de valores de referência e determinação de limites de referência (Solberg, 1987b);
- Parte 6: apresentação dos valores observados comparados aos valores de referência (Dybkaer; Solberg, 1987).

Desde então, tem ocorrido uma maior conscientização por parte da comunidade científica, que vem empregando o conceito de valores de referência para realizar interpretações mais precisas, quando se avalia a exposição humana a determinados elementos ou compostos e suas variações no organismo humano devido aos processos fisiológicos, diferenças genéticas, doenças ou fatores ambientais (Henny et al., 2000; Henny; Petersen, 2004).

O primeiro documento da IFCC apresenta o conceito de valores de referência e a nomenclatura utilizada para descrever a relação entre os resultados observados em um estudo e os valores de referência.

Os termos associados ao conceito de valores de referência, de acordo com a IFCC, são descritos a seguir:

- indivíduos de referência: indivíduo selecionado para comparação usando critérios de inclusão e exclusão definidos, sendo importante definir a condição de saúde do indivíduo;

- população de referência: grupo consistindo de todos os possíveis indivíduos de referência (no caso dos valores de referência individuais, a população é constituída somente de um membro; um indivíduo pode servir como referência dele mesmo ou de outro indivíduo);
- grupo de amostra de referência: subconjunto da população de referência. As características do grupo de amostra de referência nem sempre são idênticas às características da população de referência, pois a população de referência compreende um número desconhecido de membros (é uma entidade hipotética), além disso, o grupo de amostra de referência raramente é selecionado de maneira totalmente aleatória;
- distribuição de referência: distribuição estatística dos valores de referência;
- valor de referência: valor obtido por observação ou medida, de um mensurando (substância química ou seu metabólito) obtido do grupo de amostra de referência;
- limites de referência: valores derivados da distribuição de referência, que são utilizados com propósitos descritivos; é um descritivo dos valores de referência;
- intervalo de referência: intervalo entre e incluindo, dois limites de referência; o intervalo compreendendo uma fração dos valores medidos nos indivíduos de referência, mais frequentemente a distribuição central de 95% dos valores de referência delimitado entre dois percentis;

- valor observado: valor obtido por observação ou medida, e produzido para tomar uma decisão, que pode ser comparado com valores de referência. Em resumo, seria o valor obtido de análise laboratorial de um material coletado a partir de um indivíduo.

Na prática, geralmente compara-se os valores observados em um indivíduo de uma população com os limites de referência (o limite inferior e o superior).

As relações entre os termos acima descritos são apresentadas na Figura1.

Figura 1: Relações entre os termos relacionados a “valores de referência” de acordo com a IFCC. FONTE: Solberg, 1987a.

Definição de valores de referência

Após a definição inicial de valores de referência da IFCC em 1987, vários autores aprimoraram a definição, melhorando a sua compreensão e aplicação.

Por definição, valores de referência refletem os achados num grupo selecionado da população, os quais indicam a exposição basal dessa população com relação a uma dada substância num dado período (Ewers et al., 1999; Alimonti et al., 2000).

Estudos realizados levando em consideração diferenças relacionadas ao consumo alimentar, de bebidas alcoólicas, de medicamentos, suplementos vitamínicos, proximidade com fontes antropogênicas e geogênicas de contaminantes metálicos, fatores étnicos, etc, definem um determinado valor médio ou mediano de um contaminante metálico no sangue de determinada população. Esses valores médios ou medianos, que não estão relacionados a ocupações específicas ou hobbies que podem expor as pessoas a doses excessivas de metais, são chamados de valores de referência (Apostoli, 1999; Komaromy-Hiller et al., 2000; Alimonti et al., 2000; 2005).

A população de referência fornece uma amostra constituída de forma aleatória de todos os possíveis indivíduos de referência, submetidos posteriormente a critérios de inclusão e exclusão considerando exposições específicas e doenças que interfiram nessa medida (exclusão), e considerando determinada faixa etária e gênero (inclusão) (Apostoli, 1992; 1999). O intervalo de referência é assim definido como o intervalo cobrindo 95% da população com

distribuição normal (ou transformada em normal) ou, por exemplo, o intervalo de referência não paramétrico entre o percentil 2,5 e o percentil 97,5 baseado em pelo menos 120 observações (Kucera et al., 1995; Batariová et al., 2006).

Tipos de valores de referência

Os valores de referência podem ser categorizados conforme diferentes critérios, por exemplo, valores de referência de base populacional ou individual, univariada ou multivariada. Os intervalos de referência de base individual podem ser construídos com base na análise estatística temporal ou por modelos fisiológicos. Os intervalos de referência multivariados envolvem a análise combinada de duas ou mais substâncias em estudo, no mesmo grupo de indivíduos de referência (Solberg, 1987a).

Na literatura podem ser encontrados trabalhos com estabelecimento de valores de referência a partir, por exemplo, de população amostrada de hospitais (Liu et al., 2012; Mortada et al., 2002). Desta forma, o termo “referência” deveria ser acompanhado ou precedido por descritores que qualificassem o estado de saúde dos indivíduos para os quais foram derivados os valores de referência utilizando o nome da doença ou a condição da coleta da amostra, como por exemplo: diabético, diabético hospitalizado, etc (Grasbeck, 1988; Solberg; Grasbeck, 1989). Deve-se enfatizar que o termo valores de referência não implica que sejam derivados de indivíduos saudáveis (Fuentes-Arderiu et al., 2004) ou

que provenham da população em geral, assim é recomendável definir ou caracterizar a fonte de dados de referência apresentada (Grasbeck, 1990).

Ritchie e Palomaki (2004) enfatizaram a necessidade de ser estabelecido um intervalo de referência específico para cada doença em particular. Este intervalo seria gerado a partir de indivíduos considerados controles para os pacientes em estudo, o que possibilitaria interpretar a condição do paciente de modo mais apropriado (Grasbeck, 1990).

Papel dos valores de referência

Os valores de referência desempenham papéis importantes, pois podem ser utilizados para:

- identificação de a quais xenobióticos a população está exposta e em quais concentrações;
- estimativa da porcentagem de pessoas com níveis acima dos níveis de toxicidade para cada xenobiótico com nível de toxicidade conhecida;
- estabelecimento de valores de referência, que podem ser utilizados para determinar se um indivíduo ou grupos de pessoas têm uma exposição não usual;
- avaliação da efetividade dos esforços de políticas de saúde pública para reduzir a exposição a determinados xenobióticos;
- verificação se os níveis de exposição são maiores entre crianças, mulheres ou outros grupos potencialmente vulneráveis;

- estabelecimento de tendências dos níveis de exposição na população ao longo do tempo;
- estabelecimento de prioridades para pesquisa sobre os efeitos de xenobióticos na saúde humana (Apostoli; Ricossa, 2012).

A produção de valores de referência

A produção de valores de referência pode ser realizada em um único laboratório ou ser do tipo multicêntrico. A opção de se ter um projeto colaborativo para a produção de valores de referência está baseada na redução de tempo e custo e, também na dificuldade em se recrutar um número apropriado de indivíduos de referência para o estabelecimento dos valores de referência (Fuentes-Arderiu et al., 2004).

Várias condições devem ser consideradas ao se derivar valores de referência, de acordo com o seu uso (Petitclerc; Solberg, 1987; Jones; Barker, 2008):

- definição dos analitos para os quais se está derivando o valor de referência, estabelecendo as razões da escolha;
- definição do método analítico a ser utilizado, validado com relação a parâmetros que garantam sua estabilidade ao longo do tempo;

- definição de parâmetros pré-analíticos que possam afetar os resultados, como por exemplo, período da coleta;
- definição da estatística a ser aplicada na derivação de valores de referência, por exemplo, consideração do intervalo central de 95% da população de referência ou outro intervalo mais apropriado;
- descrição da fonte de dados (as características dos indivíduos de referência e do grupo de amostra de referência, como: gênero, idade, massa corpórea, fatores genéticos, étnicos e socioeconômicos e, as condições fisiológicas e ambientais dos indivíduos de referência), incluindo o número de indivíduos, critérios de exclusão, fatores pré-analíticos (manuseio de amostra ou preparação do paciente, por exemplo), estatística aplicada (média, mediana, intervalos de confiança).
- definição de critérios de partição, que devem levar em consideração o provável efeito na tomada de decisão clínica;

Os valores observados podem então ser comparados com os valores de referência derivados.

Para a adequada produção de valores de referência devem-se levar em consideração os fatores que contribuem para sua variação. Dentre eles podem-se citar as variáveis pré-analíticas e analíticas. Em geral as variáveis pré-analíticas englobam os fatores biológicos e metodológicos.

Os fatores biológicos incluem variáveis de ordem metabólica (fatores que influenciam o metabolismo como, por exemplo: jejum prolongado; uso de substâncias farmacologicamente ativas como cafeína, betabloqueadores, suplementação hormonal, contraceptivos, estresse, exercício físico) (Klee, 2004;

Fraser, 2004). Já os fatores metodológicos são relacionados à coleta da amostra, seu manuseio e análise. Por exemplo, atenção deve ser dada na coleta do sangue, incluindo a técnica a ser utilizada (uso de torniquete, por exemplo), equipamentos utilizados (agulha, tubo), aditivos (anticoagulantes), que podem influenciar a medição do analito, seja por causar dano à célula ou por introduzir contaminantes (Solberg; Petittclerc, 1988; Solberg; Grasbeck, 1989).

Entre os fatores que contribuem para a variabilidade da concentração de xenobióticos no organismo não se pode ignorar: a via de absorção, a presença de fontes de poluição ambiental em diferentes áreas, as variáveis fisiológicas e estilos de vida das pessoas, que desempenham papel importante. Em resumo, quando se estabelece valores de referência é essencial que se avaliem a contribuição do ambiente, dieta e hábitos individuais, que podem afetar os valores medidos na população (Apostoli; Ricossa, 2012).

Certos fatores biológicos como gênero, idade e etnia não podem ser eliminados, mas podem ser usados como critérios de partição para possibilitar comparações relevantes (Solberg; Petittclerc, 1988; CLSI, 2008).

O conjunto de itens a serem avaliados vai depender do efeito da variação sobre a concentração do analito de interesse.

A produção de valores de referência seja de base populacional como individual requer uma seleção apropriada, e posterior subclassificação (partição), que é feita por meio da descrição das características dos indivíduos de referência e pela aplicação de critérios claramente definidos.

Seleção dos indivíduos de referência

Para a produção de valores de referência selecionam-se os indivíduos de referência que irão compor o grupo de amostra de referência, de acordo com critérios estabelecidos, de tal forma que este grupo seja o mais semelhante possível com a população em estudo. As inferências feitas a partir da avaliação dos resultados tornam-se então mais confiáveis (Solberg; Grasbeck, 1989; Klee, 2004).

A exclusão de indivíduos pode ser realizada de diferentes formas, por exemplo, por meio de questionário anamnésico, exame físico e outras investigações, como testes laboratoriais e exames de imagem (Ceriotti et al., 2009).

As características necessárias aos indivíduos de referência vão depender do escopo para o uso dos valores de referência (Solberg; Grasbeck, 1989; Ceriotti et al., 2009).

Estratégias para a seleção dos indivíduos de referência

São várias as estratégias para a seleção dos indivíduos de referência: direta ou indireta, *a priori* ou *a posteriori*, aleatória ou não aleatória.

No método de seleção direta os indivíduos são selecionados a partir de uma população, utilizando critérios de inclusão e exclusão bem definidos e específicos. Já no método indireto os indivíduos não são considerados, mas sim os valores de uma base de dados, que foi estabelecida para outros propósitos, como por exemplo, dados de hospitais que possuem em seus bancos, dados de pacientes, que fazem exame de rotina. Neste caso, métodos estatísticos são aplicados para identificar os valores de referência dentro da distribuição de resultados do referido banco. (Solberg; Grasbeck, 1989; Ashavaid et al., 2005; Ilcol; Aslan, 2006; CLSI, 2008). Este tipo de abordagem tem sido adotado em função do trabalho e custo envolvido em se obter o grupo de amostra de referência. Uma limitação neste tipo de método de seleção é que as características da população de referência não são cuidadosamente definidas, como no método direto. Outra limitação desta abordagem reside no fato que há pouco ou nenhum controle sobre as variáveis pré-analíticas (Ceriotti et al., 2009).

No método de seleção *a priori* ou prospectivo os critérios de exclusão e partição são aplicados antes da coleta das amostras. Este método é mais adequado para estudos menores e para indivíduos que preencham critérios de inclusão definidos. Quando os critérios de inclusão e exclusão, e partição são aplicados após a coleta das amostras tem-se o método *a posteriori* ou retrospectivo. O método *a posteriori* baseia-se na disponibilidade de se ter uma amostra de tamanho grande retirada da população. Resumindo, no método de seleção *a posteriori* um número relevante de indivíduos é coletado, analisado e só então decidido quais indivíduos serão mantidos na população de referência, para

então serem estratificados. O tamanho da amostra em ambos os tipos de seleção vai depender do tipo e número de variáveis a serem estudados (Petitclerc; Solberg, 1987; Apostoli, 1992).

Idealmente os indivíduos de referência deveriam ser obtidos de forma aleatória (Rustad et al., 2004). Comumente o que se faz na prática é a seleção aleatória de indivíduos da população e aplicação de critérios de inclusão e exclusão para a seleção dos indivíduos de referência.

Solberg e Grasbeck (1989) consideram amostragem não aleatória os indivíduos de referência derivados, por exemplo, de um grupo de doadores de sangue ou de um grupo de trabalhadores de laboratório.

Estratificação do grupo de amostra de referência

Para a formação de grupos mais homogêneos os indivíduos de referência selecionados podem ser estratificados de acordo com a idade e gênero, sendo estes critérios de partição mais comumente utilizados.

A categorização por idade não precisa necessariamente ser feita em intervalos iguais (por exemplo, por décadas), devendo-se levar em consideração a variação do mensurando com a idade. Então, no caso de crianças a categorização poderia ser feita em função da idade óssea, altura e massa corpórea, considerados melhores indicadores do que a idade cronológica. Nos casos de puberdade e menopausa, intervalos menores podem ser considerados (Petitclerc; Solberg, 1987).

Dependendo do tipo de valor de referência e de seu uso, pode ser de interesse a partição segundo outros critérios como, por exemplo, os fatores genéticos, socioeconômicos e ambientais (a origem étnica, localização geográfica, marcadores genéticos, entre outros). Deve-se, portanto considerar a validade e a relevância em se subcategorizar a população de referência (Solberg; Grasbeck, 1989; Klee, 2004).

Critérios de partição são baseados nas características do indivíduo de referência selecionado e servem para dividir a amostra de referência em subclasses significantes.

Em alguns casos o que seria considerado um critério de exclusão num estudo poderia ser considerado critério de partição em outro. Um exemplo disso pode ser a gravidez: um laboratório voltado ao atendimento da população em geral poderia excluir mulheres grávidas de sua amostra de referência, enquanto que outro laboratório cujo foco esteja voltado à prática obstétrica poderia escolher estratificar suas amostras a partir de mulheres grávidas para o estabelecimento de valores de referência (CLSI, 2008).

Tratamento estatístico para derivação de valores de referência

Os valores de referência podem ser apresentados sob a forma de intervalos de referência. O intervalo de referência é definido como o intervalo entre e incluindo, os limites de referência inferior e superior, contemplando uma porcentagem especificada da distribuição dos dados de referência. O tamanho do

referido intervalo deve ser ajustado de acordo com o uso (Solberg, 1987; Grasbeck, 1990).

Na literatura vários métodos são abordados para estimativas de valores de referência: intervalo de tolerância, intervalo de predição e intervalo por percentil. O intervalo de referência definido por percentil pode ser estimado tanto por métodos estatísticos paramétricos quanto por não-paramétricos, sendo este o tipo mais usado e recomendado pela IFCC (Solberg; Grasbeck, 1989; Rustad et al., 2004; Ashavaid, 2005).

Uma convenção frequentemente adotada é que o valor de referência deva conter 95% da distribuição de referência. Esta definição resulta na exclusão de 2,5% dos indivíduos que apresentam os resultados mais baixos e outros 2,5% dos indivíduos com os resultados mais altos, quando aplicados num intervalo de referência bilateral. No caso do interesse clínico estiver focado somente num resultado (alto ou baixo) define-se o valor de referência unilateral, que exclui 5% dos indivíduos de um único lado ou extremidade da distribuição (Boyd, 2010). Entretanto, outras frações ou uma localização assimétrica do valor de referência podem ser mais apropriadas em certos casos. Os valores de referência podem ser estimados, por exemplo, como os percentis 2,5 e 97,5 da distribuição dos resultados da população de referência, embora outros intervalos também possam ser utilizados (Rustad et al., 2004; Jones; Barker, 2008).

A IFCC recomenda que se especifique o intervalo de confiança para cada um dos limites de referência (Solberg, 1987b; Solberg; Grasbeck, 1989). O

intervalo de confiança é dependente do número de indivíduos de referência, bem como da distribuição dos valores de referência (CLSI, 2008).

Os seguintes procedimentos foram recomendados pela IFCC para a determinação de valores de referência (Solberg, 1987b):

- Definição da população de referência;
- Partição dos valores em subclasses (de acordo com o gênero ou a idade, por exemplo) para reduzir a variação. Atenção deve ser dada ao número suficiente de valores em cada subclasse para obtenção de estimativas confiáveis;
- Verificação da distribuição dos resultados para obtenção do valor de referência (isto é, se segue uma distribuição do tipo Gaussiana ou não). A distribuição dos dados deve ser verificada quanto à presença de assimetria, curtose, valores extremos, bi ou poli modalidades. Caso a presença destes seja identificada há necessidade de reavaliar os critérios de seleção para definir a população de referência, ou subdividir o grupo de amostra de referência de acordo com o gênero, idade ou outros fatores.
- Identificação de possíveis valores aberrantes. Decisões devem ser tomadas para a inclusão ou eliminação desses valores;
- Seleção do método estatístico para estimar os valores de referência de acordo com o tipo de distribuição dos valores.

Os procedimentos utilizados para derivar os valores de referência variam conforme as técnicas estatísticas possíveis de serem aplicadas.

a) método não paramétrico

O valor de referência derivado pelo método não paramétrico é estimado por meio de percentil associado a um intervalo de confiança.

b) método paramétrico

Se o método paramétrico for o adotado para a definição dos valores de referência deve-se proceder de acordo com as etapas descritas a seguir:

- etapa 1: verificar a distribuição dos dados;

Para dados que seguem uma distribuição Gaussiana, calcular a média e o desvio-padrão. Do contrário, tentar transformações dos dados ou escolher um método não paramétrico.

- etapa 2: transformação dos dados;

Utilizar funções matemáticas, como logaritmos, raiz quadrada, raiz cúbica, entre outros, para transformar os dados e testar novamente a distribuição. Caso a transformação tenha sucesso e a distribuição se aproxime de uma gaussiana utilizar os dados transformados para estimar a média mais ou menos 1,96 desvios-padrão (considerando-se um nível de confiança de 95%). Em seguida, deve-se re-transformar os valores obtidos para obtenção do intervalo final.

Com relação ao número de observações necessárias para a determinação dos valores de referência, este deve ser preferencialmente de no mínimo 120 dados para que se obtenham estimativas confiáveis (Solberg, 1987a; CLSI, 2008; Jones e Barker, 2008).

Estabelecimento de valores de referência

Para estabelecer um valor de referência um conjunto de informações deve ser fornecido para saber se os dados observados foram adequadamente obtidos e tratados. Devem ser fornecidas as informações sobre a amostra e o tratamento estatístico dos dados:

a) Informações sobre a amostra

De acordo com a aplicação, devem ser estabelecidos os critérios para a seleção dos indivíduos de referência para compor a amostra. Também deve ser definido o número de indivíduos de referência, os procedimentos para a coleta da amostra, estratificações dos grupos, controle das condições pré-analíticas e analíticas e o método de análise.

b) Tratamento dos dados obtidos

O tratamento estatístico dos dados observados para a derivação de valores de referência, bem como os testes para verificação da normalidade e suas transformações devem ser informados. Caso os dados apresentem distribuição

normal, métodos paramétricos podem ser aplicados, e os valores de referência devem ser reportados como sendo a média $\pm$ desvio padrão. No caso de falta de normalidade dos dados, o método não paramétrico deverá ser utilizado e o valor de referência informado deverá conter 95% dos dados obtidos, com o intervalo de confiança.

Os valores de referência podem ser apresentados sob a forma de gráficos, tabelas e também combinados segundo diferentes critérios (como idade, gênero, etnia, etc), de acordo com a relevância.

Quando diferenças são verificadas entre os valores observados de um indivíduo de um grupo que esteja sendo biomonitorizado e os valores de referência isto não implica necessariamente em significância médica. Para a correta interpretação devem-se levar em consideração os fatores clínicos, bioquímicos e fisiológicos. Assim, valores observados abaixo ou iguais ao valor de referência devem ser interpretados como “não expostos” ou então “expostos”, quando o valor observado estiver situado acima do valor de referência.

Os termos “anormais”, “normais”, “patológicos” não são recomendados, uma vez que o valor de referência é calculado com base em avaliações estatísticas, sem levar em consideração os efeitos toxicológicos aos contaminantes (Dybkaer; Solberg, 1987).

4.2 Toxicologia dos metais

A seguir é apresentado um breve descritivo enfocando a ocorrência, usos, efeitos à saúde humana relacionada à exposição ambiental, e as possíveis vias de exposição da população geral aos elementos estudados.

4.2.1 Toxicologia do chumbo

Ocorrência e usos

O chumbo é um elemento que se apresenta com relativa abundância na crosta terrestre, sob a forma de uma variedade de minérios. As principais fontes naturais do metal incluem emissões vulcânicas, intemperismo geológico e névoas aquáticas (Paoliello; De Capitani, 2003). Como fontes antropogênicas do chumbo podem-se citar: mineração e fundição dos minérios do metal, produtos à base de chumbo, combustão de carvão e óleo e, incineração de resíduos. Outras fontes antropogênicas que causaram grande elevação nas concentrações deste elemento no ambiente foram seu uso na gasolina, tintas, soldas, agrotóxicos e munição que foram eliminadas ou estão estritamente regulamentadas em diversos países, devido à sua persistência e toxicidade (ATSDR, 2007).

O transporte e distribuição do chumbo são dependentes das fontes de emissão fixas e móveis. O chumbo encontrado no solo é resultante da deposição (seca ou úmida) da atmosfera e geralmente fica retido nas camadas superiores do solo, sendo muito pouco transportado para águas superficiais ou subterrâneas. Os

fatores que influenciam o seu transporte no solo e sua disponibilidade são: pH, composição mineral do solo, quantidade e tipo de matéria orgânica, presença de colóides inorgânicos e óxidos de ferro e, a quantidade do metal (Paoliello; De Capitani, 2003). As fontes que mais contribuem para a presença de chumbo no solo vêm de suas utilizações passadas, como o seu uso na gasolina (ATSDR, 2007).

Na atmosfera o chumbo encontra-se sob a forma de partículas, as quais são transportadas para outros compartimentos ambientais por deposição predominantemente úmida e tende a se acumular nos locais onde é depositado. O tamanho da partícula influencia o seu transporte. Partículas grandes depositam-se rapidamente próximas às fontes de emissão, enquanto que as partículas menores podem ser transportadas para longas distâncias (WHO, 1995).

A água de rios, lagos e oceanos também pode conter chumbo devido às emissões do metal por fatores naturais ou antropogênicos. As concentrações do metal nesse compartimento são influenciadas pelo pH, presença de agentes complexantes e sais.

O chumbo também ocorre naturalmente em plantas, resultado de processos de captação e incorporação do metal nos diferentes biomas (Paoliello; De Capitani, 2003).

A exposição humana ao chumbo devido à contribuição de fatores naturais é baixa. Já o extenso uso do chumbo em diferentes aplicações tem contribuído para o aumento significativo de sua concentração no meio ambiente (solo, água e ar) (WHO, 1995; ATSDR, 2007).

Devido às suas propriedades físico-químicas o chumbo tem sido utilizado em diferentes segmentos, por exemplo: na produção de baterias elétricas, pigmentos e tintas, cabos, revestimentos de parede e telhados, munição, isolamento de ruídos, esmaltes cerâmicos e, ligas utilizadas na blindagem de radiação, soldas e rolamentos, entre outros (WHO, 1995; ATSDR, 2007).

A população geral pode ser exposta ao chumbo por ingestão de alimentos e água e, por inalação (WHO, 1995; ATSDR, 2007), sendo o consumo de alimentos e bebidas a principal fonte de exposição não ocupacional ao chumbo. A concentração de chumbo no alimento é função da concentração do metal no ar, água e outras fontes, como a presença deste elemento na embalagem de envase ou acondicionamento durante sua produção ou preparo. Água de consumo também pode ser contaminada pelo metal devido ao uso de encanamentos ou soldas à base de chumbo no sistema de distribuição, além de reservatórios, cisternas e tanques para água recobertos com chumbo em sua superfície (Paoliello; De Capitani, 2003). Além da alimentação, principalmente as crianças podem ser expostas ao chumbo pelo solo e poeira (WHO, 1995).

Toxicocinética

Absorção

A absorção do chumbo proveniente das fontes ambientais é influenciada por fatores biológicos do indivíduo exposto (idade, estado fisiológico, condição nutricional, fatores genéticos), quantidade do metal nas vias de entrada e sua

forma química. Por exemplo, dietas pobres em cálcio, fosfato, ferro, selênio ou zinco podem resultar em aumento de absorção do metal (Lauwerys; Hoet, 2001).

Para a população em geral a exposição ao chumbo ocorre principalmente por via oral e em pequena extensão pela via respiratória. Para a exposição ocupacional a principal via de absorção do chumbo é por via respiratória. Cerca de 20 a 40% do chumbo que entram no trato respiratório permanecem no organismo, sendo que a maior parte é levada ao trato gastrointestinal. Independente da forma química a quantidade que permanece nos pulmões é rapidamente absorvida (Paoliello; De Capitani, 2003). A taxa de absorção depende da solubilidade das espécies químicas do chumbo (Skerfving; Bergdahl, 2007).

A absorção gastrointestinal em crianças é aproximadamente três vezes maior que em adultos. Durante os períodos de jejum a taxa de absorção de chumbo é muito maior do que quando ingerido com alimentos (Paoliello; De Capitani, 2003). A deficiência nutricional de ferro está associada com o aumento nos níveis de chumbo no sangue, enquanto que a vitamina D e o álcool aumentam a absorção do metal (Skerfving; Bergdahl, 2007).

A taxa de absorção via dérmica é muito menos significativa do que a oral e a respiratória (Paoliello; De Capitani, 2003). A absorção do chumbo pela pele é bastante reduzida, porém a contaminação das mãos pelo chumbo contribui para sua ingestão oral. Esta é uma via de exposição importante tanto para crianças como para adultos expostos ocupacionalmente. A contaminação dos cigarros pelas mãos de trabalhadores expostos ao metal parece ser a causa para a exposição por inalação (Skerfving; Bergdahl, 2007).

Distribuição

A distribuição do chumbo no organismo humano ocorre de maneira similar, independente da via de absorção (Paoliello; De Capitani, 2003).

O chumbo é distribuído no sangue, ossos e tecidos moles. No sangue o tempo de meia vida é curto, aproximadamente 36 dias; nos tecidos moles a meia vida é de cerca de 40 dias e nos ossos, o compartimento mais estável, é de aproximadamente 27 anos (Paoliello; De Capitani, 2003). O sangue representa a exposição relativamente recente ao chumbo e os níveis de chumbo encontrados no sangue são devidos ao ambiente e também ao chumbo armazenado nos tecidos (particularmente ossos) que entram na corrente sanguínea durante o processo de mobilização (WHO, 1995). No sangue mais de 99% do chumbo está presente nos eritrócitos (células vermelhas) e o restante está presente no plasma (Skerfving; Bergdahl, 2007).

Como a meia vida do chumbo nos ossos é longa esse compartimento serve como fonte endógena do metal para outros compartimentos, mesmo depois de cessada a exposição há algum tempo (Skerfving; Bergdahl, 2007). Mobilização do chumbo a partir do osso pode ocorrer em determinada situação fisiológica ou patológica, como por exemplo, na osteoporose, fratura do osso, gravidez, hipertireoidismo, câncer de osso e quimioterapia (Lauwerys; Hoet, 2001).

Uma vez absorvido, o chumbo não é distribuído de forma homogênea entre os diversos compartimentos do corpo. Em adultos, aproximadamente 94% da carga corpórea do chumbo estão presentes nos ossos, enquanto que em crianças,

73% do chumbo encontram-se nesse compartimento (Paoliello; De Capitani, 2003).

Eliminação

A eliminação do chumbo do organismo ocorre principalmente pela urina e pelas fezes. Cerca de 60% do chumbo absorvido permanecem no organismo, enquanto que 40% são excretados. O chumbo também pode ser excretado pelo leite materno, cuja concentração pode variar entre 10 e 30% da concentração materna de plumbemia (Ong et al., 1985; Koyashiki et al., 2010).

Efeitos à saúde humana decorrentes da exposição ambiental ao chumbo

Segundo a literatura os sistemas mais sensíveis aos efeitos tóxicos do chumbo incluem o sistema nervoso, o sistema cardiovascular e o hematológico, além dos rins. Contudo, devido à ação do chumbo sobre os sistemas biológicos, este metal pode afetar qualquer sistema ou órgão no corpo (ATSDR, 2007).

- Efeitos neurológicos

Com relação aos efeitos neurológicos o chumbo pode causar prejuízos na função cognitiva de adultos e crianças, porém as crianças são mais vulneráveis. Crianças são mais propensas a entrar em contato com superfícies contaminadas

devido às brincadeiras realizadas no chão e às atividades mão-boca e tornam-se mais vulneráveis devido às diferenças na absorção do chumbo ingerido em relação a adultos. Estudos recentes em crianças sugerem evidências dos efeitos do chumbo sobre as funções cognitivas com concentrações de chumbo no sangue abaixo de 10 ug/dL e, possivelmente tão baixas quanto 5 ug/dL (ATSDR, 2007).

- Efeitos cardiovasculares/renais

Uma das maiores preocupações com relação à exposição ao chumbo são as disfunções renais caracterizadas por mudanças nas taxas de filtração glomerular e tubulointersticial, resultando em hipertensão, hiperuricemia, gota (artrite saturnina) e falha renal crônica. Decréscimos na taxa de filtração glomerular podem contribuir com o aumento da pressão sanguínea e, a pressão sanguínea elevada pode predispor pessoas a doenças glomerulares (ATSDR, 2007; Skerfving; Bergdahl, 2007).

Estudos têm mostrado que o chumbo no sangue não é um bom biomarcador para verificar o efeito do chumbo sobre a hipertensão, enquanto que o chumbo no osso tem se mostrado um melhor preditor de elevação da pressão sanguínea induzida pelo chumbo (ATSDR, 2007).

Estudos epidemiológicos encontraram uma associação fraca, porém significativa, do aumento da pressão sanguínea sistólica com o aumento da concentração de chumbo no sangue. Resultados de estudos recentes indicaram que a contribuição do chumbo para o aumento da pressão sanguínea é mais

pronunciada em pessoas de meia idade em comparação com pessoas mais novas (ATSDR, 2007).

Estudos sugerem que o aumento na severidade da nefrotoxicidade em humanos está associado à concentração aumentada de chumbo no sangue. Efeitos sobre a filtração glomerular são observados com concentrações de chumbo em sangue abaixo de 10 ug/dL, enzimúria e proteinúria com concentrações de chumbo em sangue acima de 30 ug/dL e vários déficits e mudanças patológicas quando as concentrações de chumbo em sangue excedem 50 ug/dL (ATSDR, 2007).

- Efeitos hematológicos

Os efeitos adversos do chumbo sobre o sistema hematológico estão relacionados à perturbação de várias reações enzimáticas na síntese do heme. A inibição na síntese do heme pode resultar em anemia, prejuízo no metabolismo de compostos endógenos, detoxificação de xenobióticos e aumento exagerado dos níveis de neurotransmissores no cérebro, entre outros (ATSDR, 2007).

A exposição ao chumbo causa a inibição do ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD) e por consequência o aumento nos níveis do ácido δ -aminolevulínico sintetase (ALA) no sangue, levando ao aumento da excreção urinária. O ALAD no sangue periférico e o ALAU na urina se correlacionam estreitamente com os níveis de chumbo no sangue, servindo como indicadores precoces da exposição ao metal (Paoliello; De Capitani, 2003).

4.2.2 Toxicologia do cádmio

Ocorrência e usos

O cádmio está extensamente distribuído pela crosta terrestre e apresenta concentração média próxima de 0,1 mg/kg. Geralmente encontra-se associado aos minérios de zinco, chumbo e cobre. Altas concentrações de cádmio podem ser encontradas em rochas sedimentares e fosfatos marinhos (Chasin; Cardoso, 2003; WHO, 1992).

A atividade vulcânica é considerada a principal fonte natural de emissão de cádmio para a atmosfera, seguida pela emissão decorrente de incêndios florestais. As emissões do metal devido aos fatores antropogênicos são devidas às atividades de mineração, produção, consumo e disposição de produtos contendo cádmio, aplicação de fertilizantes fosfatados, queima de combustíveis fósseis, incineração e disposição de resíduos industriais e domésticos (Chasin; Cardoso, 2003; Nordberg; Nordberg, 2002).

O ar geralmente contém baixos níveis de cádmio, que se encontra na forma particulada suspensa, o qual pode ser transportado para áreas distantes das fontes de emissão. O material particulado contendo cádmio pode se depositar gravimetricamente ou pode se dissolver na atmosfera e ser removido por deposição úmida ou por precipitação (Chasin; Cardoso, 2003).

Os sistemas aquáticos podem conter cádmio devido às fontes naturais, como intemperismo, erosão do solo e da camada de rocha, e também devido aos fatores antropogênicos, como vazamentos de aterros e locais contaminados,

drenagem de águas residuais dos processos de mineração, descargas de efluentes produzidos por lavagem dos gases de fundições de minérios e, pela aplicação de lodos de esgoto e fertilizantes na agricultura. Em águas superficiais e subterrâneas o cádmio encontra-se principalmente na forma de partícula suspensa, o qual pode se mobilizar na água e, na forma de sedimento, um estado relativamente estático. O cádmio pode ser mobilizado do sedimento em função da modificação do pH, salinidade e potencial de óxido-redução (Chasin; Cardoso, 2003). A contaminação da água de consumo pode ocorrer como resultado da contaminação de encanamentos, aquecedores, resfriadores de água e torneiras (Nordberg et al., 2007).

O cádmio encontrado no solo é resultante da deposição seca e da precipitação. Os fatores que influenciam o seu transporte são: pH, reações de óxido-redução e formação de complexos. As camadas mais superficiais do solo geralmente apresentam concentrações de cádmio duas vezes maiores que as mais subterrâneas, devido à deposição atmosférica e contaminação. Além disso, concentrações elevadas do metal podem ser encontradas próximas das fontes de emissão (Chasin; Cardoso, 2003).

O cádmio se bioacumula em plantas, invertebrados, peixes e mamíferos e a concentração se eleva quanto maior for o nível trófico do organismo. Nos mamíferos o cádmio se concentra principalmente nos rins e fígado. Como o cádmio acumula-se na cadeia alimentar pode dessa forma atingir o homem. Em plantas, o cádmio se concentra primariamente nas raízes e, em menor extensão nas folhas (Chasin; Cardoso, 2003; WHO, 1992).

Atualmente as principais aplicações do cádmio são em baterias de níquel-cádmio, pigmentos, revestimento sobre outros metais, como o aço e o ferro, para impedir a corrosão, estabilizador em plásticos, entre outras (CDC, 2012).

Exposição humana ao cádmio pode ocorrer por inalação do ar ambiente contendo partículas de cádmio, pela dieta (consumo de bebidas e alimentos) ou ingestão acidental do solo ou poeiras contaminadas por cádmio, pelo hábito de fumar ou ainda pelas atividades ocupacionais que envolvem exposição a poeiras ou fumos de cádmio. Os alimentos e o cigarro constituem as principais vias de exposição ao cádmio pela população em geral (Chasin; Cardoso, 2003; Nordberg et al., 2007). A literatura relata altas ingestões de cádmio pelo consumo de mariscos e frutos do mar (Nordberg; Nordberg, 2002).

Toxicocinética

Absorção

Absorção por via dérmica ocorre de forma lenta, porém pode atingir proporções relevantes quando soluções concentradas de cádmio ficam em contato com a pele por muito tempo (Chasin; Cardoso, 2003).

A absorção pulmonar é maior que a absorção gastrintestinal e a taxa de absorção é dependente de fatores como a especiação química do metal, tamanho e solubilidade da partícula. A absorção gastrintestinal é influenciada pelo tipo de dieta e pelos estados nutricionais. Em média 5% do total introduzido no organismo são absorvidos em homens e 10% ou mais em mulheres. Um fator que pode

contribuir para a maior absorção de cádmio em mulheres é a deficiência em ferro. A exposição oral é uma via de grande importância uma vez que o cádmio se bioacumula na cadeia alimentar. A deficiência de ferro e cálcio e, o consumo de gorduras ou proteína na dieta pode contribuir para uma maior absorção de cádmio e severidade dos sintomas causados pela intoxicação por esse metal (Chasin; Cardoso, 2003; CDC, 2012).

Distribuição

Independente da via de exposição o cádmio é distribuído pelo organismo e se deposita principalmente no fígado e rins. Além desses órgãos, o pâncreas e as vértebras também concentram o cádmio. No rim a meia vida biológica do cádmio varia entre 10 e 30 anos (Nordberg et al., 2007; Chasin; Cardoso, 2003; Akerstrom et al., 2013).

Cerca de 80% a 90% de todo o cádmio presente no organismo estão ligados à metalotioneína (proteína rica em cisteína, de baixo peso molecular com vários sítios tióis de ligação, capaz de se ligar a até sete átomos do metal por molécula, em vários tecidos; importante nos processos de detoxificação); esta ligação imobiliza o metal tornando-o desta forma menos biodisponível, o que protege os órgãos da ação tóxica do metal (Chasin; Cardoso, 2003).

O cádmio no sangue ocorre principalmente nos eritrócitos; no plasma as concentrações são bastante baixas; no leite humano os níveis de cádmio

correspondem de 5 a 10% dos níveis encontrados no sangue (Chasin; Cardoso, 2003; ATSDR, 2008).

Eliminação

A excreção se dá igualmente pela urina e fezes e ocorre de forma lenta. Níveis de cádmio urinário representam a carga corpórea do metal, com excreção de aproximadamente 0,01% dessa carga. A meia vida biológica do cádmio é longa. No sangue a meia vida biológica em humanos é de cerca de 100 dias, para o componente de rápida excreção e, de 7 a 16 anos, para o compartimento lento (Nordberg et al., 2007; ATSDR, 2008). Assim, a concentração de cádmio no sangue pode ser um indicador útil para exposição recente (Nordberg et al., 2007; Akerstrom et al., 2013).

Efeitos à saúde humana decorrentes da exposição ambiental ao cádmio

O cádmio pode afetar vários órgãos, mas principalmente os rins e fígado; nos rins provoca dano celular com proteinúria e decréscimo de absorção de fosfato e enzimas (Chasin; Cardoso, 2003).

O metabolismo do zinco, ferro, cobre e selênio é alterado pelo cádmio (Chasin; Cardoso, 2003).

A exposição aguda ou crônica ao cádmio está relacionada à redução de glicogênio hepático e ao aumento da glicemia (Chasin; Cardoso, 2003).

- Efeitos devido à intoxicação aguda ou de curto prazo:

Os sintomas de toxicidade aguda incluem náuseas, vômitos, diarreias e dores abdominais, que podem ser seguidos de choque em casos severos (Nordberg et al., 2007).

Inalação por exposição aguda ao cádmio causa destruição das células epiteliais do pulmão, provocando edema, traqueobronquite e pneumonite, às vezes culminando em morte (Chasin; Cardoso, 2003; Nordbeg et al., 2007).

- Efeitos devido à intoxicação crônica ou de longo prazo:

Os principais efeitos observados devido à intoxicação crônica ao cádmio incluem doença pulmonar crônica obstrutiva, enfisema, distúrbios crônicos dos túbulos renais, além de efeitos no sistema cardiovascular e esquelético. Com base em estudos realizados com animais, verificou-se que o cádmio pode provocar efeitos sobre o sistema reprodutivo causando infertilidade irreversível, diminuição da mobilidade de espermatozóides e espermatogênese, decréscimo dos teores de testosterona e alterações do ciclo reprodutivo nas fêmeas (Chasin; Cardoso, 2003; Nordberg et al., 2007).

Estudos apontam que o rim é o principal órgão que sofre os efeitos da toxicidade do cádmio após a exposição crônica. Os danos renais são caracterizados por proteinúria e uma diminuição nas taxas de filtração glomerular. Um dos primeiros sinais dos efeitos tóxicos do cádmio nos rins é a disfunção

tubular caracterizada por um aumento na excreção urinária de proteínas de baixo peso molecular ou, aumento nos níveis urinários de enzimas intracelulares. Em níveis altos de exposição há aumento dos níveis urinários de proteínas de alto peso molecular, como albuminas (ATSDR, 2008; Nordberg; Nordberg, 2002).

Para a agência de proteção ambiental americana (EPA) o cádmio foi classificado como provável carcinógeno humano (Grupo B1), por inalação. Já o programa nacional de toxicologia americano (NTP) classificou-o como carcinogênico e a agência nacional de pesquisa de câncer (IARC) classificou o cádmio como agente carcinogênico (Grupo 1), que comprovadamente provoca o aparecimento de câncer tanto em animais quanto em humanos (Chasin; Cardoso, 2003).

Embora resultados de estudos realizados em humanos sejam inconsistentes, há indícios que o cádmio afete também o sistema imunológico (Chasin; Cardoso, 2003).

4.2.3 Toxicidade do mercúrio

Ocorrência e usos

O mercúrio ocorre naturalmente na crosta terrestre, principalmente sob a forma do minério cinábrio (HgS). É encontrado na forma elementar e, também sob a forma de vários compostos mercuriais inorgânicos e orgânicos (ATSDR, 1999; Berlin et al., 2007; WHO, 2007). Os compostos de mercúrio inorgânico são formados quando o mercúrio se combina com elementos como o cloro, flúor,

bromo, iodo, enxofre, oxigênio, selênio, hidrogênio e telúrio ou com nitrato. Os compostos organomercuriais tem o mercúrio ligado a radicais orgânicos, geralmente radicais alquila, fenila e metoxietila e ânions (como nitratos, cloretos e sulfatos). Estas formas químicas se inter convertem no meio ambiente e, o contato com qualquer dos tipos de mercúrio pode produzir toxicidade sistêmica (WHO, 1992). Dentre as várias formas de mercúrio orgânico encontradas, o metilmercúrio é a mais importante e a mais tóxica; esta também é a forma química predominantemente encontrada nos alimentos de origem marinha.

O mercúrio pode entrar e se acumular na cadeia alimentar sob a forma de metilmercúrio. Metilmercúrio, uma forma de mercúrio orgânico, produzido a partir do mercúrio inorgânico pela atividade microbiológica, de significância para a saúde pública, pode se bioacumular ao longo da cadeia alimentar terrestre e aquática (CDC, 2012; Järup, 2003).

As emissões de mercúrio devido às fontes naturais são provenientes da desgaseificação da crosta terrestre, emissões de vulcões e evaporação de corpos aquáticos. Com relação à liberação do mercúrio no meio ambiente devido aos fatores antropogênicos pode-se citar o uso na mineração do ouro, queima de combustíveis fósseis, incineração de lixo, disposição de rejeitos de processos metalúrgicos e atividades industriais (UNEP, 2013).

A forma química do mercúrio influencia drasticamente o seu transporte no meio ambiente. No ar o mercúrio encontra-se principalmente na forma de vapor de mercúrio elementar, contudo metilmercúrio também pode ser encontrado. O vapor de mercúrio apresenta grande capacidade de dispersão já que seu tempo médio

de residência na atmosfera é estimado entre quatro meses e quatro anos. A fração do mercúrio associada às partículas em suspensão no ar geralmente é inferior a 4% (Azevedo et al., 2003).

Devido às atividades antropogênicas, uma parcela significativa de mercúrio atinge os sistemas aquáticos e parte desta retorna à atmosfera, tornando-se uma fonte importante de mercúrio atmosférico (Azevedo et al., 2003).

Os sedimentos de rios, lagos e mar, contaminados com mercúrio, são perigosos, pois o metal pode ser passível de metilação por muitos anos, formando mono e dimetilmercúrio, que são as espécies mais tóxicas do mercúrio (Azevedo et al., 2003).

A distribuição do mercúrio no solo é afetada pelo pH, drenagem e tipo de solo, potencial de óxido-redução, entre outros fatores. A mobilidade do mercúrio para as camadas mais profundas do solo é pequena e depende de sua redução por processos químicos, microorganismos, plantas ou da transformação em compostos de mercúrio voláteis. A lixiviação e a erosão de solos são responsáveis pelo transporte do metal do compartimento solo para a água e o sedimento (Azevedo et al., 2003).

O mercúrio se bioacumula em plantas aquáticas, invertebrados, peixes e mamíferos. Quanto maior o nível trófico, maiores as concentrações desse metal. Os peixes absorvem o mercúrio com facilidade e o acumulam em seus tecidos, principalmente na forma de metilmercúrio. A eliminação do metilmercúrio de organismos aquáticos e em peixes é lenta, podendo levar meses ou anos (Berlin et al., 2007).

A ingestão de alimentos e água contaminada com metilmercúrio é a principal via de exposição humana a este composto (Berlin et al., 2007).

O mercúrio é utilizado na produção do cloro e soda cáustica, em amálgamas dentários, interruptores elétricos, baterias domésticas, lâmpadas fluorescentes, tratamento de minérios de ouro e prata, refino de metais e componentes eletrônicos, entre outros (CDC, 2012). Os compostos mercuriais também são utilizados em formulações farmacêuticas, principalmente como conservantes de soluções nasais, oftálmicas, vacinas e produtos injetáveis, porém esses produtos contendo mercúrio estão sendo substituídos por outros que não contêm esse elemento e que são mais eficazes (WHO, 2007; WHO; UNEP, 2008).

Na população em geral a concentração de mercúrio total no sangue pode ser influenciada pelos hábitos alimentares principalmente devido à ingestão das formas orgânicas; por exemplo, peixes são a principal fonte de metilmercúrio. Os níveis de mercúrio total no sangue aumentam com o maior consumo de peixes, porém isso não ocorre na urina, uma vez que o metilmercúrio é pouco excretado através dos rins (CDC, 2012). A excreção urinária reflete a exposição ao mercúrio inorgânico. Outra forma de exposição da população geral ao mercúrio deve-se aos amálgamas dentários, que em geral são responsáveis por pequeno, mas significativo aumento nos níveis de mercúrio no sangue e urina (ATSDR, 1999; Nuttall, 2004).

A exposição das crianças e dos fetos ao mercúrio se dá por intermédio da mãe exposta ao metal durante a gravidez e amamentação, uma vez que o mercúrio cruza a placenta e pode ser encontrado no leite materno (USEPA, 1997).

A concentração de mercúrio no sangue é principalmente influenciada pela exposição recente ao metilmercúrio (CDC, 2012; Kim et al., 2013).

Toxicocinética

Absorção

A toxicidade do mercúrio é dependente da forma química sob a qual o metal se apresenta e à espécie do organismo que está sendo exposta. Exposição ao mercúrio elementar e compostos orgânicos de mercúrio provocam efeitos tóxicos ao sistema nervoso central. Já as formas inorgânicas monovalentes e bivalentes do mercúrio acometem o rim (ATSDR, 1999).

O mercúrio e seus compostos podem causar efeitos nocivos à saúde tanto no caso de exposição aguda quanto crônica. O metal interfere com grupos sulfidrilas presentes em proteínas e sistemas enzimáticos em diferentes tecidos e órgãos (Azevedo et al., 2003).

O mercúrio metálico é preferencialmente absorvido pelos pulmões. Aproximadamente 80% do vapor de mercúrio inalado é retido no corpo; o vapor dissolvido acumula-se nas células vermelhas do sangue e em seguida é transportado para todos os tecidos (Nuttall, 2004). Já por via oral, a absorção do mercúrio metálico é desprezível, enquanto que o metilmercúrio apresenta alta absorção no trato gastrointestinal, próximo de 95% (CDC, 2012). A absorção do mercúrio metálico por via cutânea é moderada, e pode causar um aumento significativo nos níveis biológicos do metal (Azevedo et al., 2003).

Distribuição

Os principais sítios de deposição do mercúrio são os rins e o cérebro após exposição ao vapor de mercúrio metálico, rins após exposição aos sais inorgânicos de mercúrio e, cérebro após exposição aos compostos organomercuriais (Lauwerys; Hoet, 2001).

A distribuição do metilmercúrio pelo organismo é lenta, levando aproximadamente cinco dias até atingir o equilíbrio (Azevedo et al., 2003; Berlin et al., 2007).

Eliminação

Os compostos de mercúrio são eliminados pelas fezes, urina e, pelas glândulas salivares, lacrimais e sudoríparas. A velocidade de excreção está associada à espécie e é dose-dependente. Assim, quando a exposição é alta a principal via de eliminação é a urinária. O mercúrio urinário consiste principalmente de mercúrio inorgânico, enquanto que o mercúrio orgânico é praticamente excretado pelas fezes. Os poucos dados na literatura sugerem uma meia vida biológica de cerca de 60 dias. Parte do mercúrio armazenado no cérebro é excretada de forma lenta, com meia vida superior a um ano (Azevedo et al., 2003; Berlin et al., 2007). A meia vida do mercúrio inorgânico no sangue varia entre uma a três semanas, podendo se estender no caso de exposição ocupacional crônica (CDC, 2012).

Efeitos à saúde humana decorrentes da exposição ambiental ao mercúrio

Independente da forma química do mercúrio todos os compostos do metal provocam efeitos tóxicos à saúde do homem. A extensão dos efeitos adversos é devida à forma do mercúrio, à duração e à via de exposição.

A toxicologia das diferentes formas do mercúrio é atribuída principalmente às interações de ligação entre os íons mercúrio e os grupos sulfidrilas presentes em proteínas e sistemas enzimáticos em diversos tecidos e órgãos, causando a inativação dessas enzimas e interferindo no metabolismo e na função celular (Azevedo et al., 2003; Berlin et al., 2007).

Tanto as intoxicações agudas envolvendo exposição a altas concentrações de mercúrio quanto as intoxicações crônicas induzem ao aparecimento de efeitos nocivos nos sistemas nervoso, respiratório e renal. No sistema nervoso os sintomas incluem tremores nas mãos e em outras partes do corpo, instabilidade emocional, sonolência, alucinações, perda de memória, cefaléia, tendência suicida, fraqueza muscular, reflexos lentos e perda de sensibilidade. Quanto ao sistema respiratório os sintomas vão desde febre e fadiga até edema pulmonar, escarros sanguinolentos, dispnéia (respiração curta), pneumonia química e dores torácicas. Outras manifestações incluem gosto metálico na boca, mau hálito e gengivite (Azevedo et al., 2003).

A ingestão de compostos de mercúrio inorgânicos produz efeitos inflamatórios, vesicular e necrótico. A mucosa estomacal é afetada causando dor gástrica e vômitos. A reação intestinal aos sais mercúricos é de diarreia grave e

sanguinolenta, podendo levar à morte em poucas horas devido ao colapso circulatório (Azevedo et al., 2003).

Com relação aos efeitos tóxicos devido ao mercúrio contido em amálgamas dentários, estudos mostram resultados controversos e a maioria das evidências não suporta que cause toxicidade (Eyeson et al., 2010; Nuttall, 2004).

A literatura relata uma redução da concentração urinária de mercúrio pelo consumo de bebidas alcoólicas (Nuttall, 2004).

Nos casos de intoxicação crônica os rins não são tão acometidos, porém a exposição prolongada a baixas concentrações de sais de mercúrio ou de vapores de mercúrio metálico podem provocar nefropatia (Azevedo et al., 2003).

As toxicidades do metilmercúrio e do etilmercúrio devem-se à completa absorção destes compostos pelo trato gastrointestinal e pela sua eliminação lenta; sua ação tóxica é dependente do nível de concentração e do tempo de exposição. O órgão alvo da ação tóxica desses compostos é o sistema nervoso central, causando danos cerebrais. As manifestações da intoxicação podem surgir em algumas semanas ou meses após a exposição. Nas intoxicações severas os sintomas são irreversíveis e pode ocorrer paralisia e morte. Os danos neurológicos levam a alterações visuais (como redução do campo visual e cegueira), alterações do olfato e paladar, distúrbios emocionais, tremores musculares, perturbações do movimento e, no caso de crianças que foram expostas à ação do metilmercúrio ainda no útero da mãe, pode ocorrer retardo no desenvolvimento motor e psicológico (ATSDR, 1999).

4.2.4 Toxicologia do níquel

Ocorrência e usos

Na crosta terrestre a concentração média do níquel é de 0,0086%. No meio ambiente este metal é encontrado combinado com o enxofre e o oxigênio, constituindo minérios de sulfeto ou óxido. Também é encontrado nos meteoritos e no solo de oceanos (Klein; Costa, 2007; ATSDR, 2005).

O níquel é liberado para a atmosfera durante o processo de mineração ou por atividades industriais que fazem uso dele e de seus compostos, como por exemplo, queima de óleo combustível ou carvão, incineração de lixo, produção de aço e outras ligas de níquel. As emissões naturais do metal são devidas às erupções vulcânicas e poeira (Sutherland; Costa, 2002; Oliveira, 2003; ATSDR, 2005).

Na atmosfera o níquel encontra-se na forma de poeira ou aerossóis, em concentrações variadas dependendo do tipo da fonte. O transporte e a distribuição do níquel entre os diferentes compartimentos ambientais é função do tamanho da partícula e das condições meteorológicas. Partículas de tamanhos grandes depositam-se próximas à fonte de emissão, enquanto que as partículas menores permanecem na atmosfera por longo tempo e percorrem longas distâncias (Oliveira, 2003; ATSDR, 2005).

Na água de rios o níquel apresenta-se precipitado a matéria orgânica e nos lagos o níquel encontra-se na forma iônica associada com material orgânico (Oliveira, 2003; ATSDR, 2005).

O níquel encontrado no solo é resultante da deposição do metal devido às emissões provenientes do refino do metal e pela disposição final do lodo utilizado como fertilizante. Fatores como pH e tipo de matéria orgânica influenciam a retenção ou a liberação do níquel no solo (Oliveira, 2003; ATSDR, 2005).

As plantas agregam o níquel a partir do solo pelas raízes. A quantidade absorvida pela planta depende do tipo e pH do solo, umidade e conteúdo de matéria orgânica (Oliveira, 2003).

O níquel não é acumulado em quantidades significativas por organismos aquáticos (Oliveira, 2003; ATSDR, 2005).

Compostos de níquel de interesse incluem os óxidos, hidróxidos, sulfatos, cloretos e carbonilas. A carbonila de níquel é o único composto do metal que pode provocar intoxicação aguda por inalação (Oliveira, 2003).

O uso primário de níquel consiste na fabricação de ligas utilizadas em encanamentos, equipamentos para petroquímica e marinha, bombas, eletrodos para solda, motor de turbina, revestimento de talheres e contatos elétricos. Também é utilizado em galvanoplastia, cerâmica, pigmentos, baterias e como catalisador. Usos não industriais incluem: moedas, bijuterias (anéis, correntes, brincos, braceletes), relógios, armação de óculos, botões de roupas, utensílios domésticos. Outras fontes de exposição ao níquel incluem as próteses, implantes, pinos intraósseos, válvulas cardíacas e as próteses dentárias (Oliveira, 2003; Klein; Costa, 2007).

A população em geral está exposta a baixos níveis de níquel pelo ar, água e alimentos. Exposição também pode ocorrer pelo fumo. A literatura relata uma

alta concentração de níquel em cigarros e fumos, dependendo de seu tipo e origem (Klein; Costa, 2007).

Uma grande porção da população está exposta ao níquel devido ao contato com objetos feitos à base deste metal, causando alergias e dermatites, sendo considerada a principal via de exposição ao homem. Devido a essas ocorrências, a União Européia limitou o conteúdo de níquel em objetos e utensílios utilizados rotineiramente, de forma a minimizar a exposição crônica ao metal (Klein; Costa, 2007).

A ingestão de níquel pelo homem ocorre pelo consumo de produtos vegetais e animais. Legumes e vegetais, como o espinafre e a alface e, também castanhas contêm a maior concentração deste metal em comparação com outros alimentos. Outras fontes alimentares de níquel são o fermento, o amendoim, o cacau em pó e bebidas ácidas. Estima-se uma ingestão total de níquel de cerca de 200 a 300 ug por dia, embora a ingestão oral do metal devido às lixiviações a partir de utensílios de cozinha e encanamentos de água superem a concentração de 1 mg por dia (Rojas et al., 1999; Oliveira, 2003).

Toxicocinética

Absorção

O níquel inalado é absorvido principalmente nos pulmões. A deposição no trato respiratório é dependente do tamanho das partículas; as partículas solúveis depositadas podem ser eliminadas de forma rápida, enquanto que as insolúveis

demoram de 20 a 30 horas para serem eliminadas. A taxa de absorção na corrente sanguínea varia entre 20% a 35% do níquel depositado nos pulmões e depende da solubilidade do composto do metal. A meia vida plasmática do níquel varia entre 20 e 34 horas. (Oliveira, 2003).

A absorção gastrintestinal de níquel a partir da ingestão de água é maior se comparada à absorção alimentar. Estudos verificaram que a absorção de níquel em indivíduos em jejum era maior do que em indivíduos que tinham acabado de se alimentar. Outros estudos mostraram que alguns constituintes de alimentos como fosfatos, ftatos, fibras e outros componentes podem se ligar ao níquel deixando-o menos disponível para absorção, em comparação ao níquel dissolvido em água. Estudos também sugerem que uma adequada ingestão de ferro pode limitar a absorção de níquel (Klein; Costa, 2007; Oliveira, 2003; Sutherland; Costa, 2002).

Estudos em tecidos humanos revelaram significativa correlação entre a idade e o aumento dos níveis de níquel nos tecidos, refletindo o acúmulo do metal devido à exposição por fontes ambientais (Oliveira, 2003).

Distribuição

Com relação à distribuição do níquel no organismo não há especificamente um órgão de acumulação, porém estudos mostram as maiores concentrações no esqueleto, fígado, rim e glândula pituitária e, no caso de exposições em longo prazo o pulmão é o órgão de acúmulo (Oliveira, 2003).

A excreção do níquel se dá primariamente na urina, seguida pela excreção via saliva e suor, tanto para o ser humano quanto para os animais. Os compostos de níquel ingeridos e não absorvidos são excretados pelas fezes (Sunderman Junior, 1993). Dados da literatura reportam que a meia vida de excreção urinária do níquel varia entre 17 e 39 horas (Klein; Costa, 2007). A eliminação via bile de compostos do metal não absorvidos também pode ser significativa em humanos (Oliveira, 2003).

Efeitos à saúde humana decorrentes da exposição ambiental ao níquel

A exposição ao níquel induz resposta imune, resultando em dermatite de contato. Os íons níquel em contato com a superfície de pele penetram na epiderme e, combinando-se com as proteínas produzem um antígeno (Oliveira, 2003).

Efeitos genotóxicos estão associados com a exposição ao níquel e, em estudos realizados foi observado que este metal é capaz de cruzar a placenta tanto em animais quanto em seres humanos, podendo provocar embriotoxicidade e teratogenicidade. A exposição ao níquel também afeta o sistema imunológico, uma vez que a exposição induz resposta imune, resultando em dermatite (Oliveira, 2003).

Outros efeitos associados à exposição ao níquel são a nefrotoxicidade e alterações hormonais (Oliveira, 2003).

A intoxicação por carbonila de níquel afeta o cérebro e os pulmões e pode causar dor de cabeça, vertigens, náuseas e vômitos como sintomas iniciais, evoluindo para dores no peito, tosse seca, dispnéia (respiração curta), fraqueza, entre outros, até delírios, na fase terminal (Oliveira, 2003).

5 MÉTODOS

5.1 Período e desenho do estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal, com a determinação de chumbo, cádmio, mercúrio e níquel no sangue de crianças (com idades entre 6 e 13 anos) e adultos (com idades entre 14 e 70 anos) “sadios”, residentes no município de São Paulo. A amostragem foi feita por meio de coleta domiciliar em 2008.

5.2 Tamanho da amostra e população de estudo

O tamanho da amostra neste estudo foi determinado levando em consideração o objetivo do projeto FAPESP, de derivar valores de referência para vários metais de relevância toxicológica (Pb, Hg, As, Cd, Al, Mn, Ni, Pt, Pd, Rh), em sangue de adultos e crianças do município de São Paulo.

Apesar das recomendações da IFCC estabelecerem o número mínimo de 120 observações para obter estimativas confiáveis para determinação de valores de referência, para o presente estudo definiu-se o tamanho da amostra em 500

adultos e 500 crianças, uma vez que o objetivo era a determinação de VR para vários metais para os quais não se conhecia a variabilidade de seus níveis no sangue de população não exposta. Além, disso os diferentes estratos etários seriam ainda estratificados segundo diferentes variáveis.

Posteriormente verificou-se que este valor estimado foi adequado, pois outro estudo realizado no Brasil com o objetivo de derivar valores de referência para chumbo, cádmio e mercúrio em doadores de sangue (Kuno, 2009) estimou tamanho de amostra de número similar ao presente estudo.

A equipe de investigação procedeu à entrevista preliminar para selecionar os indivíduos que não apresentassem risco de contato a concentrações excessivas das substâncias (metais pesados) em estudo, devido ao uso de medicamentos, trabalho ou lazer. Para as pessoas elegíveis procedeu-se à aplicação de questionário seguida da coleta de sangue. Os procedimentos foram realizados após consentimento por escrito dos entrevistados.

5.3 Trabalho de campo

A amostragem foi realizada pela empresa contratada por licitação, Margarete Harrison de Santis Dominguez-ME. Para o trabalho de campo a empresa contratada dispunha de pessoal especializado para o preenchimento do questionário, coleta e transporte das amostras. O trabalho de campo foi composto por uma equipe de quatro entrevistadores e dois coletores. Os entrevistadores

tinham curso superior, enquanto os coletores eram técnicos de enfermagem com experiência comprovada em coleta de sangue.

O trabalho de campo era realizado de três a quatro vezes por semana.

A equipe visitava os domicílios sorteados, e aplicava um questionário para identificar os indivíduos que atendiam os critérios de inclusão e exclusão. O participante do estudo, isto é, aquele indivíduo que preenchesse o critério de elegibilidade era informado sobre os objetivos do projeto e de sua importância para a saúde pública; após as explicações fornecidas a cada um dos entrevistados ou seus responsáveis legais era perguntado sobre o interesse em participar do estudo, esclarecendo que a participação era voluntária. Nessa oportunidade eram solicitadas as assinaturas do termo de consentimento e também era solicitada autorização para a coleta de amostra (sangue).

A partir do momento em que o participante passava a ser incluído na amostra, era aplicado questionário onde foram coletados dados pessoais e condições socioeconômicas. Em seguida eram colhidas amostras de sangue. As amostras eram mantidas em caixas de isopor com gelo reciclável, a fim de manter as amostras refrigeradas até o retorno ao laboratório, que era entregue sempre no mesmo dia da coleta, inclusive nos finais de semana.

A equipe contratada também era responsável pela digitação dos dados do questionário no banco de dados e posteriormente fez a revisão.

Caso o indivíduo não preenchesse o critério de elegibilidade, ele era desconsiderado e um novo indivíduo era entrevistado até completar o número amostral previsto.

Os questionários para a coleta dos dados e o termo de consentimento elaborados são apresentados nos anexos I, II, III e IV. Foi realizada divulgação da pesquisa junto à imprensa e treinamento dos técnicos que realizaram o trabalho de campo.

Amostras de sangue foram coletadas por venopunctura no antebraço por pessoal especializado, com agulhas e tubos a vácuo próprios para análise de elementos traço.

5.4 Critérios de inclusão e exclusão

Com o objetivo de propor valores de referência para metais em sangue de indivíduos sadios, os seguintes critérios foram estabelecidos para selecionar os potenciais participantes:

- Critérios de inclusão: crianças “sadias”, em idade escolar (6 a 13 anos) e, adultos “sadios” de 14 a 70 anos, de ambos os gêneros.
- Critérios de exclusão: presença de história de uso de droga, uso crônico de medicamentos, diabetes mellitus, alcoolismo crônico, hipertensão arterial e doenças hepáticas, renais, urológicas e endócrinas, história de ocupação atual ou passada

relacionada com exposição aos metais em investigação, atividade não profissional ou artesanal envolvendo manipulação de um ou mais dos metais a serem pesquisados, e moradia em área reconhecida como contaminada geologicamente ou por fonte antropogênica por um dos metais em questão.

O critério utilizado para incluir o morador no estudo foi baseado nas respostas do questionário (de inclusão e exclusão), as quais deveriam ser todas “não”.

O questionário para inclusão e exclusão que foi aplicado neste estudo é apresentado no anexo I.

5.4.1 Questionários utilizados

Os questionários foram estruturados contendo perguntas sobre dados pessoais: data de nascimento, gênero, raça, tempo de residência, endereço, atividade profissional, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, uso de medicamentos ou suplementos polivitamínicos nos últimos trinta dias, tipo preferencial de dieta (carne bovina, frango, peixes e frutos do mar) e condições socioeconômicas (anexos II e III).

Essas informações foram incluídas no questionário, pois a literatura relata que a distribuição dos níveis dos diversos elementos no sangue pode variar com determinadas variáveis como: faixa etária, gênero, hábitos alimentares e outras.

5.5 Plano de amostragem

Os cálculos para a definição da amostragem foram baseados nos dados do censo do IBGE de 2000.

A amostragem foi probabilística e o procedimento usado para a amostragem foi o de conglomerados em dois estágios. A primeira etapa consistiu na seleção das unidades primárias de amostragem (UPAs), constituídas pelos setores censitários do IBGE. A segunda etapa consistiu na seleção das unidades secundárias de amostragem (USAs), constituídas pelos domicílios em cada UPA (selecionada na primeira etapa). A amostra foi constituída por 60 setores censitários (UPAs) e 26 domicílios em cada setor censitário.

- Seleção das UPAs:

Para a seleção das UPAs, todos os setores censitários do município de São Paulo foram ordenados de acordo com os 96 distritos administrativos da cidade e com a renda média familiar. Os setores censitários assim ordenados foram avaliados em relação ao número de domicílios particulares registrados no censo de 2000 do IBGE. Quando esse número de domicílios era superior ou inferior a dois desvios-padrão da média de domicílios por setor, o setor era então dividido ou agregado a outro para constituir uma UPA. Obteve-se ao final uma listagem constituída por 60 UPAs.

Todas as UPAs selecionadas na primeira etapa foram visitadas para a realização de contagem rápida dos domicílios para atualização. Após essa atualização, foram sorteados os 26 domicílios em cada UPA.

- Cálculo para obter o número de domicílios a serem visitados por setor (UPA):
- dividiu-se o número de domicílios particulares registrados no censo de 2000 (2.863.149 domicílios) pela população da faixa etária de 7 e 13 anos residentes na cidade de São Paulo (1.259.786 pessoas nesta faixa etária, segundo dados do IBGE no censo 2000) para obtenção da proporção de crianças por residência nesta faixa de idade;
- multiplicou-se a proporção obtida (no passo anterior) ao tamanho de amostra (neste caso, 500) e acrescentou-se 1/3 para compensar as perdas;
- o número calculado de domicílios a serem visitados (obtido no passo anterior) foi dividido pelo número de UPAs (neste caso esse número foi 60), obtendo-se o número de domicílios a serem visitados por UPA, que neste caso foi 26.
- Sorteio dos domicílios que foram visitados em cada UPA:

Para sortear os 26 domicílios que foram visitados nas UPAs foi aplicada a amostragem sistemática com probabilidade proporcional ao tamanho da UPA, como descrito a seguir:

- primeiramente, calculou-se o intervalo amostral, dividindo-se o número de domicílios de cada setor censitário (UPA) por 26, que era o número de domicílios que seriam visitados por setor (UPA);
- sorteou-se um número entre “1” e o intervalo amostral (obtido no passo anterior); esse número seria o primeiro domicílio a ser visitado (valor do início casual);
- somou-se o valor do início casual ao valor do intervalo amostral, obtendo-se um número, o valor acumulado, que correspondeu ao próximo domicílio sorteado;
- somou-se o valor acumulado ao valor do intervalo amostral, obtendo-se outro número, que correspondeu ao próximo domicílio sorteado. Esse passo foi repetido até completar 26 domicílios a serem visitados em cada UPA (setor censitário).

Todos os domicílios selecionados no sorteio foram visitados e quando os moradores preenchiam os critérios de inclusão, eram convidados a participar do estudo e então, entrevistados. Após o preenchimento de questionário sobre dados pessoais e assinatura do termo de consentimento era solicitada uma amostra de sangue. Esse processo foi repetido até a obtenção do tamanho de amostra previsto.

O uso da amostragem por conglomerados em vários estágios é adequado para estudos de inquéritos populacionais uma vez que é indicada nos casos de: não se possuir uma lista contendo as identificações de todos os elementos da população; existir heterogeneidade entre os indivíduos da população; quando é preciso fazer entrevistas ou observações em grandes áreas geográficas ou quando o custo de obtenção dos dados cresce com o aumento da distância entre os indivíduos (Guedes, 2014).

5.6 Aspectos éticos

Os procedimentos do estudo respeitaram os procedimentos éticos da Declaração de Helsinque e da Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos que exige aprovação do projeto por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucionalmente formalizado e que incorpore um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a ser assinado pelos participantes da pesquisa. Seguindo as normas de realização de pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição, tendo sido aprovado (Anexo V).

Todos participaram de forma voluntária após serem informados e esclarecidos verbalmente e por escrito sobre os objetivos do trabalho, sobre os riscos envolvidos nos procedimentos de coleta, e sobre a confidencialidade dos resultados, assinando termo de consentimento livre e esclarecido.

5.7 Método analítico

A necessidade de determinação de elementos em concentrações em níveis reduzidos, como no caso do estabelecimento de valores de referência em indivíduos expostos ambientalmente a esses elementos, tem levado à utilização de técnicas analíticas cada vez mais potentes com relação à sensibilidade e capacidade simultânea de quantificação de uma série de elementos. Assim, a

espectrometria de massa com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-MS) mostrou ser bastante adequada e foi escolhida para esta finalidade. O princípio desta técnica é descrita a seguir.

5.7.1 Princípio da técnica analítica espectrometria de massa com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-MS)

A espectrometria de massa é uma técnica analítica instrumental de alta sensibilidade, que possibilita a determinação simultânea de vários elementos e baseia-se na separação de espécies iônicas, produzidas a partir de elementos presentes em uma amostra, de acordo com a razão a massa/carga dessas espécies.

A espectrometria de massa tem sido usada para a determinação de constituintes inorgânicos e orgânicos, com aplicações em diferentes áreas como ambiental, clínica e geológica.

Na espectrometria de massa é necessário que ocorram os processos de atomização completa (após a volatilização) e ionização, para propiciar a análise multielementar da amostra. No caso da espectrometria de massa aplicada à química orgânica, as moléculas no sistema de fonte de íons são apenas fragmentadas e não completamente atomizadas e ionizadas. Os íons fragmentados obtidos e os perfis de fragmentação são utilizados para a determinação estrutural da molécula (Becker JS, 2007).

O espectrômetro de massa é constituído basicamente por três partes: um sistema de fonte de íons, o analisador de massas e o detector (Becker, 2007).

Existem diversas fontes de energia para promover a atomização e a ionização e dentre essas, o plasma produzido por acoplamento indutivo é uma fonte particularmente interessante, que devido à alta temperatura produz íons elementares inorgânicos de forma eficiente. O plasma indutivamente acoplado é o utilizado em espectrômetros de massa e consiste de um gás ionizado contendo elétrons livres, íons, átomos e moléculas (Thomas, 2004).

O plasma de argônio tem energia suficiente (15,7 eV) para dessolvatar e ionizar os elementos em solução. Muitos elementos atingem o potencial de ionização em mais de 90%, com exceção de alguns semi metais e halogênios (Giné-Rosias, 1999; Hill, 2005; Linge; Jarvis, 2009).

O plasma é formado numa tocha de quartzo, que consiste de três tubos concêntricos através dos quais ocorre o transporte do gás argônio. O fluxo de gás externo evita o superaquecimento, protegendo as paredes da tocha. O fluxo de gás auxiliar introduzido no tubo intermediário é utilizado para estabilizar o plasma durante a introdução da amostra. O fluxo interno de gás (conhecido como gás de arraste ou gás nebulizador) é responsável pelo transporte da solução da amostra para o plasma. O gás argônio é direcionado através da tocha, rodeada por uma bobina de cobre conectada a um gerador de rádio frequência (de 27,12 MHz ou 40,68 MHz). Quando uma potência de rádio frequência (geralmente 700 a 1500 watts) é aplicada, campos elétricos e magnéticos oscilantes são formados no topo da tocha. O plasma então é formado quando uma faísca é aplicada no gás argônio

para produzir elétrons, que são acelerados pelos campos elétricos e magnéticos, em movimentos circulares fechados, com energia suficiente para ionizar o gás argônio. Esse processo é conhecido como acoplamento indutivo e por isso o plasma formado é chamado de plasma indutivamente acoplado. Colisões sucessivas entre os elétrons e os átomos neutros de argônio provocam novas ionizações e o plasma se torna auto-sustentável. Esse processo de colisão é responsável pela geração das altas temperaturas no plasma. Parte da energia do plasma é então transferida para excitar e ionizar o analito permitindo a excitação do elemento e a formação de íons (Giné-Rosias, 1999; Hill, 2005; Montaser et al., 1998).

A forma convencional de introdução da amostra no plasma é a líquida e um sistema típico de introdução de amostra consiste de um nebulizador, que forma um aerossol fino. As gotas vindas do nebulizador são separadas (as maiores são desprezadas) por uma câmara de nebulização. O aerossol é então, transportado para o plasma pelo fluxo do gás nebulizador, onde rapidamente sofre os processos de dessolvatação, vaporização, atomização e ionização. Esses processos ocorrem prontamente, pois no plasma a temperatura pode variar entre 6000 e 10000 K, dependendo da região do plasma (Hill, 2005; Montaser et al., 1998).

Assim, depois da introdução da amostra no plasma, mantido a pressão atmosférica, uma parcela dos íons produzidos é admitida no espectrômetro de massa através de uma interface composta por dois cones, entre os quais há vácuo ($\leq 0,1$ kPa). Em seguida, o feixe de íons entra numa região de alto vácuo (0,001

Pa) e é direcionado através de lentes eletromagnéticas até o analisador de massa. Nas lentes as partículas neutras são eliminadas pelas bombas de vácuo. Os íons são então separados no analisador de massa de acordo com sua razão massa/carga. O analisador de massa mais comumente usado é do tipo quadrupolo (Giné-Rosias, 1999; Linge; Jarvis, 2009; Thomas, 2004).

O analisador de massa quadrupolar é composto por dois pares de cilindros, paralelos e equidistantes, aos quais são aplicadas diferenças de potencial alternadas e contínuas, de modo que num dos pares o potencial elétrico combinado seja positivo e no outro negativo, com igual amplitude. Os íons positivos de massa m ao entrarem no quadrupolo são atraídos com força proporcional à sua carga e à intensidade do campo elétrico, adquirindo movimento acelerado para o cilindro de potencial negativo. Ao selecionar uma combinação de potenciais (alternado e contínuo) apropriados, apenas íons com razão massa/carga específica com o campo elétrico oscilante serão capazes de percorrer todo o quadrupolo e alcançar o detector (Linge; Jarvis, 2009; Cotta, 2010).

5.7.1.1 Interferências em ICP-MS

As interferências em ICP-MS podem ser divididas em duas categorias: espectrais e não espectrais.

A interferência não espectral ocorre quando o transporte da amostra, a eficiência de produção de íons no plasma, a extração ou a condução dos íons

para o analisador de massa causam variação no sinal. Isso é provocado pelo efeito da matriz da amostra. Sais dissolvidos nas amostras ou o alto teor de sólidos dissolvidos, provenientes da decomposição incompleta da matéria orgânica podem obstruir o orifício do cone afetando a amostragem dos íons. Esse problema pode ser corrigido através de técnicas de calibração, tais como padronização interna, adição de padrão e diluição isotópica. No caso da padronização interna, a correção só é possível se o padrão e o analito sofrerem os mesmos efeitos, isto é o padrão interno e o analito devem possuir massa e potencial de ionização próximos (Giné-Rosias, 1999; Thomas, 2004). A técnica de diluição isotópica, baseada na adição de uma quantidade conhecida de um dos isótopos do analito também pode ser utilizada para superar os problemas de interferência de matriz, já que o padrão adicionado tem as mesmas características do analito.

Em ICP-MS com analisador de massa tipo quadrupolo as sobreposições dos sinais espectrais ocorrem quando as razões m/z dos íons diferem em menos de uma unidade de massa atômica (u.m.a.).

As interferências espectrais compreendem as interferências isobáricas, poliatômicas e as de carga dupla.

A interferência isobárica é aquela causada por sobreposição de sinais de isótopos de diferentes elementos com a mesma m/z nominal. Um exemplo dessa interferência é a sobreposição espectral dos nuclídeos ^{112}Cd (24,1% de abundância) e ^{112}Sn (1% abundância). No caso da m/z 112, se os dois elementos estiverem presentes na amostra nas mesmas concentrações, 4,1% do sinal

derivará do estanho e 95,9% derivará do cádmio. Este tipo de interferência pode ser contornado escolhendo outro isótopo, que seja livre de sobreposição isobárica, desde que haja outro isótopo disponível (Giné-Rosias, 1999; Linge; Jarvis, 2009; Nunes, 2009).

Interferências de íons de carga dupla ocorrem com elementos de baixo potencial da segunda ionização. O elemento se ioniza duas vezes formando um íon de carga dupla (+2) e assim seu espectro aparecerá com metade da massa esperada, podendo gerar perda de sinal e interferência com outros elementos. Este problema pode ser controlado aumentando a vazão do gás carregador e/ou diminuindo a potência da rádio frequência (Giné-Rosias, 1999; Linge; Jarvis, 2009; Nunes, 2009).

A interferência por íons poliatômicos ocorre quando espécies presentes no plasma (provenientes do argônio, atmosfera circundante, solvente ou da amostra) reagem entre si, formando um novo íon, de mesma razão massa/carga do íon em estudo. Como os íons poliatômicos são formados por combinações de elementos com massa igual ou inferior a 40 unidades de massa atômica (u.m.a.), as interferências são encontradas no espectro de massas abaixo de 84 u.m.a. Exemplos de interferências poliatômicas são: $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$ interferindo na determinação de ^{63}Cu ou $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ interferindo sobre ^{75}As . Uma alternativa para diminuir este tipo de interferência seria utilizar um ICP-MS de alta resolução ou então utilizar celas de colisão (CC) ou celas de reação dinâmica (DRC). O uso do DRC promove a reação íon-molécula entre o gás reativo e as espécies do feixe de íons. Os compostos poliatômicos sofrem transferência de íons e geram compostos

que não interferem na análise (Giné-Rosias, 1999). Na cela de colisão um gás inerte é utilizado e a eliminação das interferências se dá pela discriminação feita com base nas diferenças de energia cinética entre interferentes poliatômicos e íons dos analitos (Linge; Jarvis, 2009; Cotta, 2010).

A redução de interferentes pode ser obtida pela combinação da diluição da amostra, uso de nebulizadores especiais, baixas taxas de aspiração da amostra, uso de equações matemáticas de correção e escolha apropriada do isótopo a ser monitorado (Thomas, 2004).

5.7.2 Análise dos metais em sangue

Determinação de chumbo, cádmio, mercúrio e níquel

A determinação dos elementos foi realizada utilizando-se um espectrômetro de massa com plasma de argônio acoplado indutivamente, ICP-MS (Perkin Elmer, modelo Elan DRC II) equipado com auto-amostrador (Perkin Elmer, modelo AS-93 plus). Todas as amostras de sangue foram analisadas no laboratório de contaminantes inorgânicos do Instituto Adolfo Lutz. Os parâmetros de operação do equipamento foram: potência de rádio frequência de 1400 W, vazão de argônio de 15 L.min⁻¹, nebulizador Meinhard com fluxo de nebulização de 0,98 L.min⁻¹ e câmara ciclônica. Modo de varredura: peak hopping. Foram efetuadas três leituras por amostra, 16 varreduras com tempo de parada de 15 ms. Como padrão interno

foram utilizadas soluções multielementares de ^{74}Ge , ^{187}Re , ^{115}In e ^{45}Sc , na concentração de 5 ug.L^{-1} . A calibração do equipamento foi feita pelo método de adição de padrão com soluções multielementares preparadas a partir de soluções padrão monoelementares (SpexCertiPrep e Certipur Merck). A preparação das soluções-padrão foram feitas em sala limpa ISO classe 7 com fluxo laminar ISO classe 5 e, as leituras das amostras foram realizadas em sala limpa ISO classe 7. Os isótopos medidos foram: ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb , ^{114}Cd , ^{202}Hg e ^{60}Ni ; para chumbo a concentração na curva de calibração variou entre 1 e 20 ug.L^{-1} , para cádmio variou de 0,5 a 10 ug.L^{-1} ; para Hg a concentração variou entre 0,2 e 4 ug.L^{-1} ; para níquel a concentração na curva de calibração variou entre 2 e 40 ug.L^{-1} .

A metodologia utilizada foi validada. Os parâmetros de desempenho são descritos a seguir: os limites de quantificação obtidos para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel foram 0,99; 0,11; 0,04 e $0,37 \text{ ug.L}^{-1}$, respectivamente. Os coeficientes de variação (CV%) obtidos no mesmo dia variaram entre 1,4% e 2,5%, dependendo do elemento e os coeficientes de variação entre dias variaram entre 2,8% e 5,4%, dependendo do elemento. A linearidade da faixa de trabalho foi verificada obtendo-se coeficiente de correlação de 0,99 para todos os isótopos. A exatidão do método foi verificada pela % recuperação de padrões adicionados pela impossibilidade de se ter materiais de referência certificados para os elementos estudados durante o processo de validação do método. As porcentagens de recuperação variaram entre 98,1% e 108,0%, dependendo do elemento.

5.8 Tratamento dos dados

Os dados do questionário foram introduzidos em um banco de dados através do software EpiData pela empresa prestadora de serviços contratada para coleta de amostras biológicas.

Resultados analíticos e dados dos questionários obtidos foram processados em banco de dados do Microsoft Excel e transportados para o programa estatístico SAS para a realização dos cálculos.

Para descrever a população estudada foram consideradas as seguintes variáveis: gênero, faixa etária, área de moradia, escolaridade, etnia, hábito de fumar, hábitos de dieta (consumo de vísceras e miúdos, pescado, frutos do mar, carne, frango e bebida alcoólica) e, renda familiar.

5.9 Análise Estatística

5.9.1 Teste de normalidade

Antes de aplicar os métodos de inferência estatística os dados da amostra foram submetidos ao teste de normalidade para verificar se a distribuição assumiria uma forma simétrica ou não. Para isso foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov.

5.9.2 Análise univariada

Para verificar a relação entre as variáveis dependentes e as independentes inicialmente procedeu-se à análise univariada por meio do teste de Mann-Whitney (quando as variáveis envolviam a comparação de dois grupos) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (no caso da comparação ser feita para três ou mais grupos de cada variável).

A análise de regressão univariada envolveu as variáveis dependentes (concentrações de chumbo, cádmio, mercúrio e níquel no sangue) e as variáveis independentes (gênero, faixa etária, escolaridade, etnia, frequência de consumo de peixes, frutos do mar, vísceras e miúdos, carne e frango, frequência de consumo de bebida alcoólica (destilados, vinho e cerveja), área de moradia, renda familiar).

5.9.3 Análise multivariada

Para a avaliação conjunta dos possíveis fatores associados com as variáveis “resposta” (concentração para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel no sangue) foi ajustado modelo linear generalizado (MLG) e aplicado o teste de Wald para avaliar a significância estatística. A distribuição que produziu o melhor ajuste para o níquel foi pela normal, enquanto que para os demais elementos (chumbo, cádmio e mercúrio) o melhor ajuste foi pela gama.

Entraram nessa análise somente as variáveis independentes que apresentaram na análise univariada relação com as variáveis dependentes a um nível de significância menor ou igual a 20%, permanecendo nos modelos as variáveis estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Modelos lineares generalizados

Muitas vezes necessita-se estudar o comportamento de uma variável resposta em relação a uma ou mais variáveis independentes. As variáveis independentes, também chamadas de preditoras ou explicativas, são responsáveis por explicar a variabilidade da variável resposta ou dependente. Para esses casos, técnicas de modelagem são utilizadas, nas quais se incluem os modelos de regressão.

O modelo de regressão clássico foi desenvolvido considerando que a variável resposta tivesse uma distribuição normal. Muitas variáveis resposta, porém não seguem este tipo de distribuição. Neste caso é adequado utilizar os modelos lineares generalizados (MLG), que constituem uma extensão dos modelos de regressão linear clássico, admitindo-se uma distribuição não normal para a variável resposta ou que não tenham uma constância na variância (Montenegro, 2009).

Para formular um modelo linear generalizado é necessário escolher:

- uma distribuição de probabilidade para a variável resposta, que deve pertencer à família exponencial de distribuições (normal, binomial, Poisson, gama, gaussiana inversa, entre outras);
- as variáveis preditoras, que podem ser quantitativas e/ou qualitativas;
- uma função de ligação que irá relacionar as componentes aleatória (refere-se à variável resposta) e sistemática (combinação linear de variáveis preditoras) do modelo.

A modelagem do MLG é baseada no uso da máxima verossimilhança para a estimação dos parâmetros do modelo.

A escolha da distribuição no modelo depende usualmente da natureza dos dados (discreta, contínua) e de seu intervalo de variação (conjunto dos valores reais, reais positivos ou outro tipo de intervalo). Por exemplo, as distribuições gama e normal inversa são associadas a dados contínuos assimétricos e com intervalos de variação positivos. Já para dados que apresentam simetria com intervalo de variação sendo o conjunto dos valores reais, a distribuição normal deve ser escolhida.

5.10 Estabelecimento de valores de referência para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel em sangue

O estabelecimento do valor de referência foi feito considerando o limite superior do intervalo de confiança a 95% do percentil 95 (P95) da distribuição dos valores obtidos para cada metal.

Neste estudo foram adotadas as recomendações da IFCC para o estabelecimento de valores de referência. Essas recomendações baseiam-se nas seguintes etapas: definição dos analitos, do método analítico utilizado, coleta de dados, estatística aplicada, e estratificações realizadas.

- **definição dos analitos para os quais está se derivando os valores de referência:** os elementos metálicos (chumbo, cádmio, mercúrio e níquel) foram selecionados pelo fato de serem poluentes ambientais de grande relevância toxicológica e que oferecem preocupação à saúde humana por causar efeitos adversos à saúde.

- **definição do método analítico utilizado:** a espectrometria de massa com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-MS) foi escolhida em virtude de ser uma técnica bastante sensível, que possibilita a quantificação de elementos em baixas concentrações, sendo por isso adequada ao estabelecimento de valores de referência em indivíduos expostos ambientalmente.

- **coleta de dados:** informações sobre as características do grupo para o qual foi feita a derivação de valores de referência como o número de indivíduos envolvidos na derivação, idade e gênero, entre outras foram colhidas e são apresentadas no item 6.1.

- **definição da estatística aplicada na derivação dos valores de referência:**

neste estudo foi utilizado o limite superior do intervalo de confiança a 95% para o percentil 95 da distribuição dos valores obtidos para os elementos metálicos. O uso do limite superior da distribuição dos valores pode ser mais apropriado para avaliação de situação com suspeita de exposição aumentada a um determinado poluente.

- **estratificação do grupo de amostra:** neste estudo para a derivação de valores de referência foram levadas em consideração variáveis, que poderiam contribuir para o aumento ou diminuição nas concentrações dos metais em sangue.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 População estudada

Inicialmente foram arroladas 578 crianças que preenchiam os critérios de elegibilidade, porém 39 crianças não concordaram em fornecer amostra de sangue para análise e uma amostra não foi analisada por estar coagulada. A amostra final ficou constituída por 538 crianças. Da mesma forma, para os adultos inicialmente foram arrolados 826 participantes e, destes, 37 participantes se recusaram a fornecer amostra para análise e 3 amostras não foram analisadas por estarem coaguladas, restando ao final 786 amostras válidas.

Assim, a população de estudo foi composta por 1324 indivíduos de ambos os gêneros, sendo 786 adultos (14 a 70 anos) e 538 crianças (6 a 13 anos), amostradas das zonas centro, norte, sul, leste e oeste do município de São Paulo.

A amostra estratificada por faixa etária foi composta de 391 indivíduos com idades entre 6 a 11 anos (29,5%), 264 pessoas com idades entre 12 a 19 anos (20,0%) e 669 pessoas com idades superiores a 20 anos (50,5%).

As análises estatísticas foram realizadas na população final constituída por 1324 amostras. No entanto, houve falta de informação com relação a alguns quesitos do questionário e por isso algumas tabelas apresentam uma quantidade de dados inferior ao total de amostras.

As características gerais da população estudada segundo faixa etária, nível de escolaridade, renda familiar e ramo de atividade, por gênero são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – População estudada, segundo faixa etária, nível de escolaridade, renda familiar e ramo de atividade, por gênero

Variável	Gênero				Total	
	Masculino		Feminino			
	n	%	n	%	n	%
Faixa etária						
11 anos ou menos	207	34,9	184	25,2	391	29,5
12 a 19 anos	123	20,7	141	19,3	264	19,9
20 anos ou mais	263	44,4	406	55,5	669	50,5
Escolaridade						
Analfabeto	3	0,7	4	0,7	7	0,7
Fundamental	299	70,9	361	59,9	660	64,4
Médio	87	20,6	189	31,3	276	26,9
Superior	33	7,8	49	8,1	82	8,0
Renda familiar						
Até 1 sm	54	10,0	80	12,1	134	11,1
1 a 3 sm	333	61,4	400	60,4	733	60,9
3 a 5 sm	80	14,8	105	15,9	185	15,4
5 a 10 sm	53	9,8	59	8,9	112	9,3
mais de 10 sm	22	4,1	18	2,7	40	3,3
Ramo de atividade						
Indústria	33	7,9	36	7,3	69	7,6
Comércio	36	8,6	62	12,6	98	10,8
Serviços	349	83,5	395	80,1	744	81,7

sm: salário mínimo (1 salário = R\$ 380,00)

A maioria da população estudada foi constituída por mulheres (em torno de 55%), as quais possuíam nível de instrução mais alto em relação aos homens. Além disso, pode-se observar pela tabela 1 que a maior parte da população relatou trabalhar no setor de serviços.

6.2 Resultados de chumbo, cádmio, mercúrio e níquel em sangue

Para as concentrações de cádmio e níquel que ficaram abaixo do limite de quantificação do método, o valor correspondente à metade desse limite foi adotado para proceder às análises estatísticas.

Verificação da normalidade

Antes de aplicar os métodos de inferência estatística os dados da amostra foram submetidos ao teste de normalidade para verificar se a distribuição assumiria uma distribuição Gaussiana ou não. Observou-se uma distribuição assimétrica para todos os elementos analisados (figura 2). Dessa forma foram feitas transformações dos dados utilizando-se logaritmos, raiz quadrada e raiz cúbica. Mesmo assim, a distribuição dos dados não se aproximou de uma gaussiana (gráficos não apresentados). Sendo assim, os dados para todos os elementos estudados foram tratados por meio de estatística não paramétrica para derivação de valores de referência.

Figura 2 – Gráfico dos quantis da distribuição normal versus concentrações de níquel (a), cádmio (b), chumbo (c) e mercúrio (d) no sangue da população estudada.

Associação das concentrações de chumbo, cádmio, mercúrio e níquel em sangue com as variáveis independentes

Para identificar os possíveis fatores (área de moradia, consumo de vísceras e miúdos, peixe, frutos do mar, carne, frango, consumo de bebida alcoólica (destilados, vinho, cerveja), escolaridade, hábito de fumar, idade, ramo de atividade de trabalho, renda familiar, gênero e etnia), que apresentavam

associação com as concentrações dos metais em sangue procedeu-se inicialmente à análise univariada, por meio do teste de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis. Esses fatores foram estratificados segundo os grupos identificados no quadro 1.

Os resultados dos testes estatísticos mostraram que as variáveis que apresentaram associação significativa (considerando $p \leq 0,20$) para níquel em sangue foram: área de moradia, consumo de vísceras e miúdos, peixe, frutos do mar, carne e frango, idade e renda familiar. As variáveis que foram significativas para cádmio em sangue foram: área de moradia, consumo de frutos do mar, consumo de bebida alcoólica (destilados, vinho e cerveja), escolaridade, hábito de fumar, idade, ramo de atividade e gênero. Já para chumbo em sangue as variáveis que apresentaram associação significativa foram: área de moradia, consumo de vísceras e miúdos, consumo de bebida alcoólica (destilados, vinho e cerveja), escolaridade, hábito de fumar, idade, ramo de atividade e gênero. Para mercúrio em sangue, as variáveis que se mostraram significantes foram: área de moradia, consumo de vísceras e miúdos, peixe, frutos do mar, consumo de bebida alcoólica (destilados, vinho e cerveja), escolaridade, hábito de fumar, idade, ramo de atividade, renda familiar e gênero. Para melhor visualização dos resultados obtidos, no quadro 1 é apresentado um resumo com as variáveis que se mostraram associadas com as concentrações dos metais em sangue.

Pela análise univariada, área de moradia e idade foram os fatores que apresentaram associação significativa com as concentrações de todos os elementos metálicos estudados (níquel, chumbo, cádmio e mercúrio) em sangue.

A variável etnia foi estratificada em 5 grupos: branca, negra, amarela, morena e indígena, e não apresentou associação significativa com as concentrações de níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue.

Quadro 1: Variáveis independentes que apresentaram associação significativa com as concentrações de níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue, na análise univariada (teste de Mann-Whitney ou teste de Kruskal-Wallis).

Variáveis	Elementos				Grupos estratificados para as variáveis
	Ni	Cd	Pb	Hg	
área de moradia *	X	X	X	X	Norte, sul, leste, oeste e centro
consumo de vísceras e miúdos *	X		X	X	5 vezes ou mais por semana e, até 3 vezes por mês
consumo de peixe *	X			X	5 vezes ou mais por semana e, até 3 vezes por mês
consumo de frutos do mar *	X	X		X	5 vezes ou mais por semana e, até 3 vezes por mês
consumo de carne **	X				5 vezes ou mais por semana, 1 a 4 vezes por semana e, até 3 vezes por mês
consumo de frango **	X				5 vezes ou mais por semana, 1 a 4 vezes por semana e, até 3 vezes por mês
consumo de destilados *		X	X	X	pelo menos 1 vez por semana e, até 3 vezes por mês
consumo de vinho *		X	X	X	pelo menos 1 vez por semana e, até 3 vezes por mês
consumo de cerveja *		X	X	X	pelo menos 1 vez por semana e, até 3 vezes por mês
escolaridade **		X	X	X	analfabeto, fundamental, médio e superior
gênero *		X	X	X	feminino e masculino
hábito de fumar **		X	X	X	fumante, não fumante e ex-fumante
idade **	X	X	X	X	6 a 11 anos, 12 a 19 anos e mais de 20 anos
ramo de atividade *		X	X	X	indústria, comércio e serviço
renda familiar *	X			X	até 1 salário mínimo, de 1 a 3 salários, de 3 a 5 salários, de 5 a 10 salários, mais de 10 salários

* Teste de Kruskal-Wallis

** Teste de Mann-Whitney

Após a identificação dos fatores que apresentavam associação com as concentrações dos metais em sangue na análise univariada, prosseguiu-se à análise multivariada para avaliação conjunta desses fatores com as concentrações dos metais estudados no sangue. Para esta análise foram incluídas todas as variáveis explicativas que apresentaram associação com os níveis de metais na análise univariada com probabilidade menor ou igual a 20% ($p \leq 0,20$).

O modelo multivariado ajustado indicou que os melhores preditores da variação na concentração de níquel em sangue foram: faixa etária, consumo de vísceras e miúdos, consumo de peixe e frango.

Na tabela 2 são apresentadas as estatísticas relativas ao ajuste do modelo linear generalizado para o níquel. Podemos observar um aumento estatisticamente significativo de praticamente 1 ug/L na concentração de níquel em sangue, para aqueles que consomem mais vísceras e miúdos, e peixe. Também se observa um aumento significativo de 0,23 ug/L na concentração de níquel em sangue para os que consomem frango de 1 a 4 vezes por semana. Os mais jovens apresentam concentração de níquel em sangue significativamente mais alta em relação aos adultos com idade superior a 20 anos.

Tabela 2: Resultado do ajuste do modelo linear generalizado entre as variáveis explicativas e a concentração de níquel em sangue

Fator	Coeficiente	Erro padrão	IC (95%) Wald		p
			Inferior	Superior	
Vísceras e miúdos					
5 vezes ou mais/semana	0,99	0,07	0,84	1,13	<0,001
Até 3 vezes/mês	Ref.				
Peixe					
Pelo menos 1 vez/semana	0,99	0,04	0,90	1,07	<0,001
Até 3 vezes/mês	Ref.				
Frango					
5 vezes ou mais/semana	0,14	0,07	0,00	0,29	0,057
1 a 4 vezes/semana	0,23	0,07	0,09	0,37	0,001
Até 3 vezes/mês	Ref.				
Faixa etária					
11 anos ou menos	0,10	0,04	0,02	0,19	0,015
12 a 19 anos	0,20	0,05	0,11	0,30	<0,001
20 anos ou mais	Ref.				

Quanto ao cádmio os melhores preditores obtidos com o modelo multivariado ajustado foram: faixa etária, gênero, hábito de fumar e consumo de bebida alcoólica destilada (tabela 3). Pode-se observar pela tabela 3 que crianças menores de 11 anos apresentaram concentração de cádmio em sangue praticamente 0,1 ug/L menor que a concentração encontrada em adultos com mais de 20 anos, enquanto os indivíduos com idades entre 12 e 19 anos apresentam concentração média de 0,04 ug/L superior aos indivíduos com mais de 20 anos. Os homens apresentam concentração de cádmio no sangue mais alta em relação às mulheres. Fumantes apresentam concentração de cádmio significativamente maior em comparação aos ex-fumantes. Pelo modelo multivariado, a concentração de cádmio no sangue é praticamente 0,1 ug/L menor para os indivíduos que consomem bebida destilada pelo menos uma vez por semana em relação aos que consomem destilados até três vezes por mês.

Tabela 3: Resultado do ajuste do modelo linear generalizado entre as variáveis explicativas e a concentração de cádmio em sangue

Fator	Coeficiente	Erro padrão	IC (95%) Wald		p
			Inferior	Superior	
Faixa etária					
11 anos ou menos	-0,073	0,006	-0,085	-0,062	<0,001
12 a 19 anos	0,036	0,009	0,019	0,054	<0,001
20 anos ou mais	Ref.				
Gênero					
Masculino	0,025	0,004	0,017	0,033	<0,001
Feminino	Ref.				
Hábito de fumar					
Fumante	0,137	0,034	0,070	0,205	<0,001
Não fumante	-0,156	0,022	-0,200	-0,112	<0,001
Ex-fumante	Ref.				
Destilados					
Pelo menos 1 vez/semana	-0,048	0,019	-0,085	-0,010	0,013
Até 3 vezes/mês	Ref.				

Para o chumbo as variáveis que permaneceram no modelo multivariado ajustado foram: área de moradia, gênero, hábito de fumar e consumo de vísceras e miúdos (tabela 4). Com relação à área de moradia, o resultado do ajuste do modelo mostrou que na região centro a concentração média de chumbo em sangue é 2,3 ug/L superior à concentração de chumbo encontrada na região sul. Homens apresentaram concentração de chumbo em sangue 1,6 ug/L mais alta que a concentração encontrada em mulheres. Fumantes apresentaram concentração de chumbo em sangue 7 ug/L superior em relação aos ex-fumantes. Indivíduos que consomem vísceras e miúdos cinco vezes ou mais por semana apresentam concentração de chumbo em sangue 1,6 ug/L superior em comparação com aqueles que têm uma frequência de consumo de até três vezes por mês.

Tabela 4: Resultado do ajuste do modelo linear generalizado entre as variáveis explicativas e a concentração de chumbo em sangue

Fator	Coeficiente	Erro padrão	IC (95%) Wald		p
			Inferior	Superior	
Área de moradia					
Norte	0,27	0,40	-0,51	1,06	0,495
Centro	2,31	1,10	0,15	4,47	0,036
Leste	-0,50	0,33	-1,14	0,14	0,125
Oeste	1,12	0,85	-0,54	2,78	0,186
Sul	Ref.				
Gênero					
Masculino	1,57	0,30	0,99	2,15	<0,001
Feminino	Ref.				
Hábito de fumar					
Fumante	7,30	0,89	5,55	9,05	<0,001
Não fumante	-0,90	0,60	-2,07	0,27	0,131
Ex-fumante	Ref.				
Vísceras e miúdos					
5 vezes ou mais/semana	1,55	0,59	0,39	2,72	0,009
Até 3 vezes/mês	Ref.				

Na tabela 5 são apresentadas as estatísticas relativas ao modelo multivariado ajustado para o mercúrio. Os resultados do ajuste mostram que os fatores que apresentaram associação significativa com a concentração de mercúrio em sangue foram: faixa etária, consumo de vísceras e miúdos e consumo de peixe. Podemos observar que os mais jovens apresentam concentração de mercúrio no sangue significativamente menor que os adultos com idade superior a 20 anos. Aqueles que têm uma frequência de consumo maior de vísceras e miúdos e, peixes apresentam uma concentração de mercúrio significativamente mais alta com relação àqueles que consomem esses produtos (vísceras e miúdos e peixes) com frequência de até três vezes por mês.

Tabela 5: Resultado do ajuste do modelo linear generalizado entre as variáveis explicativas e a concentração de mercúrio em sangue

Fator	Coeficiente	Erro padrão	IC (95%) Wald		p
			Inferior	Superior	
Faixa etária					
11 anos ou menos	-0,515	0,044	-0,601	-0,430	<0,001
12 a 19 anos	-0,330	0,050	-0,428	-0,232	<0,001
20 anos ou mais	Ref.				
Vísceras e miúdos					
5 vezes ou mais/semana	0,153	0,074	0,008	0,299	0,039
Até 3 vezes/mês	Ref.				
Peixe					
Pelo menos 1 vez/semana	0,391	0,053	0,287	0,495	<0,001
Até 3 vezes/mês	Ref.				

Nas figuras 3 a 6 são apresentados os resíduos obtidos para os modelos propostos para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio, respectivamente. O gráfico de resíduos deviance padronizado sem nenhuma tendência é um indicativo de que o modelo proposto para os dados é satisfatório. Portanto, podemos observar pelos

gráficos de resíduos que o ajuste do modelo foi adequado para todos os elementos metálicos estudados.

Figura 3: Resíduos deviance padronizado gerado para verificar o ajuste do modelo multivariado para níquel em sangue.

Figura 4: Resíduos deviance padronizado gerado para verificar o ajuste do modelo multivariado para cádmio em sangue.

Figura 5: Resíduos deviance padronizado gerado para verificar o ajuste do modelo multivariado para chumbo em sangue.

Figura 6: Resíduos deviance padronizado gerado para verificar o ajuste do modelo multivariado para mercúrio em sangue.

Foi realizado o teste de correlação de Spearman para verificar a correlação entre os níveis de níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue e a idade. Os seguintes resultados foram obtidos: a idade apresentou uma correlação negativa quase nula com a concentração de níquel, porém não significativa ($r = -0,039$, $p = 0,155$); no entanto, a idade apresentou uma correlação positiva significativa com os demais elementos: cádmio ($r = 0,550$, $p < 0,001$), chumbo ($r = 0,273$, $p < 0,001$) e mercúrio ($r = 0,505$, $p < 0,001$). Na análise multivariada a variável idade não apresentou associação com a concentração de chumbo no sangue. No entanto, muitos estudos apontam haver uma associação com essa variável. Pelo teste de Spearman verificamos que no caso do chumbo existe uma fraca correlação entre idade e os níveis desse metal no sangue, enquanto para cádmio e mercúrio a associação foi bem mais forte.

Para verificar a correlação entre os metais estudados também foi aplicado o teste de correlação de Spearman. Obtiveram-se as seguintes correlações entre os elementos metálicos estudados: chumbo apresentou correlação positiva com o cádmio ($r = 0,377$, $p < 0,001$); mercúrio apresentou correlação positiva com todos os elementos: níquel ($r = 0,204$, $p < 0,001$), cádmio ($r = 0,277$, $p < 0,001$) e chumbo ($r = 0,187$, $p < 0,001$) (Tabela 6). Pode-se observar que a correlação entre chumbo e cádmio é relativamente forte, enquanto que a correlação entre mercúrio e níquel, mercúrio e cádmio e mercúrio e chumbo são um pouco mais fracas, porém todas estatisticamente significantes.

Tabela 6: Resultado do teste de correlação de Spearman para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue.

Teste de Correlação de Spearman				
Correlação		Ni	Cd	Pb
Cd	r	0,002		
	p	0,941		
	N	1324		
Pb	r	-0,021	0,377	
	p	0,445	<0,001	
	N	1324	1324	
Hg	r	0,204	0,277	0,187
	p	<0,001	<0,001	<0,001
	N	1324	1324	1324

6.3 Valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue

Para o estabelecimento de valores de referência optou-se por considerar o limite superior do intervalo de confiança a 95% para o percentil 95 da distribuição dos dados obtidos para cada metal.

Valores de referência foram derivados para gênero, faixa etária, hábito de fumar, consumo de peixe e, também para gênero e faixa etária simultaneamente. A derivação dos valores de referência foi feita levando-se em consideração variáveis que poderiam contribuir para o aumento ou diminuição nas concentrações de metais em sangue. Além disso, muitos estudos estabeleceram seus valores de referência segundo essas mesmas variáveis; a expressão dos valores de referência sob uma mesma forma possibilita a adequada comparação entre valores de referência estabelecidos em diferentes estudos.

Nas tabelas 7 a 10 são apresentados os valores de referência derivados para os metais em sangue estratificados por gênero, faixa etária, hábito de fumar, consumo de peixe, e por gênero e faixa etária concomitantemente. São apresentados também os percentis 5, 10, 50, 90, 95, média aritmética e geométrica e intervalo de confiança a 95% para o percentil 95.

Para variáveis como consumo de vísceras e miúdos, frutos do mar, frango e carne, consumo de bebida alcoólica (destilados, vinho e cerveja) não foram propostos valores de referência, porém são apresentadas tabelas com resultados de percentis (5, 10, 50, 90 e 95), média aritmética e geométrica para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue (tabelas 11 a 17).

Nas tabelas 24 a 31 são apresentados valores de referência e concentrações para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel em sangue, obtidos de estudos de biomonitorizações realizados em diferentes países, para comparação com os valores de referência estabelecidos neste estudo para adultos e crianças.

Na tabela 7 são apresentados concentrações e valores de referência propostos para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue, estratificados segundo o gênero. No caso do níquel, os valores de referência derivados para homens e mulheres foram praticamente iguais; no entanto, para cádmio e chumbo em sangue os valores de referência estabelecidos neste estudo foram maiores para homens; no caso do mercúrio o valor de referência proposto para as mulheres foi superior ao valor derivado para os homens.

Tabela 7 – Percentis, médias e valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total, derivados segundo o gênero (em $\mu\text{g/L}$)

Elemento	Gênero	N	P5	P10	P50	P90	P95	IC 95% para o P95	VR	MA	MG
Níquel	Masc.	593	0,6	0,9	1,9	3,0	3,3	3,2-3,4	3,4	1,9	1,7
	Fem.	731	0,6	0,9	1,9	3,0	3,4	3,3-3,5	3,5	1,9	1,7
Cádmio	Masc.	593	0,06	0,06	0,17	0,41	0,50	0,46-0,57	0,57	0,20	0,15
	Fem.	731	0,06	0,06	0,13	0,37	0,47	0,44-0,51	0,51	0,17	0,13
Chumbo	Masc.	593	13,1	15,2	19,0	26,7	30,5	28,9-32,8	32,8	19,8	19,1
	Fem.	731	11,4	13,2	18,2	21,6	24,5	23,2-27,8	27,8	18,1	17,6
Mercúrio	Masc.	593	0,2	0,3	0,8	1,7	2,1	2,0-2,3	2,3	0,9	0,8
	Fem.	731	0,3	0,4	0,9	1,8	2,3	2,1-2,5	2,5	1,0	0,8

VR = valor de referência = limite superior do intervalo de confiança a 95% para o P95 P: percentil
 IC 95%: intervalo de confiança a 95% MA: média aritmética MG: média geométrica

Na tabela 8 são apresentados concentrações e valores de referência propostos para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue, estratificados segundo a faixa etária. Podemos verificar que para o níquel o valor de referência proposto para os indivíduos com idades acima de 20 anos é ligeiramente inferior aos valores derivados para os indivíduos das demais faixas etárias. No caso do cádmio, o valor de referência proposto para crianças abaixo de 11 anos é inferior aos valores derivados para os mais velhos. Para chumbo e mercúrio, o valor de referência aumenta com a idade; o valor de referência derivado para os indivíduos acima de 20 anos foi superior ao valor derivado para as demais faixas etárias. No caso do mercúrio, o valor de referência derivado para crianças correspondeu à metade do valor derivado para adultos acima de 20 anos.

Tabela 8 – Percentis, médias e valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total, derivados segundo a faixa etária (em µg/L)

Elemento	Faixa etária	N	P5	P10	P50	P90	P95	IC 95% para o P95	VR	MA	MG
Níquel	Até 11 anos	393	0,7	0,9	1,9	3,0	3,3	3,2 - 3,5	3,5	2,0	1,8
	12 a 19 anos	264	0,9	1,0	2,0	2,9	3,2	3,0 - 3,5	3,5	2,0	1,8
	+ 20 anos	666	0,5	0,7	1,9	3,1	3,4	3,3 - 3,4	3,4	1,9	1,7
Cádmio	Até 11 anos	393	0,06	0,06	0,06	0,11	0,18	0,13 - 0,22	0,22	0,08	0,07
	12 a 19 anos	264	0,06	0,06	0,19	0,40	0,48	0,45 - 0,62	0,62	0,21	0,17
	+ 20 anos	666	0,06	0,06	0,21	0,45	0,55	0,50 - 0,58	0,58	0,24	0,19
Chumbo	Até 11 anos	393	11,2	13,1	16,8	23,1	26,7	25,0 - 28,9	28,9	17,7	17,1
	12 a 19 anos	264	11,5	13,9	18,0	22,9	26,6	24,5 - 30,5	30,5	18,2	17,7
	+ 20 anos	666	12,8	14,4	19,4	24,0	30,4	27,8 - 33,0	33,0	19,8	19,2
Mercúrio	Até 11 anos	393	0,20	0,22	0,53	1,2	1,4	1,3 - 1,5	1,5	0,63	0,53
	12 a 19 anos	264	0,28	0,34	0,74	1,3	1,5	1,4 - 1,7	1,7	0,79	0,69
	+ 20 anos	666	0,41	0,56	1,12	2,2	2,7	2,5 - 3,0	3,0	1,26	1,10

VR = valor de referência = limite superior do intervalo de confiança a 95% para o P95 P: percentil
 IC 95%: intervalo de confiança a 95% MA: média aritmética MG: média geométrica

Neste estudo valores de referência também foram derivados segundo o hábito de fumar (tabela 9). Essa variável foi categorizada em três grupos (fumante, não fumante e ex-fumante).

Pela tabela 9 pode-se verificar que valores de referência estabelecidos para cádmio e chumbo em sangue de fumantes foram os mais altos, seguido pelos valores derivados para o grupo de ex-fumantes e por último, pelos dos não fumantes. No caso do níquel e mercúrio, o valor de referência estabelecido para o grupo de ex-fumantes foi maior em relação aos demais grupos (fumantes e não fumantes).

Tabela 9 - Percentis, médias e valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total, derivados segundo o hábito de fumar (em µg/L)

Elemento	Hábito de fumar	N	P5	P10	P50	P90	P95	IC 95% para o P95	VR	MA	MG
Níquel	Fumante	161	0,49	0,87	1,8	2,9	3,4	3,0 - 3,7	3,7	1,9	1,7
	Não Fumante	1023	0,61	0,85	1,9	2,9	3,3	3,2 - 3,4	3,4	1,9	1,7
	Ex-Fumante	137	0,80	0,91	3,1	3,1	3,4	3,3 – 4,0	4,0	2,0	1,8
Cádmio	Fumante	161	0,24	0,27	0,44	0,62	0,68	0,64 - 0,79	0,8	0,5	0,42
	Não Fumante	1023	0,06	0,06	0,06	0,25	0,32	0,28 - 0,35	0,4	0,1	0,11
	Ex-Fumante	137	0,15	0,19	0,27	0,38	0,45	0,39 – 0,52	0,5	0,3	0,27
Chumbo	Fumante	161	20,7	20,8	22,7	36,9	44,2	37,6 – 49,7	49,7	26,6	25,6
	Não Fumante	1023	16,8	13,4	17,7	20,6	23,3	22,4 – 24,8	24,8	17,7	17,3
	Ex-Fumante	137	20,2	14,4	19,2	20,6	20,8	20,6 – 26,6	26,6	18,6	18,3
Mercúrio	Fumante	161	0,40	0,54	1,1	2,1	2,6	2,1 – 3,2	3,2	1,2	1,1
	Não Fumante	1023	0,21	0,32	0,8	1,6	2,0	1,8 – 2,2	2,2	0,9	0,7
	Ex-Fumante	137	0,41	0,56	1,2	2,2	2,6	2,2 – 3,6	3,6	1,3	1,1

VR = valor de referência = limite superior do intervalo de confiança a 95% para o P95

IC 95%: intervalo de confiança a 95%

MA: média aritmética

P: percentil

MG: média geométrica

Fatores como a dieta alimentar pode influenciar as concentrações de metais no sangue. Neste estudo valores de referência para metais em sangue também foram estabelecidos segundo o consumo de peixes.

Na tabela 10 são apresentadas as concentrações e valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue estratificados segundo o consumo de peixes. Essa variável foi categorizada em dois grupos conforme a frequência de consumo: “pelo menos uma vez por semana” e “até três vezes por mês”.

Pode-se observar que os valores de referência propostos para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue foram maiores para o grupo com maior frequência de consumo de peixes.

Tabela 10 – Percentis, médias e valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total, derivados segundo o consumo de peixes (em $\mu\text{g/L}$)

Elemento	Frequência (consumo de peixe)	N	P5	P10	P50	P90	P95	IC 95% para o P95	VR	MA	MG
Níquel	Pelo menos 1x/sem	305	1,7	1,9	2,7	3,5	3,8	3,6 – 4,0	4,0	2,7	2,7
	Até 3x/mês	1018	0,5	0,7	1,7	2,6	2,9	2,8 – 2,9	2,9	1,7	1,5
Cádmio	Pelo menos 1x/sem	305	0,06	0,06	0,13	0,45	0,50	0,45 - 0,66	0,66	0,19	0,14
	Até 3x/mês	1018	0,06	0,06	0,15	0,39	0,49	0,45 - 0,52	0,52	0,19	0,14
Chumbo	Pelo menos 1x/sem	305	14,4	15,3	19,2	28,3	30,6	28,3 – 44,2	44,2	20,1	18,4
	Até 3x/mês	1018	11,7	13,8	18,5	23,0	27,8	26,4 – 29,9	29,9	18,8	18,2
Mercúrio	Pelo menos 1x/sem	305	0,5	0,5	1,1	2,5	3,1	2,5 – 3,4	3,4	1,3	1,3
	Até 3x/mês	1018	0,2	0,3	0,9	1,7	2,1	2,0 - 2,3	2,3	1,0	0,7

VR = valor de referência = limite superior do intervalo de confiança a 95% para o P95 P: percentil
 IC 95%: intervalo de confiança a 95% MA: média aritmética MG: média geométrica

Na tabela 11 são apresentadas as concentrações obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue segundo a frequência de consumo de vísceras e miúdos. Os grupos foram divididos entre os indivíduos que consumiam vísceras pelo menos uma vez por semana e aqueles que os consumiam até três vezes por mês.

Com exceção do mercúrio, as concentrações medianas (P50) obtidas para os demais metais foram mais altas para o grupo cuja frequência de consumo de vísceras e miúdos era de pelo menos uma vez por semana.

Tabela 11 – Percentis e médias obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com o consumo de vísceras e miúdos (em µg/L)

Elemento	Frequência (consumo de vísceras/miúdos)	N	P5	P10	P50	P90	P95	MA	MG
Níquel	Pelo menos 1x/sem	86	1,9	2,1	3,2	3,8	4,0	3,1	3,0
	Até 3x/mês	1236	0,6	0,8	1,9	2,9	3,1	1,9	1,7
Cádmio	Pelo menos 1x/sem	86	0,06	0,06	0,17	0,41	0,50	0,20	0,13
	Até 3x/mês	1236	0,06	0,06	0,13	0,37	0,47	0,17	0,14
Chumbo	Pelo menos 1x/sem	86	13,1	15,2	19,0	26,7	30,5	19,8	19,5
	Até 3x/mês	1236	11,4	13,2	18,2	21,6	24,5	18,1	18,2
Mercúrio	Pelo menos 1x/sem	86	0,3	0,4	0,9	1,8	2,3	1,0	1,1
	Até 3x/mês	1236	0,2	0,3	0,8	1,7	2,1	0,9	0,8

P: percentil MA: média aritmética MG: média geométrica

Na tabela 12 são apresentadas as concentrações obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue segundo a frequência de consumo de frutos do mar. A variável foi categorizada em dois grupos, conforme a frequência de consumo: “pelo menos uma vez por semana” e “até três vezes por mês”.

Para todos os elementos metálicos estudados em sangue as medianas mais altas foram obtidas para o grupo com a maior frequência de consumo de frutos do mar.

Tabela 12 – Percentis e médias obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com o consumo de frutos do mar (em $\mu\text{g/L}$)

Elemento	Frequência (consumo de frutos do mar)	N	P5	P10	P50	P90	P95	MA	MG
Níquel	Pelo menos 1x/sem	51	1,4	1,7	2,7	3,5	3,8	2,7	2,5
	Até 3x/mês	1267	0,6	0,9	1,9	2,9	3,3	1,9	1,7
Cádmio	Pelo menos 1x/sem	51	0,06	0,06	0,21	0,45	0,55	0,23	0,17
	Até 3x/mês	1267	0,06	0,06	0,15	0,39	0,49	0,18	0,14
Chumbo	Pelo menos 1x/sem	51	11,4	13,3	19,4	25,0	30,3	19,5	18,8
	Até 3x/mês	1267	11,7	13,8	18,5	23,2	28,3	18,8	18,2
Mercúrio	Pelo menos 1x/sem	51	0,4	0,7	1,7	2,8	3,8	1,7	1,5
	Até 3x/mês	1267	0,2	0,3	0,8	1,7	2,1	1,0	0,8

P: percentil MA: média aritmética MG: média geométrica

Na tabela 13 são apresentadas as concentrações obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue, estratificadas pela frequência de consumo de carne. Essa variável foi categorizada em três grupos: consumo de pelo menos cinco vezes por semana, consumo de uma a quatro vezes por semana e consumo de até três vezes por mês.

Para mercúrio em sangue as medianas obtidas não variaram entre os grupos com diferentes frequências de consumo de carne. Para os demais elementos metálicos as medianas foram mais altas para o grupo com a maior frequência de consumo de carne.

Tabela 13 – Percentis e médias obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com consumo de carne (em µg/L)

Elemento	Frequência (consumo de carne)	N	P5	P10	P50	P90	P95	MA	MG
Níquel	Min 5x/sem	558	0,6	0,9	1,9	3,0	3,3	1,9	1,7
	1 a 4x/sem	659	0,6	0,9	2,0	3,0	3,3	2,0	1,8
	Até 3x/mês	107	0,5	0,6	1,5	3,0	3,3	1,7	1,5
Cádmio	Min 5x/sem	558	0,06	0,06	0,2	0,4	0,5	0,2	0,1
	1 a 4x/sem	659	0,06	0,06	0,1	0,4	0,5	0,2	0,1
	Até 3x/mês	107	0,06	0,06	0,1	0,4	0,5	0,2	0,1
Chumbo	Min 5x/sem	558	11,4	13,2	18,6	24,3	28,3	18,8	18,1
	1 a 4x/sem	659	12,6	14,4	18,6	23,0	28,9	19,0	18,5
	Até 3x/mês	107	11,4	13,5	17,8	22,7	25,3	18,2	17,7
Mercúrio	Min 5x/sem	558	0,2	0,3	0,9	1,7	2,2	1,0	0,8
	1 a 4x/sem	659	0,3	0,4	0,9	1,7	2,1	1,0	0,8
	Até 3x/mês	107	0,2	0,2	0,9	2,2	2,5	1,1	0,8

P: percentil

MA: média aritmética

MG: média geométrica

Na tabela 14 são apresentadas as concentrações obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue segundo a frequência de consumo de frango. Essa variável foi categorizada em três grupos: consumo de pelo menos cinco vezes por semana, consumo de uma a quatro vezes por semana e consumo de até três vezes por mês.

Para níquel e cádmio as medianas obtidas foram maiores para o grupo com a frequência maior de consumo de frango; enquanto que para chumbo e mercúrio as medianas mais altas foram obtidas para o grupo que consumia frango até três vezes por mês.

Tabela 14 – Percentis e médias obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com consumo de frango (em µg/L)

Elemento	Frequência (consumo de frango)	N	P5	P10	P50	P90	P95	MA	MG
Níquel	Min 5x/sem	473	0,6	0,9	1,9	3,1	3,4	1,9	1,7
	1 a 4x/sem	754	0,6	0,9	2,0	3,0	3,3	2,0	1,8
	Até 3x/mês	97	0,5	0,6	1,4	2,7	2,9	1,6	1,4
Cádmio	Min 5x/sem	473	0,06	0,06	0,2	0,4	0,5	0,2	0,1
	1 a 4x/sem	754	0,06	0,06	0,2	0,4	0,5	0,2	0,1
	Até 3x/mês	97	0,06	0,06	0,1	0,3	0,4	0,2	0,1
Chumbo	Min 5x/sem	473	11,4	13,4	18,4	24,2	27,8	18,7	18,1
	1 a 4x/sem	754	12,0	14,1	18,6	23,3	29,0	19,0	18,4
	Até 3x/mês	97	12,7	13,3	18,6	21,1	25,7	18,1	17,7
Mercúrio	Min 5x/sem	473	0,2	0,3	0,8	1,8	2,3	1,0	0,8
	1 a 4x/sem	754	0,3	0,4	0,9	1,7	2,1	1,0	0,8
	Até 3x/mês	97	0,2	0,3	1,0	1,9	2,5	1,1	0,8

P: percentil

MA: média aritmética

MG: média geométrica

Na tabela 15 são apresentadas as concentrações para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue segundo a frequência de consumo de bebida alcoólica destilada. A variável foi categorizada em dois grupos: consumo de pelo menos uma vez por semana e consumo de até três vezes por mês.

Para níquel, chumbo e mercúrio em sangue as medianas obtidas foram maiores para o grupo com a maior frequência de consumo de bebida alcoólica destilada. No entanto, para cádmio a mediana mais alta foi obtida para o grupo que consumia bebida destilada até três vezes por mês.

Tabela 15 – Percentis e médias para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com o consumo de bebida alcoólica destilada (em µg/L)

Elemento	Frequência (consumo de destilados)	N	P5	P10	P50	P90	P95	MA	MG
Níquel	Pelo menos 1x/sem	39	0,6	0,9	1,9	3,0	3,3	1,9	1,5
	Até 3x/mês	1285	0,1	0,1	0,3	0,6	0,6	0,3	1,7
Cádmio	Pelo menos 1x/sem	39	0,1	0,1	0,3	0,6	0,6	0,3	0,3
	Até 3x/mês	1285	0,1	0,1	0,1	0,4	0,5	0,2	0,1
Chumbo	Pelo menos 1x/sem	39	15,1	17,4	20,9	32,3	33,5	23,0	22,3
	Até 3x/mês	1285	11,7	13,8	18,4	22,9	27,8	18,7	18,1
Mercúrio	Pelo menos 1x/sem	39	0,4	0,4	1,2	2,1	2,6	1,3	1,1
	Até 3x/mês	1285	0,2	0,3	0,9	1,7	2,2	1,0	0,8

P: percentil MA: média aritmética MG: média geométrica

Na tabela 16 são apresentadas as concentrações obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue de acordo com a frequência de consumo de vinho. Essa variável foi categorizada em dois grupos: consumo de pelo menos uma vez por semana e consumo de até três vezes por mês.

Para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio as medianas mais altas foram obtidas para o grupo com a frequência maior de consumo de vinho.

Tabela 16 – Percentis e médias obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com o consumo de vinho (em $\mu\text{g/L}$)

Elemento	Frequência (consumo de vinho)	N	P5	P10	P50	P90	P95	MA	MG
Níquel	Pelo menos 1x/sem	43	0,5	0,7	2,2	3,2	3,3	2,0	1,8
	Até 3x/mês	1281	0,6	0,9	1,9	3,0	3,3	1,9	1,7
Cádmio	Pelo menos 1x/sem	43	0,06	0,1	0,2	0,5	0,6	0,3	0,2
	Até 3x/mês	1281	0,06	0,06	0,1	0,4	0,5	0,2	0,1
Chumbo	Pelo menos 1x/sem	43	15,1	16,9	19,2	28,3	33,2	21,1	20,4
	Até 3x/mês	1281	11,7	13,8	18,5	23,1	27,8	18,8	18,2
Mercúrio	Pelo menos 1x/sem	43	0,6	0,8	1,2	2,0	2,3	1,3	1,2
	Até 3x/mês	1281	0,2	0,3	0,8	1,7	2,2	1,0	0,8

P: percentil

MA: média aritmética

MG: média geométrica

A tabela 17 apresenta as concentrações obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue segundo o consumo de cerveja. A variável foi categorizada em dois grupos: consumo de pelo menos uma vez por semana e consumo de até três vezes por mês.

Com exceção do níquel as medianas mais altas foram obtidas para o grupo com a maior frequência de consumo de cerveja.

Tabela 17 – Percentis e médias obtidas para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue total da população do município de São Paulo, de acordo com o consumo de cerveja (em $\mu\text{g/L}$)

Elemento	Frequência (consumo de cerveja)	N	P5	P10	P50	P90	P95	MA	MG
Níquel	Pelo menos 1x/sem	166	0,6	0,8	1,9	3,2	3,3	2,0	1,8
	Até 3x/mês	1158	0,6	0,9	1,9	3,0	3,3	1,9	1,7
Cádmio	Pelo menos 1x/sem	166	0,06	0,1	0,3	0,5	0,6	0,3	0,3
	Até 3x/mês	1158	0,06	0,06	0,1	0,4	0,5	0,2	0,1
Chumbo	Pelo menos 1x/sem	166	14,7	16,2	20,3	28,4	32,8	21,4	20,7
	Até 3x/mês	1158	11,5	13,6	18,2	22,6	27,3	18,5	17,9
Mercúrio	Pelo menos 1x/sem	166	0,4	0,6	1,2	2,2	2,7	1,4	1,2
	Até 3x/mês	1158	0,2	0,3	0,8	1,6	2,1	0,9	0,8

P: percentil

MA: média aritmética

MG: média geométrica

A tabela 18 foi elaborada com a finalidade de facilitar a comparação dos valores de referência estabelecidos neste estudo com outros, uma vez que na literatura consultada alguns estudos relataram valores de referência por gênero e faixa etária concomitantemente.

Tabela 18 – Percentis, médias e valores de referência para níquel, cádmio, chumbo e mercúrio em sangue, derivados segundo gênero e faixa etária (em µg/L)

Elemento	Gênero	Faixa etária	N	P5	P10	P50	P90	P95	IC 95% para o P95	VR	MG
Níquel	Masc	Até 11 anos	209	0,72	0,94	1,9	3,0	3,3	3,1 – 3,6	3,6	1,7
		12 a 19 anos	123	0,90	1,00	2,1	2,9	3,2	2,9 – 3,6	3,6	2,0
		+ 20 anos	260	0,46	0,62	1,8	3,1	3,3	3,2 – 3,6	3,6	1,6
	Fem	Até 11 anos	184	0,70	0,94	2,0	3,0	3,3	3,2 – 3,6	3,6	1,8
		12 a 19 anos	141	0,76	0,98	1,9	2,9	3,3	2,9 – 3,5	3,5	1,7
		+ 20 anos	406	0,53	0,80	1,9	3,1	3,3	3,3 – 3,5	3,5	1,7
Cádmio	Masc	Até 11 anos	209	0,06	0,06	0,06	0,1	0,2	0,2 – 0,4	0,4	0,07
		12 a 19 anos	123	0,06	0,1	0,3	0,5	0,6	0,5 – 0,7	0,7	0,3
		+ 20 anos	260	0,06	0,06	0,2	0,5	0,6	0,5 – 0,6	0,6	0,2
	Fem	Até 11 anos	184	0,06	0,06	0,06	0,1	0,1	0,1 – 0,2	0,2	0,07
		12 a 19 anos	141	0,06	0,06	0,1	0,3	0,4	0,3 – 0,5	0,5	0,1
		+ 20 anos	406	0,06	0,06	0,2	0,5	0,5	0,5 – 0,6	0,6	0,2
Chumbo	Masc	Até 11 anos	209	11,6	13,3	17,0	25,4	29,4	25,8 – 32,6	32,6	17,9
		12 a 19 anos	123	13,9	14,8	18,5	26,4	29,4	26,6 – 32,0	32,0	18,7
		+ 20 anos	260	15,1	16,6	19,8	27,5	33,1	29,5 – 42,3	42,3	20,4
	Fem	Até 11 anos	184	10,1	12,0	16,5	21,7	23,2	21,8 – 26,5	26,2	16,3
		12 a 19 anos	141	11,4	11,9	17,4	20,0	22,9	20,3 – 24,5	24,5	16,8
		+ 20 anos	406	12,1	13,5	19,2	22,1	27,8	24,1 – 31,1	31,1	18,4
Mercúrio	Masc	Até 11 anos	209	0,2	0,2	0,5	1,0	1,2	1,1 – 1,5	1,5	0,5
		12 a 19 anos	123	0,3	0,4	0,8	1,3	1,6	1,4 – 1,9	1,9	0,7
		+ 20 anos	260	0,4	0,6	1,1	2,1	2,6	2,3 – 3,1	3,1	1,1
	Fem	Até 11 anos	184	0,2	0,3	0,5	1,3	1,4	1,3 – 1,6	1,6	0,6
		12 a 19 anos	141	0,3	0,3	0,7	1,3	1,4	1,3 – 1,6	1,6	0,7
		+ 20 anos	406	0,4	0,6	1,1	2,2	2,7	2,4 – 3,2	3,2	1,1

VR = valor de referência = limite superior do intervalo de confiança a 95% para o P95 P: percentil
 IC 95%: intervalo de confiança a 95% MA: média aritmética MG: média geométrica

A tabela 19 apresenta as concentrações mínima e máxima obtidas para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel em sangue. Também é apresentado o número de amostras que apresentaram concentração abaixo do limite de quantificação do método. Neste estudo empregamos a técnica de espectrometria de massa com plasma de argônio acoplado indutivamente, que é uma das técnicas analíticas mais sensíveis para análise de metais em níveis de traços e ultra-traços. Podemos observar que a técnica utilizada se mostrou bastante adequada para este estudo, uma vez que pudemos quantificar todas as amostras para chumbo e mercúrio e, praticamente todas as amostras para níquel. Para cádmio 39% das amostras estiveram abaixo do limite de quantificação do método, cujo valor foi de 0,11 µg/L. Assim, para essas amostras o valor reportado foi a metade do valor do limite de quantificação, ou seja, 0,06 µg/L. No caso do níquel duas amostras apresentaram concentração abaixo do limite de quantificação do método (0,37 µg/L); para essas amostras foi adotado o valor correspondente à metade do valor do limite de quantificação, ou seja, 0,19 µg/L.

Tabela 19 – Concentrações mínima e máxima obtidas para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel em sangue da população do município de São Paulo (em µg/L) e número de amostras com concentração abaixo do limite de quantificação do método.

Elemento	N	Valor Mínimo	Valor Máximo	N < LQ* (% do total)
Chumbo	1324	6,94	58,72	0 (0%)
Cádmio	1324	0,06	0,89	515 (39%)
Mercúrio	1324	0,04	3,98	0 (0%)
Níquel	1324	0,19	4,68	2 (0,2%)

* Resultados abaixo do limite de quantificação do método (LQ)

N: número de amostras

Nas tabelas 20 a 23 são apresentados os números de amostra cujas concentrações encontravam-se abaixo e acima do valor de referência proposto neste estudo, segundo a faixa etária e gênero. Podemos observar que para todos os elementos analisados mais de 90% das concentrações obtidas estavam abaixo do valor de referência derivado, mostrando que o valor de referência estabelecido a partir do limite superior do intervalo de confiança a 95% do valor do percentil 95, foi adequado ao propósito.

Tabela 20 – Distribuição da população de acordo com a faixa etária e o gênero em relação aos valores de referência para chumbo em sangue propostos neste estudo

Gênero	Faixa etária			Total
	6 - 11	12 - 19	+ 20	
Masculino				
N abaixo do VR Pb	203 (98,1%)	122 (99,2%)	252 (95,8%)	575 (97,0%)
N acima do VR Pb	4 (1,9%)	1 (0,8%)	11 (4,2%)	18 (3,0%)
Total	207 (100%)	123 (100%)	263 (100%)	593 (100%)
Feminino				
N abaixo do VR Pb	181 (98,4%)	139 (98,6%)	386 (95,1%)	706 (96,6%)
N acima do VR Pb	3 (1,6%)	2 (1,4%)	20 (4,9%)	25 (3,4%)
Total	184 (100%)	141 (100%)	406 (100%)	731 (100%)

VR: valor de referência

N: Número de amostras

Tabela 21 – Distribuição da população de acordo com a faixa etária e o gênero em relação aos valores de referência para cádmio em sangue propostos neste estudo

Gênero	Faixa etária			Total
	6 - 11	12 - 19	+ 20	
Masculino				
N abaixo do VR Cd	206 (99,5%)	117 (95,1%)	249 (94,7%)	572 (96,5%)
N acima do VR Cd	1 (0,5%)	6 (4,9%)	14 (5,3%)	21 (3,5%)
Total	207 (100%)	123 (100%)	263 (100%)	593 (100%)
Feminino				
N abaixo do VR Cd	184 (100%)	139 (98,6%)	385 (94,8%)	706 (96,6%)
N acima do VR Cd	0 (0%)	2 (1,4%)	21 (5,2%)	25 (3,4%)
Total	184 (100%)	141 (100%)	406 (100%)	731 (100%)

VR: valor de referência

N: número de amostras

Tabela 22 – Distribuição da população de acordo com a faixa etária e o gênero em relação aos valores de referência para mercúrio em sangue propostos neste estudo

Gênero	Faixa etária			Total
	6 - 11	12 - 19	+ 20	
Masculino				
N abaixo do VR Hg	207 (100%)	123 (100%)	244 (92,8%)	574 (96,8%)
N acima do VR Hg	0 (0%)	0 (0%)	19 (7,2%)	19 (3,2%)
Total	207 (100%)	123 (100%)	263 (100%)	593 (100%)
Feminino				
N abaixo do VR Hg	184 (100%)	141 (100%)	381 (95,1%)	706 (96,6%)
N acima do VR Hg	0 (0%)	0 (0%)	25 (4,9%)	25 (3,4%)
Total	184 (100%)	141 (100%)	406 (100%)	731 (100%)

VR: valor de referência

N: número de amostras

VR: valor de referência

N: número de amostras

Tabela 23 – Distribuição da população de acordo com a faixa etária e o gênero em relação aos valores de referência para níquel em sangue propostos neste estudo

Gênero	Faixa etária			Total
	6 - 11	12 - 19	+ 20	
Masculino				
N abaixo do VR Ni	198 (95,7%)	120 (97,6%)	257 (97,7%)	575 (97,0%)
N acima do VR Ni	9 (4,3%)	3 (2,4%)	6 (2,3%)	18 (3,0%)
Total	207 (100%)	123 (100%)	263 (100%)	593 (100%)
Feminino				
N abaixo do VR Ni	178 (96,7%)	136 (96,5%)	392 (96,6%)	706 (96,6%)
N acima do VR Ni	6 (3,3%)	5 (3,5%)	14 (3,4%)	25 (3,4%)
Total	184 (100%)	141 (100%)	406 (100%)	731 (100%)

VR: valor de referência

N: número de amostras

7 DISCUSSÃO

7.1 Valores de referência propostos para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel

Os valores de referência propostos no presente estudo foram estratificados para gênero, faixa etária, hábito de fumar, consumo de peixes e também para gênero e faixa etária simultaneamente. A razão para derivar valores de referência segundo essas variáveis, deve-se ao fato que estudos apontam que esses fatores podem contribuir para a variação na concentração dos metais estudados em sangue. Além disso, os valores de referência estabelecidos em outros estudos também foram estratificados segundo essas mesmas variáveis, o que permitirá uma adequada comparação entre os trabalhos. Também foram apresentadas concentrações obtidas na população do município de São Paulo estratificadas segundo o consumo de vísceras e miúdos, frutos do mar, frango, carne, consumo de destilados, vinho e cerveja. Esses resultados poderão contribuir com informações até então inexistentes no Brasil.

A derivação dos valores de referência foi feita considerando o limite superior do intervalo de confiança a 95% para o percentil 95 da distribuição dos

valores obtidos para cada elemento metálico estudado. Essa opção foi escolhida em razão de muitos estudos utilizarem o limite superior da distribuição dos valores observados para o estabelecimento dos valores de referência. A expressão dos valores de referência sob a mesma forma possibilita uma melhor comparação entre os diversos trabalhos. Além disso, devido à carência de dados sobre a exposição da população geral aos metais no Brasil, torna-se difícil estabelecer os cenários de exposição a que a população está sujeita. Sendo assim, o uso do limite superior da distribuição dos valores de referência pode ser mais apropriado, para avaliação de situação com suspeita de exposição aumentada num determinado grupo de indivíduos.

Além de serem apresentados os valores de referência derivados, também foram incluídos nas tabelas as médias aritmética e geométrica, e os percentis 5, 10, 50, 90 e 95, além do intervalo de confiança a 95% para o percentil 95. Esses resultados contribuirão com dados sobre a população estudada, uma vez que existem poucos dados de biomonitorização na população geral brasileira.

A fim de comparar os resultados obtidos neste estudo e outros da literatura foram elaboradas tabelas com valores de referência derivados para populações de diferentes países e, também tabelas reportando concentrações dos elementos estudados no sangue de diversos estudos de biomonitorização (tabelas 24 a 31). No caso do níquel não foi elaborada tabela reportando valores de referência derivados, pois encontramos apenas um trabalho que o estabeleceu.

Tabela 24: Valores de referência/Intervalos de referência propostos para chumbo em sangue em diversas populações

Elemento	Local do estudo	Ano de amostragem	Grupo da população	N	Valor/Intervalo de referência (µg/L)	Referência
Pb	Brasil (Londrina)	1993 a 1995	Adultos +15 anos	206	2,4 – 171 ^a	Paoliello et al., 1997
Pb	Brasil (Londrina)	1994 a 1996	Adultos (média 40 anos)	520	12,0 – 137,2 ^a	Paoliello et al., 2001
Pb	Alemanha	1997/1999	Homens 18-69 anos	2342	90 ^b	Schulz et al., 2012; Wilhelm et al., 2004
Pb	Alemanha	1997/1999	Mulheres 18-69 anos	2303	70 ^b	Schulz et al., 2012; Wilhelm et al., 2004
Pb	Alemanha	2003/2006	Crianças 3-14 anos	1560	35 ^b	Schulz et al., 2012; Schulz et al., 2009
Pb	Itália (Roma)	2005 [*]	Adultos 20-61 anos	110	12,8 – 79,5 ^c	Alimonti et al., 2005
Pb	República Tcheca	2005/2009	Homens 18-58 anos	733	80 ^b	Cerná et al., 2012
Pb	República Tcheca	2005/2009	Mulheres 18-58 anos	494	50 ^b	Cerná et al., 2012
Pb	República Tcheca	2005/2009	Crianças 8-10 anos	723	45 ^b	Cerná et al., 2012
Pb	Brasil (São Paulo)	2006	Homens 18-39 anos	234	60 ^b	Kuno et al., 2013
Pb	Brasil (São Paulo)	2006	Homens 40-65 anos	82	80 ^b	Kuno et al., 2013
Pb	Brasil (São Paulo)	2006	Mulheres 18-39 anos	158	47 ^b	Kuno et al., 2013
Pb	Brasil (São Paulo)	2006	Mulheres 40-65 anos	65	66 ^b	Kuno et al., 2013
Pb	Itália (Sardenia)	2009	Homens 18-89 anos	111	17,5 – 106 ^c	Forte et al., 2011
Pb	Itália (Sardenia)	2009	Mulheres 18-89 anos	104	12,3 – 68,9 ^c	Forte et al., 2011

*: como não havia informação sobre o ano de amostragem considerou-se a data da publicação

^a: (média +/- 2s)^b: limite superior 95%IC (intervalo confiança) p/ P95^c: percentil 5 – percentil 95 (P5-P95)

Tabela 25: Concentrações de chumbo em sangue de adultos obtidas de estudos de biomonitorização (em µg/L)

Elemento	Local do estudo	Ano de amostragem	Grupo da população	N	Concentração (µg/L)	Referência
Pb	Coréia (KNHANES)	2005	Homens 20-60 anos	1000	62,3 ^a	Kim e Lee, 2011
Pb	Coréia (KNHANES)	2005	Mulheres 20-60 anos	997	50,5 ^a	Kim e Lee, 2011
Pb	Alemanha	2005	Adultos 18-70 anos	130	47 ^a	Heitland e Koster, 2006
Pb	Coréia	2007/2008	Homens +18 anos	797	47,4 ^a	Son et al., 2009
Pb	Coréia	2007/2008	Mulheres +18 anos	1531	33,8 ^a	Son et al., 2009
Pb	EUA (NHANES)	2007/2008	Adultos 12-19 anos	1074	19,0 (17,0-23,2) ^b	CDC, 2013a
Pb	Brasil	2007/2008	Adultos 18-60 anos	371	134,0 ^c	Nunes, 2010
Pb	EUA (NHANES)	2007/2008	Homens +20 anos	4147	44,1 (41,0-48,8) ^b	CDC, 2013a
Pb	EUA (NHANES)	2007/2008	Mulheres +20 anos	4119	30,0 (28,1-32,0) ^b	CDC, 2013a
Pb	Brasil	2008	Homens 18-25 anos	512	44,23 ^a	IESC, UFRJ, 2011
Pb	Brasil	2008	Adultos 18-65 anos	373	65,88 ^a	IESC UFRJ, 2011
Pb	Canadá	2007/2009	Homens 6-79 anos	2576	42,2 ^a	Haines e Murray, 2012
Pb	Canadá	2007/2009	Mulheres 6-79 anos	2743	35,0 ^a	Haines e Murray, 2012

*: como não havia informação sobre o ano de amostragem considerou-se a data da publicação

^a: percentil 95^b: percentil 95 e seu intervalo de confiança a 95%^c: valor máximo

Tabela 26: Concentrações de chumbo em sangue de crianças e adolescentes obtidas de estudos de biomonitorização (em µg/L)

Elemento	Local do estudo	Ano de amostragem	Grupo da população	N	Concentração (µg/L)	Referência
Pb	EUA (NHANES)	2007/2008	Crianças 6-11 anos	1011	25,0 (21,0-28,8) ^a	CDC, 2013a
Pb	Brasil	2009	Crianças 8-10 anos	232	79,61 ^b	IESC, UFRJ, 2011
Pb	China	2012 [*]	Meninos 11-12 anos	143	93,8 ^c	Liu et al., 2012
Pb	China	2012 [*]	Meninas 11-12 anos	143	88,8 ^c	Liu et al., 2012
Pb	Itália	2009	Adolescentes 13-15 anos	252	29,4 ^b	Pino et al., 2012

*: como não havia informação sobre o ano de amostragem considerou-se a data da publicação

^a: percentil 95 e seu intervalo de confiança a 95%^b: percentil 95 (P95)^c: valor máximo

Tabela 27: Valores de referência/Intervalos de referência propostos para cádmio em sangue em diversas populações

Elemento	Local do estudo	Ano de amostragem	Grupo da população	N	Valor/Intervalo de referência (µg/L)	Referência
Cd	Reino Unido	1998	Não fumantes 16-70 anos	120	0,14 – 0,62 ^a	White e Sabbioni, 1998
Cd	Reino Unido	1998	Fumantes 16-70 anos	90	0,28 – 1,71 ^a	White e Sabbioni, 1998
Cd	Alemanha	1997/1999	Não fumantes 18-69 anos	4645	1,0 ^b	Schulz et al., 2012; Wilhelm et al., 2004
Cd	Alemanha	2003/2006	Crianças 3-14 anos	1560	< 0,3 ^b	Schulz et al., 2012; Schulz et al., 2009
Cd	República Tcheca	2005/2009	Não fumantes 18-58 anos	896	1,0 ^b	Cerná et al., 2012
Cd	República Tcheca	2005/2009	Crianças 8-10 anos	723	0,5 ^b	Cerná et al., 2012
Cd	Brasil	2006	Não fumantes 18-65 anos	539	0,6 ^b	Kuno et al., 2013
Cd	Itália	2009	Não fumantes 18-89 anos	100	0,92 ^c	Forte et al., 2011
Cd	Itália	2009	Fumantes 18-89 anos	40	2,70 ^c	Forte et al., 2011
Cd	Itália	2009	Ex-fumantes 18-89 anos	75	1,14 ^c	Forte et al., 2011
Cd	China	2012*	Meninos 11-12 anos	143	0,5 – 3,0 ^a	Liu et al., 2012
Cd	China	2012*	Meninas 11-12 anos	143	0,5 – 3,9 ^a	Liu et al., 2012

*: como não havia informação sobre o ano de amostragem considerou-se a data da publicação

^a: intervalo inter percentil contendo 95% da distribuição de referência^b: limite superior 95%IC (intervalo confiança) p/ o percentil 95^c: percentil 95 (P95)

Tabela 28: Concentrações de cádmio em sangue de adultos, crianças e adolescentes obtidas de estudos de biomonitorização (em µg/L)

Elemento	Local do estudo	Ano de amostragem	Grupo da população	N	Concentração (µg/L)	Referência
Cd	Alemanha	1998	Fumantes 18-69 anos	1611	1,20 ^a	Wilhelm et al., 2004
Cd	Coréia	2007/2008	Homens 18 - >65 anos	776	2,29 ^a	Son et al., 2009
Cd	Coréia	2007/2008	Mulheres 18 - >65 anos	1486	2,74 ^a	Son et al., 2009
Cd	EUA (NHANES)	2007/2008	Crianças 6-11 anos	1011	0,26 (0,24-0,28) ^b	CDC, 2013a
Cd	EUA (NHANES)	2007/2008	Homens	4147	1,60 (1,30-1,90) ^b	CDC, 2013a
Cd	EUA (NHANES)	2007/2008	Mulheres	4119	1,43 (1,29-1,63) ^b	CDC, 2013a
Cd	Canadá	2007/2009	Homens 6-79 anos	2576	3,48 ^a	Haines e Murray, 2012
Cd	Canadá	2007/2009	Mulheres 6-79 anos	2743	3,73 ^a	Haines e Murray, 2012
Cd	Brasil*	2008	Adultos 18-65 anos	373	0,99 ^a	IESC, UFRJ, 2011
Cd	Brasil**	2008	Homens 18-25 anos	512	0,62 ^a	IESC, UFRJ, 2011
Cd	Itália	2009	Meninos 13-15 anos	112	0,71 ^a	Pino et al., 2012
Cd	Itália	2009	Meninas 13-15 anos	140	0,91 ^a	Pino et al., 2012

*: subprojeto do estudo piloto Inquérito Nac. Pop. Exp. Subst. Químicas “doadores sangue” **: subprojeto do estudo piloto Inquérito Nac. Pop. Exp. Subst. Químicas “conscritos forças armadas” ^a: P95: percentil 95 ^b: P95 (95% IC): percentil 95 e seu intervalo de confiança a 95%

Tabela 29: Valores de referência propostos para mercúrio em sangue em diversas populações

Elemento	Local do estudo	Ano de amostragem	Grupo da população	N	Valores de referência (µg/L) ^a	Referência
Hg	Alemanha	1997/1999	Adultos 18-69 anos	2310	2,0	Schulz et al., 2012; Wilhelm et al., 2004
Hg	Alemanha	2003/2006	Crianças 3-14 anos	1552	0,8	Schulz et al., 2012; Schulz et al., 2009
Hg	República Tcheca	2005/2009	Homens 18-58 anos	733	2,6 ^{**}	Cerná et al., 2012
Hg	República Tcheca	2005/2009	Mulheres 18-58 anos	494	3	Cerná et al., 2012
Hg	República Tcheca	2005/2009	Crianças 8-10 anos	723	1,4 / 1,3 ^{**}	Cerná et al., 2012
Hg	Brasil	2006	Homens 18-39 anos	234	4	Kuno et al., 2013
Hg	Brasil	2006	Homens 40-65 anos	94	5	Kuno et al., 2013
Hg	Brasil	2006	Mulheres 18-39 anos	185	4	Kuno et al., 2013
Hg	Brasil	2006	Mulheres 40-65 anos	80	6	Kuno et al., 2013
Hg	Brasil	2006	Adultos (nenhum consumo peixe)	447	4	Kuno et al., 2013

*: frequência de consumo de peixe de até 3 vezes por mês

**: frequência de consumo de peixe de menos de uma vez por mês ou nenhum consumo de peixe

^a: limite superior 95%IC (intervalo confiança) para o percentil 95 (P95)

Tabela 30: Concentrações de mercúrio em sangue de adultos, crianças e adolescentes obtidas em estudos de biomonitorização (em µg/L)

Elemento	Local do estudo	Ano de amostragem	Grupo da população	N	Concentração ^a (µg/L)	Referência
Hg	Coréia (KNHANES)	2005	Homens 20-60 anos	1000	12,23	Kim e Lee, 2011
Hg	Coréia (KNHANES)	2005	Mulheres 20-60 anos	997	9,36	Kim e Lee, 2011
Hg	EUA (NHANES)	2007/2008	Homens > 20 anos	4147	5,16 (4,12-6,97) ^b	CDC, 2013a
Hg	EUA (NHANES)	2007/2008	Mulheres > 20 anos	4119	3,93 (3,17-5,16) ^b	CDC, 2013a
Hg	EUA (NHANES)	2007/2008	Crianças 6-11 anos	1011	1,56 (1,34-1,80) ^b	CDC, 2013a
Hg	Brasil	2008	Homens 18-25 anos	512	3,81	IESC, UFRJ, 2011
Hg	Brasil	2008	Adultos 18-65 anos	373	9,21	IESC, UFRJ, 2011
Hg	Itália	2009	Meninos 13-15 anos	112	1,88	Pino et al., 2012
Hg	Itália	2009	Meninas 13-15 anos	140	4,16	Pino et al., 2012

*: como não havia informação sobre o ano de amostragem considerou-se a data da publicação

^a: percentil 95^b: intervalo de confiança a 95%

Tabela 31: Concentrações de níquel em sangue de adultos e crianças obtidas de estudos de biomonitorização (em µg/L)

Elemento	Local do estudo	Ano de amostragem	Grupo da população	N	Concentração (µg/L)	Referência
Ni	Alemanha	2005	Adultos 18-70 anos	130	0,22 ^a	Heitland e Koster, 2006
Ni	Itália	2005 [*]	Adultos 20-61 anos	110	2,13 ^a	Alimonti et al., 2005
Ni	França	2005 [*]	Adultos	100	4,18 ^a	Goullé et al., 2005
Ni	Brasil	2007/2008	Adultos 18-60 anos	371	3,90 ^b	Nunes et al., 2010
Ni	Itália	2009	Meninos 13-15 anos	112	17,9 ^a	Pino et al., 2012
Ni	Itália	2009	Meninas 13-15 anos	140	4,16 ^a	Pino et al., 2012
Ni	Taiwan	2011 [*]	Homens 36-41 anos	54	6,8 ^b	Lin e Wu, 2011
Ni	Taiwan	2011 [*]	Mulheres 36-41 anos	40	4,8 ^b	Lin e Wu, 2011

*: como não havia informação sobre o ano de amostragem considerou-se a data da publicação

^a: percentil 95^b: valor máximo

7.1.1 Chumbo

No Brasil são poucos os estudos que tiveram o objetivo de definir valores de referência para metais em sangue.

O primeiro deles foi realizado na região sul no município de Londrina, estado do Paraná, entre 1993 e 1995, e estabeleceu valores de referência para chumbo em sangue em uma população não exposta (206 adultos saudáveis, com idade média de 38 anos). O intervalo de referência derivado para a população masculina foi de 24 a 171 ug/L, e para o grupo feminino o intervalo obtido foi de 24 a 164 ug/L (Paoliello et al., 1997).

Ainda no município de Londrina outro estudo foi realizado entre 1994 e 1996, com o objetivo de estabelecer valores de referência para chumbo em sangue, em 520 voluntários adultos saudáveis, com idade média de 40 anos. O intervalo de referência estabelecido para os homens foi de 12 a 140,4 ug/L, e para as mulheres o intervalo foi de 12 a 134,9 ug/L (Paoliello et al., 2001a). Nos estudos realizados em Londrina, a derivação dos valores de referência foi baseada no valor médio mais ou menos duas vezes o desvio-padrão dos valores observados. Observando-se os valores obtidos dos valores de referência estabelecidos no município de Londrina, verificamos uma tendência de diminuição nas concentrações de chumbo em sangue obtidas entre os estudos. Mesmo assim, os limites superiores dos intervalos de referência estabelecidos nesses trabalhos são bem mais elevados que os valores de referência derivados no

presente estudo; as diferenças chegam a ser três vezes maiores para homens acima de 20 anos, e quatro vezes superiores para mulheres nesta mesma faixa etária, para as comparações feitas com o trabalho realizado entre 1994 e 1996. Provavelmente nos anos 90, os usos industriais e tecnológicos dos compostos de chumbo eram muito maiores, o que explicaria a maior concentração de chumbo no sangue da população residente no município de Londrina e, também a técnica analítica utilizada foi a espectrometria de absorção atômica com chama, que não é a mais sensível e precisa para o chumbo.

Um estudo mais recente que teve o objetivo de derivar valores de referência no Brasil foi realizado em 2006. O estudo estabeleceu valores de referência para chumbo em sangue em 653 adultos doadores de sangue não fumantes, com idades entre 18 e 65 anos, residentes da região metropolitana da cidade de São Paulo (RMSP) (Kuno et al., 2013). Nesse estudo os valores de referência foram derivados para duas faixas etárias: 18 a 39 anos, e 40 a 65 anos. Para homens com idades entre 18 e 39 anos o valor derivado foi de 60 ug/L, e para o grupo de 40 a 65 anos, o valor foi de 80 ug/L. O valor de referência derivado para homens acima de 20 anos no presente estudo foi 42,3 ug/L, valor esse 1,4 vezes e 1,9 vezes inferior aos valores de referência estabelecidos para homens da região metropolitana de São Paulo, estratificados para as duas faixas etárias. No caso das mulheres da RMSP, com idades entre 18 e 39 anos o valor de referência estabelecido foi 47 ug/L, enquanto que para o grupo entre 40 e 65 anos, o valor foi de 63 ug/L. Esses valores foram 1,5 vezes e 2 vezes maiores que os valores estabelecidos no presente estudo, de 31,1 ug/L, para mulheres acima de 20 anos

(tabela 18). A região metropolitana de São Paulo engloba além da cidade de São Paulo outros municípios como São Bernardo do Campo, Guarulhos e Santo André, entre outros, que abrigam importantes complexos industriais, o que pode ter influenciado o aumento dos níveis de chumbo no sangue dessa população.

Alguns países vêm realizando há anos estudos de biomonitorização para avaliar a exposição da população, a determinadas substâncias químicas. Seguindo essa tendência, no final de 2007 foi realizado no Brasil o estudo piloto do I Inquérito Nacional de Populações Expostas a Substâncias Químicas. Fizeram parte deste estudo piloto três subprojetos: “doadores de sangue”, “conscritos das forças armadas” e “crianças escolares”.

O subprojeto “doadores de sangue” envolveu a determinação de chumbo em sangue em amostras de 373 indivíduos doadores de sangue, de ambos os gêneros, com idades entre 18 e 65 anos, que compareceram às unidades da Associação Beneficente de Coleta de Sangue – Colsan, na região metropolitana de São Paulo (IESC, UFRJ, 2011). Fazendo uma comparação do valor do percentil 95 obtido neste subprojeto de 65,9 ug/L, verificamos que esse valor foi duas vezes mais alto que o valor de referência obtido no presente estudo, para indivíduos acima de 20 anos, de 33,0 ug/L (tabela 8). Isso pode indicar uma maior exposição ao chumbo dos indivíduos da região metropolitana de São Paulo, o que explicaria o valor mais elevado de plumbemia.

No subprojeto “conscritos das forças armadas” a população estudada foi de jovens com idades entre 18 e 25 anos, residentes no município do Rio de Janeiro. O valor do percentil 95 (44,2 ug/L) obtido no subprojeto e o valor de referência

estabelecido em nosso estudo para o grupo masculino acima de 20 anos foi concordante.

O subprojeto “crianças escolares” avaliou 270 escolares, com idades entre 8 e 10 anos, oriundos de duas escolas do município do Rio de Janeiro (IESC, UFRJ, 2011). Comparando-se o valor de referência derivado para crianças, abaixo de 11 anos (tabela 8), e o valor do percentil 95 obtido nesse subprojeto, de 79,6 ug/L, verificamos uma diferença de concentração de chumbo de quase 3 vezes. No subprojeto “crianças escolares” a determinação de chumbo foi feita no sangue capilar. A literatura relata que níveis de chumbo determinados no sangue capilar podem ser maiores que os determinados em sangue venoso, fato esse causado por problema de contaminação, que pode levar a resultados falsamente elevados (Parsons et al., 1997). Além disso, pode haver diferenciação na concentração de chumbo obtida em sangue capilar e sangue venoso e, portanto as concentrações podem não ser diretamente comparáveis (Johnson et al., 1997).

Comparando-se os valores de referência derivados no presente estudo com os de outros países (tabela 24), verifica-se que no caso do chumbo, os valores estabelecidos na República Tcheca, para homens e mulheres, são maiores que os estabelecidos aqui. A razão provável para isso deve-se ao fato que a restrição ao uso do chumbo na gasolina, nesse país, somente ocorreu em 2001, o que explicaria o nível mais elevado de chumbo encontrado nessa população (Cerná et al., 2012). Os valores de referência estabelecidos no presente estudo também são inferiores aos valores de referência da Alemanha. Esses valores foram estabelecidos com base nos dados de 1997 a 1999, e até o presente momento

não foram atualizados. Provavelmente os valores de referência da Alemanha são mais altos que os derivados neste estudo, pois quase 10 anos separam os períodos de coleta das amostras entre os dois estudos, portanto refletem níveis de exposição da população estudada em períodos bastante distintos. Valores de referência de estudos mais antigos são mais altos, comparados aos valores derivados mais recentemente. Os valores derivados no presente estudo também foram menores que os estabelecidos para a população italiana não exposta ocupacionalmente, com idade entre 18 e 89 anos. O intervalo de referência proposto para os homens foi de 17,5 a 106 ug/L, enquanto que para as mulheres o intervalo foi de 12,3 a 68,9 ug/L (Forte et al., 2011). A população italiana muito provavelmente tem uma exposição maior ao chumbo em comparação com a população do município de São Paulo, e isso pode ser devido ao fato que somente em 2004 é que o chumbo foi banido da gasolina nesse país (Garte, 2008). Estudos mostram que o uso do chumbo na gasolina constitui uma das maiores fontes de exposição da população a esse metal.

Comparando-se os valores de referência derivados neste estudo com valores obtidos em estudos de biomonitorização (tabela 25), verifica-se que os valores de referência derivados para homens e mulheres, acima de 20 anos, foram semelhantes aos valores obtidos no inquérito populacional americano, NHANES (CDC, 2013a) e inquérito nacional de biomonitorização do Canadá, CHMS (Haines; Murray, 2012). Por outro lado, os valores derivados para o município de São Paulo foram menores do que os valores dos percentis 95 obtidos no inquérito populacional coreano, KNHANES, de 2005 (Kim; Lee, 2011),

e também inferiores aos percentis 95 do estudo de biomonitorização coreano, Second Korean National Human Exposure and Biomonitoring Examination, realizado no período de 2007 a 2008 (Son et al., 2009). Isso mostra que a população coreana está exposta a níveis mais altos de chumbo do que a população de São Paulo.

Crianças constituem um grupo especial da população, que devido às características particulares de desenvolvimento corporal tornam-se um grupo mais susceptível aos poluentes ambientais, e por isso mais vulneráveis. Sendo assim, é um grupo que deve ser levado em consideração em estudos de biomonitorização. O presente estudo derivou valores de referência para esse grupo da população, segundo as variáveis: gênero e idade.

Encontramos apenas valores de referência derivados para crianças da Alemanha, República Tcheca e da China. Os valores de referência propostos neste estudo e os estabelecidos para as crianças alemãs (35 ug/L) (tabela 24) (Schulz et al., 2009; 2012), são semelhantes. Porém são inferiores aos valores estabelecidos na República Tcheca e na China (Cerná et al., 2012; Liu et al., 2012). Isso indica que as crianças da República Tcheca e da China estão provavelmente mais expostas ao chumbo do que as crianças brasileiras. Os valores de referência da República Tcheca foram derivados a partir de dados dos anos de 2005 a 2009, período esse relativamente próximo ao ano em que o chumbo foi banido da gasolina nesse país. Isso provavelmente pode estar contribuindo para os níveis mais altos de chumbo encontrados nessa população. Com relação aos níveis mais altos de chumbo encontrados nas crianças chinesas,

as atividades industriais crescentes no país e a consequente demanda por energia, com a queima de carvão em grande quantidade podem estar contribuindo para a maior exposição da população a esse metal (Xu et al., 2012).

Ao compararmos os valores de referência estabelecidos para crianças no presente estudo e os dados de estudos de biomonitorização (tabela 26), podemos observar que os valores aqui derivados são concordantes com o valor do percentil 95 reportado no inquérito populacional americano, NHANES (CDC, 2013). Valores de referência propostos neste estudo, considerando a faixa de 12 a 19 anos, também foram concordantes com valores do percentil 95 obtidos para adolescentes italianos (Pino et al., 2012).

Neste estudo gênero, hábito de fumar, consumo de vísceras e miúdos e área de moradia foram fatores que tiveram associação significativa com os níveis de plumbemia, resultado esse obtido pelo ajuste do modelo linear generalizado. Pelo teste de Spearman a variável idade apresentou correlação positiva significativa com os níveis de chumbo no sangue.

No presente estudo os níveis de chumbo obtidos no sangue de homens foram mais altos em relação aos das mulheres. Outros estudos no Brasil e em outros países confirmam este achado (Nogueira et al., 1979; Fernícola; Azevedo, 1981; Nunes et al., 2010; White; Sabbioni, 1998; Apostoli, 2002; Becker et al., 2002; Wilhelm, 2004; Alimonti et al., 2005; Cerná et al., 2012; Son et al., 2009; Kim; Lee, 2011; Clark et al., 2007). As concentrações de chumbo em sangue de homens encontradas em diversos estudos variam de uma a duas vezes as concentrações observadas nas mulheres. Geralmente as mulheres apresentam

concentrações de chumbo em sangue menores que os homens e isso provavelmente devem-se às menores exposições, menores níveis de hematócritos e diferenças no metabolismo do chumbo (Batariová et al., 2006).

Além deste estudo, outros trabalhos também encontraram associação significativa entre chumbo no sangue e hábito de fumar. A influência do hábito de fumar pode estar relacionada ao fato que aproximadamente 2% a 6% do chumbo contido nos cigarros podem ser inalados pelo fumante, podendo dessa forma contribuir para a carga corpórea do metal (Paoliello; Capitani, 2003; Skerfving; Bergdahl, 2007). Estudos na literatura mostram que a concentração de chumbo no sangue de fumantes pode variar de 20% a 50% acima da concentração de chumbo encontrada no sangue de não fumantes (Forte et al., 2011; McKelvey et al., 2007; Alimonti et al., 2005; Apostoli, 2002). Estudo de biomonitorização realizado na cidade de Nova York, em 2004, com adultos acima de 20 anos, reportou concentrações de chumbo no sangue de fumantes de 60,0 ug/L, e para não fumantes de 43,5 ug/L, que foram bem superiores aos valores de referência derivados neste estudo para esses grupos (tabela 9). No entanto, em estudo realizado na Itália com doadores de sangue, de 20 a 61 anos, a concentração de chumbo em sangue obtida em fumantes de 46,6 ug/L (Alimonti et al., 2005), foi concordante com o valor de referência derivado neste estudo para esse grupo (tabela 9). Para não fumantes italianos o valor reportado foi de 36,7 ug/L, valor esse superior ao valor de referência estabelecido no presente estudo. Esses estudos indicam que a exposição ao chumbo pelo fumo depende da quantidade do metal no tabaco, da porcentagem do chumbo que é inalada e da quantidade

absorvida (Lazarevic et al., 2012). Muitos estudos apresentam as concentrações de metais no sangue estratificados por grupos de fumantes, não fumantes e ex-fumantes, mas não os separam por gênero. No presente estudo os valores de referência também foram estabelecidos seguindo essa forma de apresentação, isto é, foram estratificados segundo esses grupos, mas sem fazer a separação por gênero.

Além do presente estudo, outros trabalhos também confirmam o achado de que o chumbo está positivamente associado com a idade, isto é, um aumento na concentração de chumbo no sangue com o aumento da idade (Alimonti et al., 2005; Batariová et al., 2006; Ikeda et al., 2011; Koyashiki et al., 2010; Nunes et al., 2010; Menezes-Filho et al., 2012). A causa provável deve-se às diferentes taxas de absorção do metal com relação à idade. Em adultos aproximadamente 10% do chumbo ingerido é absorvido, podendo ser mais alta em condições de jejum ou em condições de dieta deficiente em cálcio, fosfato, selênio ou zinco. No caso de crianças até 50% do chumbo ingerido pode ser absorvido (WHO, 1995). Outro fator que pode ser atribuído a esse aumento nos níveis de chumbo no sangue com a idade, deve-se ao fato que em adultos quase 94% do chumbo presente no organismo é estocado nos ossos e em crianças essa porcentagem é de 73% (WHO, 1995). Assim, o chumbo acumulado no osso pode servir como fonte endógena do metal e a mobilização para a corrente sanguínea pode ocorrer em algumas fases da vida, como gravidez, lactação, menopausa, envelhecimento e, também em determinada situação fisiológica ou patológica, como por exemplo,

osteoporose e fratura do osso, entre outras (WHO, 1995; Lauwerys; Hoet, 2001; Korrich et al., 2002; Popovic et al., 2005).

Neste estudo as concentrações de chumbo em sangue mostraram associação significativa com a área de moradia. A influência deste fator pode estar relacionada às diferenças geográficas, as quais apontam para cenários de exposição diferentes. Diversos estudos reportam que a área de moradia é um fator determinante, que explica variações de cerca de 4% até 45% nas concentrações de chumbo no sangue da população estudada (Schroijen et al., 2008; Mattos et al., 2009; Menezes Filho et al., 2012; Pawlas et al., 2013).

A ingestão de álcool parece facilitar a absorção de chumbo no corpo. Os que consomem bebida alcoólica (destilados, vinho ou cerveja) pelo menos uma vez por semana apresentaram níveis aproximadamente 15% maiores de chumbo no sangue, em comparação com aqueles que consumiam qualquer bebida alcóolica até três vezes por mês (tabelas 15, 16, 17). Em outros estudos essa porcentagem variou de 19% a 65%, entre as concentrações obtidas no sangue daqueles que consumiam bebida alcoólica e dos que não consumiam bebida (Apostoli, 2002; Alimonti et al., 2005; Forte et al., 2011).

Neste estudo o consumo de vísceras e miúdos foi um dos fatores que se mostrou associado significativamente com os níveis de chumbo no sangue da população estudada. Sabe-se que fatores de estilo de vida, como aqueles vindos da ingestão alimentar podem influenciar as concentrações dos metais no sangue. Metais pesados tendem a se acumular no fígado e rins de animais, consequentemente esses órgãos, que são normalmente consumidos pela

população, contêm níveis mais altos desses elementos em relação a outras partes, como os músculos, o que pode ser uma fonte de exposição significativa aos metais (Obasohan, 2007). Com relação ao consumo de miúdos e vísceras, foram encontrados poucos trabalhos na literatura que estudaram a relação existente entre a ingestão desses alimentos e os níveis dos metais no sangue. Um estudo realizado na Noruega para avaliação da ingestão alimentar da população reportou associação positiva do consumo frequente de vísceras com um pequeno aumento nos níveis de chumbo no sangue dos participantes (Birgisdottir et al., 2013).

Baseado em achados de estudos recentes sobre a ocorrência de efeitos adversos à saúde causados pelo chumbo, mesmo em concentrações abaixo de 10 ug/dL, o CDC definiu o valor de 5 ug/dL, como valor de referência para identificar níveis elevados de chumbo em sangue em crianças (CDC, 2013). O valor de referência para chumbo em sangue em crianças estabelecido no presente estudo não excedeu o valor de 5 ug/dL, indicando uma exposição baixa a este metal para esse grupo estudado.

7.1.2 Cádmio

No Brasil encontramos somente um estudo que teve o objetivo de derivar valores de referência para cádmio em sangue. O estudo que foi realizado em 2006, na região metropolitana de São Paulo, envolveu 539 adultos doadores de sangue, não fumantes, com idades entre 18 e 65 anos. O valor de referência

derivado para não fumantes foi de 0,6 ug/L (Kuno et al., 2013). Esse valor foi superior ao valor de referência proposto neste estudo, de 0,4 ug/L. Isso indica uma exposição maior ao cádmio dos doadores de sangue, em relação à população do município de São Paulo. A região metropolitana de São Paulo possui várias áreas industriais, que provavelmente podem estar contribuindo para o aumento nos níveis de cádmio no sangue da população estudada.

Devido à carência de valores de referência foram utilizados os dados de concentração de cádmio no sangue obtidos nos subprojetos do estudo piloto do I Inquérito Nacional de Populações Expostas a Substâncias Químicas no Brasil para fazer a comparação com os valores de referência propostos neste estudo. O valor de referência estabelecido neste estudo para adultos, com mais de 20 anos, foi inferior ao valor obtido para o percentil 95 no subprojeto “doadores de sangue”, de 0,99 ug/L, porém semelhante ao percentil 95 obtido no subprojeto “conscritos das forças armadas”, cujo valor reportado foi de 0,62 ug/L (IESC, UFRJ, 2011). A comparação aqui foi feita com o valor de referência estratificado por idade e o valor do percentil 95, pois nos subprojetos as concentrações para o grupo de fumantes, não fumantes e ex-fumantes estavam expressos apenas por seus valores mínimo, máximo e médio.

Podemos observar que o valor de referência derivado neste estudo para adultos não fumantes foi inferior aos valores estabelecidos na Alemanha, República Tcheca e Itália (tabela 27). Esses resultados indicam que essas populações estão expostas a níveis mais altos de cádmio que a população de São Paulo. Como o valor de referência da Alemanha foi derivado há cerca de 10 anos

em relação ao presente estudo, provavelmente isto seja a causa do valor de referência desse país estar mais alto, em comparação com o valor estabelecido no presente estudo. Com relação aos fumantes, o valor de referência estabelecido neste estudo (0,8 ug/L) foi inferior ao valor obtido do percentil 95 em estudo realizado em Nova York, em 2004, com adultos acima de 20 anos, que reportou valor de 3,00 ug/L (Mckelvey et al., 2007); foi inferior também ao valor obtido do percentil 95 em estudo alemão realizado em 1998, com adultos de 18 a 69 anos, de 1,20 ug/L (Wilhelm et al., 2004). Os níveis de cádmio no sangue de fumantes são influenciados pelo número de cigarros fumados por dia e também pelo tipo de cigarro fumado, pois dependendo da marca há uma variação na concentração do metal no cigarro (Massadeh et al., 2010).

Para uma comparação mais adequada no caso dos estudos de biomonitorização, utilizou-se o valor de referência estabelecido neste estudo para adultos acima de 20 anos, e os valores obtidos para o percentil 95 desses estudos. Pela tabela 28, podemos observar que os valores obtidos para o percentil 95 nos estudos realizados nos Estados Unidos, Canadá e Coréia foram superiores ao valor derivado para cádmio no presente estudo, de 0,6 ug/L. Os resultados indicam que as populações desses países estão expostas a níveis mais altos de cádmio que a população do município de São Paulo. Diferenças na exposição ao cádmio para não fumantes podem ser devidas à ingestão de alimentos ou água contaminada ou ainda, por inalação de ar poluído ou contato com poeira contaminada com o metal, que podem explicar o aumento nos níveis do metal no sangue (Nawrot et al., 2010).

O estudo de biomonitorização humana é uma ferramenta importante para avaliação da exposição às substâncias tóxicas. Recentemente, uma preocupação maior tem surgido com relação às crianças, considerado um grupo vulnerável devido a maior susceptibilidade aos efeitos tóxicos de xenobióticos, em comparação aos adultos, porém ainda são poucos os trabalhos que tiveram o objetivo de estabelecer valores de referência para crianças. Somente a República Tcheca derivou valores de referência para esse grupo, a partir da população geral. A comissão de biomonitoramento humano da Alemanha não estabeleceu valor de referência para cádmio em sangue de crianças, no entanto ela recomenda que devam ser empregadas técnicas analíticas confiáveis que consigam confirmar níveis acima de 0,3 ug/L (Schulz et al., 2009; 2011; 2012). O valor de referência estabelecido neste estudo para crianças abaixo de 11 anos, de 0,2 ug/L, foi inferior ao valor de referência estabelecido na República Tcheca de 0,5 ug/L.

O valor de referência derivado neste estudo para crianças abaixo de 11 anos mostrou-se ligeiramente inferior ao valor obtido do percentil 95 para crianças de 6 a 11 anos, de 0,26 ug/L, do inquérito populacional americano, NHANES, realizado nos anos de 2007 e 2008 (CDC, 2013a). E também foi inferior ao limite superior do intervalo de referência reportado, no estudo com crianças chinesas de 11 a 12 anos, recrutadas em hospital, de 3,0 ug/L para meninos, e de 3,9 ug/L para meninas (Liu et al., 2012). Esses resultados indicam que as crianças chinesas estão expostas a alguma fonte de cádmio, que deve ser investigada. A principal fonte de exposição não ocupacional ao cádmio para não fumantes é devida à ingestão de alimentos. Em países asiáticos, a alimentação está baseada

principalmente no consumo de arroz, que deve ser monitorado a fim de controlar a ingestão de cádmio por essa via (He et al., 2013).

Estudo com adolescentes com idades entre 13 a 15 anos, recrutados em 2009, avaliou a concentração de cádmio no sangue e o percentil 95 obtido para meninos italianos foi de 0,71 ug/L, e para meninas foi de 0,91 ug/L (Pino et al., 2012). Ao compararmos esses valores com os valores de referência propostos em nosso estudo para a faixa etária de 12 a 19 anos, estratificada por gênero (tabela 18), verifica-se que os valores são semelhantes para os meninos e inferiores para as meninas, indicando que as meninas italianas estão mais expostas ao cádmio que as brasileiras.

Neste estudo a faixa etária, o gênero, o hábito de fumar e o consumo de destilados foram os fatores que tiveram associação significativa com as concentrações de cádmio no sangue.

No presente estudo os níveis de cádmio no sangue foram maiores nos mais velhos, o que concorda com os achados em outros estudos, como no Reino Unido, Japão e Itália, onde os níveis de cádmio no sangue foram positivamente associados com a idade (Ikeda et al., 2011; Madeddu et al., 2011; White; Sabbioni, 1998). Segundo a literatura o acúmulo de cádmio com a idade deve-se à eliminação lenta desse metal no organismo, causada pela falta de um mecanismo bioquímico ativo para sua eliminação (Madeddu et al., 2011; Roggi et al., 1995).

Os resultados deste estudo mostram que as concentrações de cádmio em sangue foram ligeiramente maiores para homens do que para mulheres. Estudo realizado na Itália com adultos, de 20 a 79 anos, também reportou concentração

de cádmio no sangue maior no grupo masculino (Roggi et al., 1995). Segundo relatos da literatura a maior absorção intestinal do cádmio e consequente aumento dos níveis desse metal no sangue estão relacionados com a deficiência de ferro e cálcio no organismo (Madeddu et al., 2011). Um trabalho realizado na Suécia em 1998 reportou resultado discordante do encontrado neste estudo; concentração de cádmio no sangue de mulheres foi 1,4 vezes maior do que em homens, provavelmente causado pela deficiência de ferro no grupo feminino (Olsson, 2002).

É bem conhecido que os níveis de cádmio no sangue são tipicamente maiores em fumantes e, as concentrações podem ser de 1,5 a 10 vezes mais altas em fumantes em comparação com não fumantes (Roggi et al., 1995; White; Sabbioni, 1998; Becker et al., 2002; Wilhelm et al., 2004; Alimonti et al., 2005; Puklová et al., 2005; Batariová et al., 2006; Heitlant; Köster, 2006; McKelvey et al., 2007; Son et al., 2009; Mijal; Holzman, 2010; Nunes et al., 2010; Ikeda et al., 2011; Cerná et al., 2012). Neste estudo as concentrações de cádmio no sangue de fumantes foram 4 vezes maiores do que em não fumantes, o que confirma a influência do cigarro sobre a concentração de cádmio em sangue.

Com relação ao consumo de álcool (destilados, vinho e cerveja), os níveis de cádmio no sangue parecem ser influenciados por sua ingestão (tabelas 15, 16 e 17), uma vez que as concentrações de cádmio no sangue dos que consumiam bebida alcoólica pelo menos uma vez por semana eram quase duas vezes maiores do que os níveis de cádmio encontrados nos indivíduos que bebiam até três vezes por mês. Esse resultado concorda com o achado de Forte et al. (2011)

em que italianos que tinham o hábito de beber mostraram níveis de cádmio no sangue 1,3 vezes mais altos do que aqueles que não consumiam bebida alcoólica.

7.1.3 Mercúrio

Para o mercúrio encontramos somente um estudo brasileiro que derivou valores de referência para esse metal. O estudo foi realizado no final de 2006, com adultos doadores de sangue, sem exposição ocupacional, residentes na região metropolitana de São Paulo. Os valores de referência obtidos nesse estudo foram estratificados para duas faixas etárias: 18 a 39 anos e 40 a 65 anos (Kuno et al., 2013). Os valores de referência propostos no presente estudo, para homens e mulheres acima de 20 anos (tabela 18) mostraram-se inferiores aos valores de referência estabelecidos para os doadores de sangue (tabela 34). Isso indica que a população da região metropolitana de São Paulo está mais exposta ao mercúrio. Uma causa provável pode ser atribuída à ingestão de peixes ou frutos do mar, com teor mais alto de mercúrio, que poderia estar influenciando os níveis de mercúrio no sangue dessa população.

No Brasil, são poucos os estudos que avaliaram os níveis basais de exposição a metais da população geral. Um estudo que merece destaque é o estudo piloto do I Inquérito Nacional de Populações Expostas a Substâncias Químicas, realizado entre 2008 e 2009. Os valores de referência propostos no presente estudo, para homens e mulheres acima de 20 anos mostraram-se inferiores aos valores obtidos para o percentil 95 dos subprojetos “doadores de

sangue” e “conscritos das forças armadas”, que faziam parte do estudo piloto (tabela 30). A população do subprojeto “conscritos das forças armadas” foi constituída por 512 jovens do sexo masculino, entre 18 e 25 anos, residentes no município do Rio de Janeiro, enquanto que os participantes do subprojeto “doadores de sangue” eram adultos de ambos os sexos, com idades entre 18 e 65 anos, residentes na região metropolitana de São Paulo. Esses resultados mais altos encontrados nas populações dos subprojetos podem indicar uma exposição não usual, provocada provavelmente pelo consumo de espécies de peixe com maior concentração de mercúrio, ou outra fonte que precisa ser esclarecida. Entre as espécies de peixe, os predadores, são os que contêm níveis mais altos de mercúrio. Destacam-se nesta classe: o peixe espada, tubarão, atum vermelho, cavala, badejo, lúcio, lampreia, bonito, truta, garoupa, pacú, tilápia, entre outros. O consumo destes peixes deve ser restrito para evitar o aumento nos níveis de mercúrio no sangue (Llop et al., 2013).

Comparando-se os valores de referência derivados neste estudo com os de outros países (tabela 29), verifica-se que os valores aqui derivados foram similares aos estabelecidos pela Republica Tcheca, para homens, mulheres e crianças (Cerná et al., 2012). O valor de referência derivado em nosso estudo para aqueles que consomem peixe até três vezes por mês também foram semelhantes aos valores de referência para adultos da Alemanha, com idades entre 18 e 69 anos com a mesma frequência de consumo de peixe (Wilhelm et al., 2004; Schulz et al., 2012). Os percentis 95 reportados no inquérito americano NHANES, para homens e mulheres (tabela 30), foram superiores aos valores estabelecidos no presente

estudo, no entanto para as crianças os valores foram concordantes. Os valores de referência aqui propostos para mercúrio em sangue foram inferiores aos valores do percentil 95 reportado no estudo de biomonitorização coreano, KNHANES, realizado em 2005, para homens e mulheres. A explicação para a concentração do mercúrio no sangue estar mais elevada na população coreana deve-se provavelmente aos hábitos culturais desse povo, onde o consumo de peixes e frutos do mar é relativamente alto. Ao compararmos os valores de referência propostos neste estudo para a faixa etária de 12 a 19 anos (tabela 18) com os percentis obtidos num estudo italiano, com adolescentes de 13 a 15 anos (tabela 30) (Pino et al., 2012) podemos verificar que para meninos, os valores obtidos neste estudo e no estudo italiano são bastante concordantes, enquanto que no caso das meninas, o valor obtido do percentil é superior ao valor de referência deste estudo, indicando que as meninas podem estar mais expostas ao metal, o que explicaria esse nível mais elevado.

No presente estudo os resultados da análise multivariada mostraram que os fatores que apresentaram associação significativa com a concentração de mercúrio foram: faixa etária, o consumo de vísceras e miúdos e o consumo de peixe.

Neste estudo as concentrações de mercúrio no sangue aumentaram com a idade dos participantes, o que pode ser explicado pelo maior consumo de peixe entre os mais velhos. Esse resultado concorda com estudos realizados em outros países (Batariová et al., 2006; Rice et al., 2010; Jensen et al., 2012; Kim et al., 2013). No presente estudo os indivíduos da maior faixa etária apresentaram

concentração de mercúrio 108% mais alta que a concentração obtida para a menor faixa etária (tabela 8).

No presente estudo o consumo de peixe foi um forte preditor para o aumento da concentração de mercúrio no sangue. O grupo que consumia peixe pelo menos uma vez por semana apresentou concentração de mercúrio no sangue 49% mais alta, que a concentração de mercúrio obtida no grupo que consumia peixe até três vezes por mês (tabela 10). A literatura relata que níveis de mercúrio no sangue refletem a exposição ao metal, devido ao consumo de peixe, e também devido aos amálgamas dentários (Wilhelm et al., 2006; Gerhardsson; Lundh, 2010; Puklová et al., 2010; Rice et al., 2010; Becker et al., 2013). O mercúrio ingerido pelo consumo de peixe está predominantemente na forma de metilmercúrio (Mahaffey; Mergler, 1998; Rice et al., 2010). Sua proporção no sangue pode variar em função do consumo de outros alimentos, que podem modificar a absorção dessa forma de mercúrio. Por exemplo, o consumo de fibra alimentar pode reduzir a absorção de metilmercúrio (Airaksinen et al., 2010; Jenssen et al., 2012). Assim, a frequência, a quantidade e a espécie de peixe consumida produzem diferenças na absorção de metilmercúrio, que irão refletir na concentração de mercúrio no sangue. A literatura também relata que as concentrações de mercúrio no sangue são influenciadas pelos diferentes hábitos alimentares, que por fim, estão relacionados aos fatores sócio-econômicos e culturais (Mahaffey et al., 2009; Jenssen et al., 2012; Kim et al., 2013).

McKelvey et al. (2007) avaliando a população da cidade de Nova York em 2004 também encontraram associação do consumo de peixe com níveis de

mercúrio no sangue. O valor do percentil 95 reportado para o grupo que nunca consumia peixe, nos últimos 30 dias, foi de 5,39 ug/L, e para o grupo que consumia pescado até nove vezes nesse mesmo período, foi de 9,34 ug/L.

Neste estudo, pela análise multivariada verificou-se que o consumo de vísceras e miúdos apresenta associação significativa com a concentração de mercúrio. Esse resultado concorda com o achado no estudo realizado entre 2004 e 2005, com 299 adultos da Finlândia, que reportou associação positiva significativa entre o consumo de miúdos e a concentração de metilmercúrio no sangue (Airaksinen et al., 2010). Vários trabalhos na literatura reportam níveis mais altos de mercúrio em fígado ou rins de certas espécies de animais (peixes ou mamíferos) em comparação com as concentrações encontradas na musculatura (Lacerda et al., 2007; Khalafalla et al., 2011; Moraes et al., 2011). Levando isso em consideração pode-se afirmar que o consumo de vísceras ou miúdos, com altos teores de mercúrio pode levar a um aumento na concentração do metal no sangue. Portanto, diferentes hábitos alimentares podem ser um dos principais fatores relacionados com o aumento dos níveis de mercúrio no sangue.

Os valores de referência estabelecidos neste estudo estão abaixo dos valores limite (HBM I e HBM II) estabelecidos na Alemanha para adultos e crianças. Os valores HBM I e II para mercúrio em sangue, é de 5 e de 15 ug/L, respectivamente, tanto para adultos quanto para crianças (Schulz et al., 2007; 2011). O valor máximo determinado em nosso estudo foi de 3,98 ug/L para mercúrio no sangue da população estudada. Os valores HBM foram definidos pela comissão de biomonitoramento humano da Alemanha para avaliar os dados

obtidos na população geral. Esses valores são derivados de estudos epidemiológicos e toxicológicos e podem ser considerados limites biológicos de exposição. Esta comissão recomenda dois diferentes valores: HBM I e HBM II. O valor de HBM I indica o limite abaixo do qual não é esperado efeito adverso à saúde na população geral. Quando as concentrações obtidas estão entre o valor de HBM I e HBM II, não se pode excluir o aparecimento de efeito, e é recomendável verificar os resultados analíticos, investigar as possíveis fontes, que devem ser eliminadas. O valor de HBM II indica o limite acima do qual há um aumento do risco de efeitos adversos à saúde, com necessidade urgente de reduzir a exposição, e fornecer tratamento médico individual (Schulz et al., 2007; 2011). Concentrações obtidas de estudos de biomonitorização que estejam abaixo dos valores de HBM I, mas acima dos valores de referência indicam um nível de exposição claramente acima dos níveis basais, e em tais situações a fonte de exposição deve ser identificada e eliminada, como ação preventiva (Ewers et al., 1999).

7.1.4 Níquel

No Brasil não foram encontrados estudos realizados com o intuito de derivar valores de referência para esse metal, e em outros países foi encontrado somente um trabalho que derivou valor de referência para níquel em sangue na população não exposta na Itália (Minoia et al., 1990). O limite superior do intervalo de referência derivado para adultos italianos com idades entre 23 a 59 anos foi de

3,30 µg/L, valor esse um pouco inferior ao valor de referência derivado no presente estudo considerando o valor estabelecido para adultos maiores de 20 anos, de 3,4 µg/L (tabela 8).

Para fins de comparação dos resultados obtidos neste estudo foram utilizados dados da literatura, cujo objetivo não era o estabelecimento de valores de referência. Os valores de referência derivados no presente estudo, para homens e mulheres acima de 20 anos, foram semelhantes ao limite superior do intervalo de concentração reportado em estudo realizado entre 2007 e 2008, em cinco estados brasileiros, com adultos de 18 a 60 anos (tabela 31).

A comparação dos valores de referência aqui derivados, para adultos acima de 20 anos (tabela 18) com os valores do percentil 95 obtidos em estudos de biomonitorização realizados em outros países (tabela 31), mostra que os valores de referência propostos no presente estudo são superiores aos valores reportados pela Alemanha e Itália (Heitland; Koster, 2006; Alimonti et al., 2005) e inferiores aos de Taiwan e França (Lin; Wu, 2011; Goullé et al., 2005).

Avaliação da concentração de níquel no sangue de adolescentes italianos com idades entre 13 e 15 anos mostrou percentil 95 de 17,9 ug/L para meninos e de 4,16 ug/L para meninas (Pino et al., 2012). Os valores de referência derivados em nosso estudo para a faixa etária entre 12 e 19 anos de 3,6 ug/L e 3,5 ug/L para homens e mulheres, respectivamente, foram inferiores aos percentis reportados para meninos e meninas italianas. Esses resultados mostram que os adolescentes italianos estão expostos a alguma fonte de níquel, que está influenciando os níveis do metal no sangue.

Pela análise multivariada faixa etária, consumo de vísceras e miúdos, consumo de peixe e consumo de frango mostraram-se associados com a concentração de níquel em sangue. Estudo realizado em oito províncias do Japão, com mulheres adultas com idades entre 20 e 81 anos mostrou que as concentrações de níquel diminuem com a idade (Ikeda et al., 2011); esse achado concorda com os resultados obtidos no presente estudo onde se verificou um ligeiro decréscimo da concentração do metal no sangue com o aumento da idade em mulheres.

Neste estudo, pela análise multivariada verificou-se que o consumo de vísceras e miúdos apresenta associação significativa com a concentração de níquel no sangue. Para a população geral a principal via de exposição a metais é pela dieta, e o consumo de certos alimentos, como vísceras ou miúdos de animais, tende a ser positivamente correlacionado com as concentrações de metais no organismo humano. O conteúdo de níquel em vísceras e miúdos de animais é influenciado por sua concentração no ambiente. Alguns trabalhos relataram baixos níveis de níquel, da ordem de 1 mg/kg em fígado, rim e moela de frangos (Abduljaleel et al., 2012; Hassan et al., 2012; Mehmood et al., 2014), no entanto outros estudos encontraram concentrações bem altas de níquel, de até 23 mg/kg no fígado bovino e de 125 mg/kg no fígado de frangos, que podem levar a episódios de intoxicação, caso a frequência de ingestão desses alimentos seja alta (Yabe et al., 2012; Malik et al., 2014).

Neste estudo o consumo de frangos e peixes foram variáveis associadas aos níveis de níquel em sangue. A ingestão de carne de frango contaminada com

altas concentrações de níquel pode explicar o aumento dos níveis do metal no sangue. A contaminação da carne de frango por metais pode ser causada pelo uso de rações e água contaminada em sua alimentação (Akan et al., 2010). Além disso, o processamento de alimentos pode aumentar os níveis de níquel já presentes, possivelmente pela lixiviação do metal nos equipamentos de aço inoxidável utilizados para processar os alimentos (Oliveira, 2003). Não se encontrou na literatura trabalhos que mostraram associação do consumo de vísceras e miúdos, peixe ou de frango com os níveis de níquel em sangue. Assim, estes achados precisam ser confirmados.

7.2 Considerações Finais

Neste estudo a produção de valores de referência seguiu as recomendações da IFCC. Os procedimentos recomendados aplicaram-se às diversas etapas da produção como coleta da amostra, caracterização da população, fatores pré-analíticos, analíticos e método estatístico.

A coleta atingiu o número previsto do tamanho de amostra que era de 500 para ambos os sexos, para os dois grupos (adultos e crianças), totalizando 538 amostras de crianças de 6 a 13 anos e de 786 amostras para o grupo de adultos com mais de 14 anos. Houve pouquíssimas perdas de amostra, pois a logística de amostragem foi bastante criteriosa; após a coleta, as amostras eram mantidas sob refrigeração até o momento da entrega no laboratório, que era feita no mesmo dia, inclusive nos finais de semana e realizados por um grupo contratado para essa

finalidade, que permaneceu o mesmo desde o início até a conclusão da amostragem. Segundo a IFCC e o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomenda-se um mínimo de 120 observações para o estabelecimento de valores de referência. Este número também se aplica para valores de referência determinados em subgrupos (CLSI, 2008). Alguns subgrupos estratificados neste estudo continham menos observações que o recomendado, porém achamos relevante propor essas estratificações, segundo as diversas variáveis, a fim de que esta fonte de informação pudesse ser comparada a outros estudos.

Os indivíduos incluídos no presente estudo foram selecionados com o propósito de propor valores de referência para a população adulta e de crianças saudáveis. Nesse sentido, os participantes não deveriam estar expostos a fontes de emissão aos metais de interesse. Com essa finalidade utilizaram-se critérios de inclusão e exclusão especificamente definidos para a seleção da população, avaliando questões sobre exposição específica e de doenças, que poderiam interferir no propósito do estudo. Dessa forma, as diferenças encontradas nas concentrações dos diversos grupos avaliados deveriam ser atribuídas à variabilidade interindividual, isto é, idade, gênero, hábitos alimentares (influência da dieta, devido ao consumo de determinados alimentos, como peixes, frutos do mar, entre outros). Também foram aplicados questionários para coleta de dados pessoais e socioeconômicos.

Um dos pontos importantes na derivação de valores de referência é o fator analítico. Uma vez que valores de referência representam os níveis basais de exposição é importante a utilização de métodos analíticos sensíveis e confiáveis

capazes de quantificar elementos em níveis de traços e ultra traços, possibilitando então a avaliação da exposição aos analitos de interesse, nessa faixa de concentração. O método analítico empregado (ICP-MS), que foi totalmente validado, possibilitou a quantificação de todas as amostras para chumbo e mercúrio e, praticamente de todas as amostras para níquel, com exceção de duas. No caso do cádmio, a quantificação foi possível para 61% das amostras analisadas.

Valores de referência podem ser apresentados sob a forma de intervalos de referência, reportando dois limites de referência ou simplesmente um único limite, geralmente o superior. Segundo a IFCC, o intervalo de referência representa os limites inferior e superior, contemplando uma porcentagem especificada da distribuição dos dados de referência com seu intervalo de confiança (Solberg, 1987a). Como observado nas fontes pesquisadas a forma mais usual adotada para a representação dos valores de referência é pelos percentis, com apresentação de 95% da distribuição dos dados, porém muitos deles não estão acompanhados pelos respectivos intervalos de confiança. Os valores de referência expressos por um único valor geralmente estão representados pelo valor do percentil 95. O estabelecimento de valores de referência neste estudo foi feito considerando o limite superior do intervalo de confiança a 95% do percentil 95 da distribuição dos valores obtidos de cada metal, e os dados para todos os elementos estudados foram tratados por meio de estatística não paramétrica para derivação desses valores. A Alemanha, que é um dos países que tem tradição no estabelecimento de valores de referência, também expressa o valor de referência

pela mesma forma que a adotada neste estudo, arredondando o valor do limite superior do intervalo de confiança do valor do percentil 95. Além disso, a comissão de biomonitoramento da Alemanha recomenda que a derivação de valores de referência seja feita utilizando-se um método estatístico não paramétrico nos casos em que se tem um grande número de valores abaixo do limite de detecção ou quando a população não é homogênea (Bundesgesundheitsbl, 2009).

A apresentação de valores de referência segundo a recomendação da IFCC deve vir acompanhada de informação sobre a distribuição das concentrações (média ou mediana) e os testes estatísticos aplicados aos dados (por exemplo, testes para verificação de normalidade). Já a comissão alemã de biomonitoramento humano recomenda que a apresentação de valores de referência contemple dados sobre o tamanho da amostra, a proporção de resultados acima do limite de detecção do método utilizado, o intervalo de concentração obtido (valor mínimo e máximo), a mediana, o valor do percentil 95 e se disponível, o intervalo de confiança para esse percentil. Este estudo apresenta todas essas informações.

Apesar do conceito de valores de referência ter sido introduzido há mais de quatro décadas, verificamos que o estabelecimento desses valores ainda é escasso em muitos países, inclusive no Brasil, por envolver alto custo, dificuldade em se obter amostras, e também por envolver muito trabalho.

Neste estudo foi possível avaliar as diferenças nas concentrações dos metais analisados, em sangue de adultos e crianças no município de São Paulo, com as variáveis: idade, gênero, consumo de peixes, hábito de fumar, entre

outras. Estes dados poderão contribuir para a avaliação da exposição humana aos contaminantes metálicos envolvidos neste estudo.

É importante ressaltar que quando alterações nas concentrações de metais no sangue das populações são observadas, os valores de referência estabelecidos nessa população devem ser revistos e atualizados.

Em resumo, os valores de referência neste estudo foram propostos seguindo a recomendação da IFCC, levando-se em consideração o cuidado na seleção dos indivíduos, fatores pré-analíticos e analíticos, e método estatístico, garantindo assim o estabelecimento de valores de referência confiáveis, que poderão ser utilizados para avaliação da exposição humana a metais;

Estudos para derivação de valores de referência devem ser realizados continuamente de forma a possibilitar a obtenção de dados históricos, a fim de avaliar tendências, e ter disponíveis valores de referência atualizados para a correta estimativa da exposição.

Os valores de referência estabelecidos neste estudo poderão subsidiar os órgãos competentes do Ministério da Saúde a definir limites para chumbo, cádmio, mercúrio e níquel para a população não exposta.

Os resultados deste estudo também poderão subsidiar os diagnósticos de exposição ambiental ao chumbo, cádmio, mercúrio e níquel.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

- As concentrações obtidas no presente estudo indicam que a população estudada não está exposta a níveis preocupantes de exposição ao chumbo, cádmio, mercúrio e níquel;
- As concentrações de chumbo no sangue mostraram associação significativa com gênero, hábito de fumar, consumo de vísceras e miúdos, área de moradia e faixa etária. Para cádmio, os fatores que tiveram associação significativa com sua concentração no sangue foram gênero, hábito de fumar, consumo de bebida alcoólica destilada e faixa etária. No caso do mercúrio, faixa etária, consumo de peixes e consumo de vísceras e miúdos apresentaram associação significativa com os níveis desse metal no sangue. Para níquel em sangue, os fatores determinantes foram faixa etária, consumo de peixe, vísceras e miúdos e consumo de frango.

ANEXOS

Anexo I Questionário com critérios para inclusão e exclusão

Distrito: [] []	Sector: [] [] []	Quadra: [] []	Nº arrolamento: [] [] []	Nº Identificação: {ID} [] [] [] []
-------------------	---------------------	-----------------	-----------------------------	--

Determinação de valores de referência para metais de interesse toxicológico na urina e sangue de crianças e adultos da cidade de São Paulo

Endereço: {END} _____ {Nº} _____
Complemento: {COMPL} _____ Bairro: {BAIRRO} _____
Obs: _____
Telefone residencial e celular: {FONE} _____

ENTREVISTADOR: _____
DATA DE REALIZAÇÃO DA ENTREVISTA: ____/____/____
NOME DO (A) ENTREVISTADO (A): _____
NÚMERO DE ORDEM (ver quadro de moradores) _____

QUESTIONÁRIO PARA INCLUSÃO E EXCLUSÃO

MORA no município de São Paulo HÁ MENOS DE UM ANO?	1 - SIM	2 - NÃO	9 - NS/NR	_____
Alcoolismo	1 - SIM	2 - NÃO	9 - NS/NR	_____
Realiza treinamento esportivo profissional?	1 - SIM	2 - NÃO	9 - NS/NR	_____
Realizou colocação de amálgama dentário a menos de cinco dias?	1 - SIM	2 - NÃO	9 - NS/NR	_____
É gestante?	1 - SIM	2 - NÃO	9 - NÃO SE APLICA	9 - NS/NR
Realiza tratamento para Hipertireoidismo (Ex: tapazol, carbazol)?	1 - SIM	2 - NÃO	9 - NS/NR	_____
Possui doenças mentais com incapacidade?	1 - SIM	2 - NÃO	9 - NS/NR	_____
Está acamado (a)?	1 - SIM	2 - NÃO	9 - NS/NR	_____
Realiza tratamento para câncer?	1 - SIM	2 - NÃO	9 - NS/NR	_____
É portador (a) do vírus HIV?	1 - SIM	2 - NÃO	9 - NS/NR	_____
Faz uso de drogas ilícitas? (heroína, ópio, cocaína, anfetamina)	1 - SIM	2 - NÃO	9 - NS/NR	_____
É portador (a) de alguma doença que necessite de uso contínuo de medicação? (nutrição do tipo parenteral, medicação para tumores)	1 - SIM	2 - NÃO	9 - NS/NR	_____
Tem alguma dessas patologias?	SIM	NÃO	NS/NR	
Diabetes Mellitus	1	2	9	_____
Doença crônica do fígado	1	2	9	_____
Doença crônica dos rins	1	2	9	_____
Doença crônica das glândulas endócrinas (paratireóides, supra-renais, hipófise).	1	2	9	_____

Exposição ocupacional

Qual sua ocupação?	SIM	NÃO	NS/NR	
Trabalha com chumbo? (excluir os demais membros da família)	1	2	9	_____
Trabalha com fundição em geral?	1	2	9	_____
Trabalha com metalurgia? (chumbo)	1	2	9	_____
Trabalha com fabricação de lâmpadas?	1	2	9	_____
Trabalha com pintura industrial?	1	2	9	_____
Trabalha com fabricação de jóias/bijuteria?	1	2	9	_____
Trabalha com galvanoplastia?	1	2	9	_____
Trabalha na indústria de cloro/soda	1	2	9	_____

➔ Incluir o morador na amostra somente se todas as respostas anteriores for NÃO.

Morador pode ser incluído no estudo?	1 - SIM	2 - NÃO	9 - NS/NR	_____
--------------------------------------	---------	---------	-----------	-------

Anexo II
Questionário sobre dados gerais, hábitos alimentares, ocupação e renda

Distrito: <input type="text"/>	Sector: <input type="text"/>	Quadra: <input type="text"/>	Nº arrolamento: <input type="text"/>	Nº Identificação: {id} <input type="text"/>
--------------------------------	------------------------------	------------------------------	--------------------------------------	---

DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA PARA METAIS DE INTERESSE TOXICOLÓGICO NA URINA E SANGUE DE CRIANÇAS E ADULTOS DA CIDADE DE SÃO PAULO

ENTREVISTADOR:		
DATA DE REALIZAÇÃO DA ENTREVISTA: <input type="text"/>		
NOME DO (A) ENTREVISTADO (A): <input type="text"/>		
NÚMERO DE ORDEM (ver quadro de moradores)		
DATA DE NASCIMENTO: <input type="text"/>		
SEXO:	1 - MASCULINO	2 - FEMININO
QUAL A SUA COR OU RAÇA? (LER AS ALTERNATIVAS)		
1 - BRANCA	2 - PRETA	3 - AMARELA
4 - PARDA/MORENA	5 - INDÍGENA	9 - NS/NR
- HÁ QUANTO TEMPO RESIDE NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO? ANOTAR EM ANOS (tempo inferior a 1 ANO - anotar 00)		
- HÁ QUANTO TEMPO RESIDE NO ENDEREÇO ATUAL? 1 <input type="text"/> MESES 2 <input type="text"/> ANOS		
ENDEREÇO RESIDENCIAL ANTERIOR		
Rua: <input type="text"/> Nº <input type="text"/>		
Complemento: <input type="text"/> Bairro: <input type="text"/> CEP: <input type="text"/>		
- QUANTO TEMPO RESIDIU NO ENDEREÇO ACIMA? ANOTAR EM ANOS (tempo inferior a 1 ANO - anotar 00)		
- QUAL O TEMPO GASTO PARA IR E VOLTAR AO TRABALHO? ANOTAR EM HORAS - (tempo inferior a 1 HORA - anotar 000)		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> ____ horas 888 - NÃO SE APLICA/NÃO TRABALHA </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> 999 - NS/NR </div>		
QUAL O TEMPO DE PERMANÊNCIA NA MORADIA POR DIA?	1 0 A 6H	2 7 A 12H
	3 13 A 18H	4 19 A 24H
	5 NS/NR	

ALIMENTAÇÃO

- PODERIA ME DIZER COM QUE FREQUÊNCIA CONSOME OS SEGUINTE ALIMENTOS?									
	Todos os dias	Cinco ou seis vezes na semana	Três ou quatro vezes na semana	Uma ou duas vezes na semana	Uma a três vezes no mês	Menos que uma vez por mês	Nunca	NS/NR	
VISCERAS/MIUDOS	1	2	3	4	5	6	7	8	
PEIXE	1	2	3	4	5	6	7	8	
FRUTOS DO MAR	1	2	3	4	5	6	7	8	
CARNE	1	2	3	4	5	6	7	8	
FRANGO	1	2	3	4	5	6	7	8	

HÁBITOS

- PODERIA ME DIZER COM QUE FREQUÊNCIA CONSOME AS SEGUINTE BEBIDAS ALCOÓLICAS?									
	Todos os dias	Cinco ou seis vezes na semana	Três ou quatro vezes na semana	Uma ou duas vezes na semana	Uma a três vezes no mês	Menos que uma vez por mês	Nunca	NS/NR	
DESTILADOS (CACHAÇA, VODKA, WHISKY, CONHAGUE)	1	2	3	4	5	6	7	8	
ESPECIFICAR A QUANTIDADE: (copos)									
VINHO	1	2	3	4	5	6	7	8	
ESPECIFICAR A QUANTIDADE: (copos)									
CERVEJA	1	2	3	4	5	6	7	8	
ESPECIFICAR A QUANTIDADE: (copos)									
OUTROS, ESPECIFICAR: <input type="text"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	
ESPECIFICAR A QUANTIDADE: (copos)									

- FUMA ATUALMENTE?				
1 - SIM	QUANTOS CIGARROS POR DIA? _____			_____
	HÁ QUANTO TEMPO FUMA? ANOTAR EM ANOS (tempo inferior a 1 ANO – anotar 00)		_____ anos	
2 - NÃO, NUNCA FUMOU				
3 - NÃO, EX-FUMANTE	HÁ QUANTO TEMPO PAROU DE FUMAR? ANOTAR EM ANOS (tempo inferior a 1 ANO – anotar 00)		_____ anos	
É HIPERTENSO (A)?				
1 - SIM		2 - NÃO	8 - NS/NR	_____
UTILIZOU OS SEGUINTE MEDICAMENTOS NOS ÚLTIMOS 30 DIAS.				
	SIM	NÃO	NS/NR	
SUPLEMENTO VITAMÍNICO COM CÁLCIO	1	2	8	_____
CENTELHA ASIÁTICA (CHUMBO)	1	2	8	_____
GINKO BILOBA (CHUMBO)	1	2	8	_____
HOMEOPATIA (ARSÊNIO)	1	2	8	_____
ANTIÁCIDOS	1	2	8	_____
XAROPE EXPECTORANTE	1	2	8	_____
POLVIDINE	1	2	8	_____
ÍODO TÓPICO (NA PELE)	1	2	8	_____
EXPOSIÇÃO PRÉVIA A IODOTERAPIA	1	2	8	_____
CONTRASTE PARA EXAMES RADIOLÓGICOS	1	2	8	_____
FAZ USO CONTÍNUO DE MEDICAÇÃO PARA TIREÓIDE (SYNTHROID, PURAN-T4, EUTYROX)	1	2	8	_____
Somente para criança de até _____ anos				
A CRIANÇA FAZ USO DE CHUPETA?	1 - SIM	2 - NÃO	8 - NS/NR	_____
A CRIANÇA CHUPA O DEDO?	1 - SIM	2 - NÃO	8 - NS/NR	_____
A CRIANÇA BRINCA OU PRÁTICA ESPORTE NA TERRA?	1 - SIM	2 - NÃO	8 - NS/NR	_____

Se for menor de 18 anos, encerre o questionário

OCUPAÇÃO (somente para indivíduos com 18 anos e mais)						
TRABALHA ATUALMENTE?			1 - SIM	2 - NÃO	8 - NS/NR	_____
QUAL O RAMO DE ATIVIDADE	1 - Indústria	2 - Comércio	8 - Serviços	8 - NS/NR	_____	
- QUAL A SUA OCUPAÇÃO?			_____			
- QUAL A EMPRESA ONDE TRABALHA? (NOME DA EMPRESA?)			_____			
			8 - Não se aplica/Trabalha em casa (pule para _____)			
- QUAL O ENDEREÇO DA EMPRESA?						
Rua: _____ Nº _____						
Complemento: _____ Bairro: _____ CEP: _____ - _____						
- HÁ QUANTO TEMPO TRABALHA NESTA EMPRESA? ANOTAR EM ANOS (tempo inferior a 1 ANO – anotar 00)			_____ ANOS		_____	
- QUAL A CARGA HORÁRIA DE TRABALHO SEMANAL			_____ HORAS		_____	
2- ATÉ QUE ANO DA ESCOLA COMPLETOU?						
01 - NUNCA FREQUENTOU, NÃO SABE LER E ESCRIVER			07 - CURSOS TÉCNICOS DE NÍVEL MÉDIO INCOMPLETOS			
02 - NUNCA FREQUENTOU, MAS SABE LER E ESCRIVER			08 - CURSOS TÉCNICOS DE NÍVEL MÉDIO COMPLETOS			
03 - ALFABETIZAÇÃO DE ADULTOS			09 - CURSO SUPERIOR INCOMPLETO			
4 - ____ ANO OU SÉRIE (DE 1 A 4) DO 1º GRAU OU PRIMÁRIO			10 - CURSO SUPERIOR COMPLETO			
5 - ____ ANO OU SÉRIE (DE 5 A 8) DO 1º GRAU OU GINÁSIO			11 - PÓS GRADUAÇÃO COMPLETA			
6 - ____ ANO OU SÉRIE (DE 1 A 3) DO 2º GRAU OU COLEGIAL			88 - NS/NR			
QUAL A SUA RENDA MENSAL? (EM SALÁRIOS MÍNIMOS)						
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(9)	_____
Até 1 salário (Até R\$ 380,00)	1 a 3 (de R\$ 381 a R\$ 1140,00)	3 a 5 (de R\$ 1141,00 a R\$ 1900,00)	5 a 10 (de R\$ 1901,00 a R\$ 3800,00)	+ de 10 Acima de R\$ 3801,00	NS/NR	

Anexo III
Questionário sócio-econômico

Distrito: <input type="text"/>	Setor: <input type="text"/>	Quadra: <input type="text"/>	Nº arrolamento: <input type="text"/>	Nº Identificação: (ID) <input type="text"/>
--------------------------------	-----------------------------	------------------------------	--------------------------------------	---

SÓCIO-ECONÔMICO							
- O DOMICÍLIO ESTÁ LOCALIZADO EM FAVELA?	1 - SIM	2 - NÃO	8 - NS/NR	<input type="text"/>			
POSSUI QUINTAL COM TERRA?	1 - SIM	2 - NÃO	8 - NS/NR	<input type="text"/>			
A RESIDÊNCIA ESTÁ LIGADA À REDE DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA TRATADA?	1 - SIM	2 - NÃO	8 - NS/NR	<input type="text"/>			
QUAL O TIPO DE ENCANAMENTO PARA ÁGUA?	1 - CHUMBO	2 - FERRO	3 - PVC	8 - NS/NR <input type="text"/>			
A RESIDÊNCIA ESTÁ LIGADA À REDE DE TRATAMENTO DE ESGOTO?	1 - SIM	2 - NÃO	8 - NS/NR	<input type="text"/>			
EXISTE PAVIMENTAÇÃO (ASFALTO OU PARALELEPÍEDO) NA RUA ONDE SE LOCALIZA O DOMICÍLIO?	1 - SIM	2 - NÃO	8 - NS/NR	<input type="text"/>			
QUAL A INTENSIDADE DE TRÁFEGO DE VEÍCULOS NA RUA DA RESIDÊNCIA	1 - BAIXA	2 - MÉDIA	3 - ALTA/INTENSA	8 - NS/NR <input type="text"/>			
TRABALHA ATUALMENTE?	1 - SIM	2 - NÃO	8 - NS/NR	<input type="text"/>			
QUAL O RAMO DE ATIVIDADE	1 - Indústria	2 - Comércio	8 - Serviços	8 - NS/NR <input type="text"/>			
- QUAL A SUA OCUPAÇÃO?				<input type="text"/>			
- QUAL A EMPRESA ONDE TRABALHA? (NOME DA EMPRESA?)				<input type="text"/>			
8 - Não se aplica/Trabalha em casa (pule para _____)							
- QUAL O ENDEREÇO DA EMPRESA?							
Rua: _____ Nº _____							
Complemento: _____ Bairro: _____ CEP: _____ - _____							
- HÁ QUANTO TEMPO TRABALHA NESTA EMPRESA? ANOTAR EM ANOS (tempo inferior a 1 ANO - anotar 00)				_____, ANOS <input type="text"/>			
- QUAL A CARGA HORÁRIA DE TRABALHO SEMANAL				_____, HORAS <input type="text"/>			
2- ATÉ QUE ANO DA ESCOLA COMPLETOU?							
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> 01 - NUNCA FREQUENTOU, NÃO SABE LER E ESCRIVER 02 - NUNCA FREQUENTOU, MAS SABE LER E ESCRIVER 03 - ALFABETIZAÇÃO DE ADULTOS 4 - ____ ANO OU SÉRIE (DE 1 A 4) DO 1º GRAU OU PRIMÁRIO 6 - ____ ANO OU SÉRIE (DE 5 A 8) DO 1º GRAU OU GINÁSIO 8 - ____ ANO OU SÉRIE (DE 1 A 3) DO 2º GRAU OU COLEGIAL </div> <div style="width: 45%;"> 07 - CURSOS TÉCNICOS DE NÍVEL MÉDIO INCOMPLETOS 08 - CURSOS TÉCNICOS DE NÍVEL MÉDIO COMPLETOS 09 - CURSO SUPERIOR INCOMPLETO 10 - CURSO SUPERIOR COMPLETO 11 - PÓS GRADUAÇÃO COMPLETA 88 - NS/NR </div> </div>							
QUAL A RENDA DO CHEFE FAMÍLIA? (EM SALÁRIOS MÍNIMOS)	(1) Até 1 salário (Até R\$ 380,00)	(2) 1 a 3 (de R\$ 381 a R\$ 1140,00)	(3) 3 a 5 (de R\$ 1141,00 a R\$ 1900,00)	(4) 5 a 10 (de R\$ 1901,00 a R\$ 3800,00)	(5) + de 10 Acima de R\$ 3801,00	(9) NS/NR	<input type="text"/>
QUAL A RENDA TOTAL DA FAMÍLIA? (EM SALÁRIOS MÍNIMOS)	(1) Até 1 salário (Até R\$ 380,00)	(2) 1 a 3 (de R\$ 381 a R\$ 1140,00)	(3) 3 a 5 (de R\$ 1141,00 a R\$ 1900,00)	(4) 5 a 10 (de R\$ 1901,00 a R\$ 3800,00)	(5) + de 10 Acima de R\$ 3801,00	(9) NS/NR	<input type="text"/>

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO

RESPONSÁVEIS PELO ESTUDO:

Nome do Participante:

Nome do Responsável:

Telephone: ()

E-mail:

A presente investigação visa conhecer os níveis de metais em amostra da população sadia do município de São Paulo, comparando-os com os de outros países que já realizaram este acompanhamento contribuindo para orientar possíveis medidas de controle caso sejam necessárias. Servirá também de parâmetro de comparação para o diagnóstico de exposição de populações residentes em áreas contaminadas, uma vez que irá estabelecer os níveis rotineiros de concentração de metais no organismo dos residentes no município.

Será coletada amostra de sangue através de punção venosa com seringa e agulhas esterilizadas descartáveis. Será coletada amostra de urina em frasco plástico padronizado.

As amostras coletadas serão encaminhadas para o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (Seção de Equipamentos Especializados) para realização de dosagens de metais pesados.

EFEITOS ADVERSOS OU COLATERAIS possíveis de ocorrer:

Os dois procedimentos a que se submeterá o participante são relativamente inócuos e de baixo risco de ocorrência de efeitos adversos. Efeitos adversos possíveis de ocorrer no presente estudo referem-se a acidentes com a punção venosa, que embora realizadas por pessoal qualificado, pode promover o aparecimento de hematomas e infecção local (abscesso). No caso de ocorrência de qualquer efeito adverso, atendimento médico será fornecido ao participante sem qualquer ônus financeiro para o mesmo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O participante, durante o período de estudo, terá garantia de receber resposta adequada a qualquer pergunta ou pedido de esclarecimento por parte do médico toxicologista responsável: Dr. Eduardo Mello De Capitani – Telefone: UNICAMP (019) 3289-1217. O participante poderá deixar de participar do estudo a qualquer momento. Durante o estudo, o participante deverá ser informado sobre conclusões ou resultados de exames, mesmo que parciais. Os entrevistados que apresentarem níveis de metais no sangue e/ou urina não considerados seguros deverão ser encaminhados para exame médico em consulta previamente agendada com médico toxicologista da UNICAMP, no ambulatório da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, localizado no complexo hospitalar do Hospital das Clínicas de São Paulo. Os resultados dos exames serão encaminhados a todos os participantes via correio. O sigilo das informações será garantido no sentido de zelar pela privacidade do participante durante e após o estudo, ou quando da possível publicação dos resultados.

NOME E TELEFONE DO MÉDICO TOXICOLOGISTA RESPONSÁVEL:

Dr. Eduardo Mello De Capitani Telefone: UNICAMP (019) 3289-1217

São Paulo, _____ de _____ de 2001.

ASS.: Participante após conhecimento do conteúdo deste documento,

ASS.: Testemunha presente à leitura do presente documento,

MAIORES ESCLARECIMENTOS SOBRE ESTA PESQUISA:

CVE(Centro de Vigilância Epidemiológica) da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo 0800555466 (todos os dias inclusive finais de semana)
<http://www.cve.saude.sp.gov.br>

Anexo V

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **15.09.10**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **260/10** intitulado: "**Determinação de Valores de Referência para metais de interesse toxicológico em sangue de crianças e adultos da cidade de São Paulo.**" e seus anexos, apresentado pelo Departamento de **Medicina Preventiva**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa .

Pesquisador (a) Responsável: Nelson da Cruz Gouveia

Pesquisador (a) Executante: Carmen Silvia Kira

CEP-FMUSP, 15 de setembro de 2010.

HERACLEITO BARBOSA DE CARVALHO
Coordenador do Programa de Pós-Graduação do
Deplo. de Medicina Preventiva (Suplente)

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cep.fmusp@hcnnet.usp.br

Anexo VI

Artigo aceito para publicação

Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 4 (05), pp. XXX-XXX, May, 2014

Available online at <http://www.japsonline.com>

DOI: 10.7324/JAPS.2014.4XXX

ISSN 2231-3354

Fast and simple multi-element determination of essential and toxic metals in whole blood with quadrupole ICP-MS

Carmen Silvia Kira^{1*}, Alice Momoyo Sakuma², Nelson da Cruz Gouveia³

¹ Food Center, Instituto Adolfo Lutz – Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brazil, ² Reference Materials Center, Instituto Adolfo Lutz – Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brazil, ³ Department of Preventive Medicine, Faculty of Medicine, University of São Paulo – Av. Dr. Arnaldo, 455, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brazil.

ARTICLE INFO

Article history:

Received on: XXXXX/XXXX

Revised on: XXXXX/XXXX

Accepted on: XXXXX/XXXX

Available online:

Key words:

Inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-MS; Whole blood; Metals; Validation method.

ABSTRACT

The development of reliable and sensitive methods for elements quantification in low-level concentration is a necessary requirement to detect increases or deficiencies considered unusual in human body. In this sense the sensitivity and selectivity of mass spectrometric methods are particularly appropriate to deal with this issue since many elements in biological material are at extremely low concentration levels and necessity to be monitored. Simultaneous determination of Be, Bi, Ba, Pb, Pd, Pt, Rh, Ni, V, Cr, Mn, As, Cd, Mo, Co, Hg, Tl, Sr, Sb, Se, Cu and Zn in whole blood by ICP-MS is described. Sample preparation consisted of a simple dilution (twenty-fold) with 0.05% Triton X-100 in 0.2% HNO₃. The method proved to be accurate (accuracy ranged from 88.9% to 108%), precise (CV was below 5% for all elements) and sensitive (LOQ were below 1 µg L⁻¹ for most of the studied elements). Use of DRC was only necessary for chromium and vanadium determination in blood. The proposed method uses low quantities of blood and this feature is essential when analyzes involve human biological samples. The obtained results show the applicability of the developed methodology for the rapid, sensitive and simultaneous determination of inorganic constituents in whole blood.

INTRODUCTION

Technological development has been reflected in the increase of xenobiotics in the environment. Therefore differences between occupational and environmental exposure are becoming significantly smaller (Paoliello *et al.*, 1997). This fact contributes and accentuates the necessity to monitor that aim to identify exposure sources and assess the exposure distribution in the general population (Kuno *et al.*, 2010; Heitland and Köster, 2004). Biomonitoring then becomes an important tool to estimate human exposure to contaminants and their concentrations in the blood is generally used as a biomarker (Barbosa Jr, 2005; Needham *et al.*, 2007; Palmer *et al.*, 2006; Apostoli, 2002). This implies in an increasing necessity of more sensitive and especially faster methods with minimal sample handling. In the past many determinations were correlated to mono-elemental analyzes such as lead or cadmium in whole blood, but currently multielement methods in biological material became more common due to

technological advances. In this sense inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) a multi-element technique with appropriate sensitivity is progressively replacing conventional techniques as atomic absorption or electrochemical methods (Fong *et al.*, 2007; D'Ilio *et al.*, 2008; Goullé *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2002). Although these techniques may achieve the required sensitivity to determine elements at trace levels, they are lacking in speed and ease to use. ICP-MS could be very useful for a wide range of clinical applications because the great sensitivity acquired in this technique with low detection limits enabling toxicologists to sufficiently estimate the toxic levels and environmental metal exposure (Parsons and Barbosa Jr, 2007; Ammann, 2007; D'Ilio *et al.*, 2006; Bárány *et al.*, 1997; Rivero Martino *et al.*, 2000; Sarrago Muñoz *et al.*, 1999). Furthermore, this method offers new possibilities in several fields such as clinical chemistry, clinical toxicology, forensic toxicology as well as workplace testing or environmental exposure and also applicable in epidemiological studies (Bortoli *et al.*, 1992). The development of reliable and sensitive methods for elements quantification in low-level concentration is a necessary requirement to detect increases or deficiencies considered unusual in human body.

* Corresponding Author

Carmen Silvia Kira,

Email: carmenkira@gmail.com

Table 3: Concentrations of the elements in calibration curve (in $\mu\text{g L}^{-1}$).

Elements	Std 1 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Std 2 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Std 3 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Std 4 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Std 5 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Be, Sr, Rh, Pd, Sb, Pt, Ti, Pb, Bi, Ba	1	2	5	10	20
Ni, V, Cr	2	4	10	20	40
Mn, Co, As, Mo, Cd	0.5	1	2.5	5	10
Se, Cu	10	20	50	100	200
Hg	0.2	0.4	1	2	4
Zn	50	100	250	500	1000

Sample preparation

Blood samples was left at room temperature and mixed well for a few minutes to homogenize with a vortex mixer. After homogenization, 0.25 mL of whole blood was accurately transferred into a 15 mL polyethylene tube with 4.55 mL of diluent solution (0.05% (v/v) Triton X-100 + 0.2% (v/v) HNO_3 , mixed on a vortex mixer) following addition of 0.2 mL multi-element standard solution that corresponds to the second point of calibration curve. Samples were then thoroughly mixed.

RESULTS AND DISCUSSION**Selection of the internal standard**

In ICP-MS the internal standard element should not be present in the samples and should be added to all blanks, standards and samples in equal concentrations. The behavior of the internal standard elements in the plasma is dependent on atomic mass and ionization efficiency. Internal standards are used to correct variations in signal intensity due to instrument instability and non-spectral interferences (suppression or enhancement of the signal caused by the matrix) (Vanhaecke et al., 1992; Paquette et al., 2010). Existing methods in literature for the determination of trace elements in biological materials have used rhodium or bismuth as internal standards. Selection of different internal standards was proposed in this study since Rh and Bi were one of the target elements to be analyzed. Internal standards were selected based on their performance regarding to precision and accuracy for elements determination in whole blood samples unspiked and spiked in concentrations equivalent to the first and second point of the calibration curve. Ge, Re, In and Sc were selected as internal standard. Concentrations of $5 \mu\text{g L}^{-1}$ and $40 \mu\text{g L}^{-1}$ of internal standards were tested and best results were obtained with concentration of $5 \mu\text{g L}^{-1}$, which was chosen. Although ^{45}Sc has no mass number close to beryllium it worked as well as internal standard. In addition, ^{45}Sc has been used as internal standard element for the low-mass regions (mass range: 6-70) (De Boer et al., 2004).

Optimization of Dynamic Reaction Cell (DRC) operating conditions

Use of Dynamic Reaction Cell (DRC) was preliminary tested for chromium, vanadium, nickel, manganese, selenium, barium, copper and zinc. DRC operating conditions (optimization of NH_3 flow rate and Rejection Parameter q (RPq parameter)) were determined by scanning the ion signal for various rejection

parameter q (RPq) settings and cell gas in blood sample unspiked and blood sample spiked with $2 \mu\text{g L}^{-1}$ of chromium, vanadium and nickel, $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ of manganese, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of selenium, $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of barium, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of copper and $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of zinc. NH_3 flow rate was varied in the range of $0.1 - 1 \text{ mL min}^{-1}$ in steps of 0.1 mL min^{-1} , and RPq was varied in the range of $0.45 - 0.8$ in steps of 0.05 . For Cu^{65} , Zn^{66} and Zn^{68} background equivalent concentrations (BEC) were higher than $5 \mu\text{g L}^{-1}$ and sensitivities were very low (intensity signal of 200 cps) in various RPq settings and ammonia flow rates as described above. Thus, the bandpass settings were not optimized for these isotopes. The lower background equivalent concentrations (BEC) were achieved for NH_3 flow rate of 0.8 mL min^{-1} for V, Cr and Ni and 0.6 mL min^{-1} for Mn, Se and Ba. The maximum ratio of the intensity of signal per background could be obtained with RPq values of 0.7 for V^{51} , Cr^{52} , Ba^{135} and Ba^{138} , 0.6 for Cr^{53} , 0.75 for Ni^{60} , Se^{78} and Se^{82} , 0.45 for Mn^{55} , 0.55 for Se^{77} and 0.65 for Ba^{137} . To evaluate the DRC performance for determination of V, Cr, Ba, Ni, Se and Mn, blood samples were fortified with $2 \mu\text{g L}^{-1}$ of chromium, vanadium and nickel, $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ of manganese, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of selenium and $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of barium. In Table 4 the influence of DRC on the recoveries in the fortified blood samples is reported. Best recoveries for Ni, Mn, Se and Ba were achieved without the use of DRC-ICP-MS. On the other hand, the use of DRC improved the recoveries in blood samples for Cr and V using an RPq value of 0.7 and a NH_3 flow rate of 0.8 mL min^{-1} .

Table 4: Recoveries obtained in blood samples with and without use of DRC conditions.

Analyte	Concentration added ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Without use of DRC conditions Recup (%)	With use of DRC conditions Recup (%)
Cr^{52}	2.0	90.3	101.5
Cr^{53}	2.0	106.8	102.7
V^{51}	2.0	103.9	91.6
Ni^{60}	2.0	99.8	96.4
Mn^{55}	0.5	104.8	109.6
Se^{77}	10.0	102.0	67.9
Se^{78}	10.0	102.1	58.5
Se^{82}	10.0	102.1	68.6
Ba^{135}	1.0	98.3	83.9
Ba^{137}	1.0	98.5	73.8
Ba^{138}	1.0	99.2	70.1

^a n = 6 replicates

Validation

In order to assess the proposed method validation studies were performed. Following parameters were established with fortified samples: linearity, selectivity, accuracy, precision, detection limit and quantification limit. Due to unavailability of having a certified reference material containing all the elements studied the validation of the proposed method was performed by fortification means in whole blood sample. In addition, according to the commission of the European Communities (2002) when no CRM are available, it is acceptable that trueness of measurements is assessed through recovery of additions of known amounts of the analyte (s) to a matrix. Linearity was evaluated in the elements

working range (0,1,2,5,10 and 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Be, Sr, Rh, Pd, Sb, Pt, Tl, Pb, Bi and Ba; 0,2,4,10,20 and 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Ni, V and Cr; 0,0,5,1,2,5,5 and 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Mn, Co, As, Mo and Cd; 0,10,20,50,100 and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Se and Cu; 0,0,2,0,4,1,2 and 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Hg; 0,50,100,250,500 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Zn). Three independent replicates at each concentration level of the calibration curve were used to test the linearity. The verification of the outliers' absence was made by Grubbs test while data homocedasticity was checked by Cochran test. Results are presented in Table 5. As variances for all elements were considered equal along the tested curve it could be possible to apply the linear regression by the method of least squares. The linearity of the method was then verified by the linear regression equation determined and the residuals graph was plotted in order to verify experimental points deviation from the fitted line (not shown). It was observed an acceptable fit with a random pattern. Each element showed linearity from the first point of the calibration curve to the last point of the curve with correlation coefficient above 0.99 for all elements (Table 7). The results showed goodness of fit evidence and linearity was considered satisfactory. Calibration curve was matrix-matched with human whole blood.

Table 5: Comparison of variances by Cochran test applied to three independent replicates of each point of the calibration curve.

Cochran test			
Analyte	C critical (I=5, n=3)	C calculated	Conclusion ^a
⁹ Be	0.6838	0.6326	+
⁵⁵ Mn	0.6838	0.5872	+
⁵⁹ Co	0.6838	0.6543	+
⁵⁸ Ni	0.6838	0.6741	+
⁶⁵ Cu	0.6838	0.3698	+
⁶⁶ Zn	0.6838	0.5003	+
⁶⁸ Zn	0.6838	0.5069	+
⁷⁵ As	0.6838	0.6752	+
⁷⁶ Se	0.6838	0.4993	+
⁷⁸ Se	0.6838	0.4644	+
⁸² Se	0.6838	0.2129	+
⁸⁸ Sr	0.6838	0.3167	+
⁹⁶ Mo	0.6838	0.3854	+
¹⁰³ Rh	0.6838	0.6293	+
¹⁰⁵ Pd	0.6838	0.5338	+
¹⁰⁶ Pd	0.6838	0.5471	+
¹⁰⁸ Pd	0.6838	0.5659	+
¹¹¹ Cd	0.6838	0.4933	+
¹¹² Cd	0.6838	0.5617	+
¹¹⁴ Cd	0.6838	0.4830	+
¹²¹ Sb	0.6838	0.5769	+
¹²³ Sb	0.6838	0.5951	+
¹⁹⁴ Pt	0.6838	0.5948	+
¹⁹⁵ Pt	0.6838	0.2098	+
¹⁹⁶ Pt	0.6838	0.5901	+
²⁰⁰ Hg	0.6838	0.6051	+
²⁰³ Tl	0.6838	0.6640	+
²⁰⁸ Pb	0.6838	0.4221	+
²⁰⁷ Pb	0.6838	0.4028	+
²⁰⁹ Pb	0.6838	0.6313	+
²⁰⁹ Bi	0.6838	0.6206	+
¹³⁸ Ba	0.6838	0.4826	+
¹³⁵ Ba	0.6838	0.6450	+
¹³⁷ Ba	0.6838	0.4885	+
⁵² Cr	0.6838	0.6245	+
⁵¹ V	0.6838	0.4450	+

^a If C calculated < C critical: homocedastic (equal variances) +: homocedastic; number of points of the calibration curve n: number of replicates

For each standard curve an unweighted least-squares linear regression of the response (counts/s) as a function of the nominal concentrations was applied (formula: $y = b + ax$, where x = concentration in $\mu\text{g L}^{-1}$, y = counts/s, a = slope and b = intercept). Typical calibration parameters (slope and intercept) were given in Table 7. Selectivity refers to the extent of the method to determine a certain analyte in the presence of other sample components (Codex, 2009). In ICP-MS technique spectral overlaps may be caused by polyatomic and isobaric interferences (D'Ilio *et al.*, 2011). These interferences can lead to overestimation of analyte concentration and the ways to overcome this problem would be choose an alternative isotope, use correction equations or use the dynamic reaction cell (DRC) technology. For Cr^{52} and V^{51} potential interferences were overcome by the use of DRC (see "optimization of DRC operating conditions"). To check the specificity of the method recoveries of fortified samples were measured. Observed concentrations and actual concentrations for all isotopes were quite consistent. Furthermore for the elements that have more than one isotope (Zn, Se, Pd, Cd, Sb, Pt, Pb and Ba) results obtained for these spiked samples were quite similar among the analyte different mass (see Table 6). As a consequence, the specificity of the method was considered acceptable. Accuracy was investigated by means of average recoveries for six replicates of pool blood sample fortified with elements in concentrations equivalent to the first point of the calibration curve. Obtained results were ranged from 88.9% to 108.0% for within-day accuracy while the range for between-day was 96.7% to 109.1% (Table 6). According to AOAC guidelines acceptable recovery ranged from 75% to 120% at the 1 $\mu\text{g/kg}$ concentration (AOAC, 2002). Average recoveries for selenium and barium around 90% were lower than obtained recoveries for the other elements, but the results were in compliance with the specifications of AOAC criterion. The method precision was determined from replicate determinations of six independent preparations in whole blood fortified with concentrations of the elements equivalent to the first point of the calibration curve and assessed by coefficient of variation. Inter-assay accuracy and precision was estimated by carrying out twelve replicate assays on a sample of whole blood fortified for two weeks. The within (assays performed at the same day) and between-day accuracy and precision of the assay are summarized in Table 6. The observed values were within the acceptance criteria (AOAC, 2002). Detection limit (LD) was calculated as three deviation standard and quantification limit (LQ) was calculated as ten deviation standard from six independent replicates of pool human blood sample diluted twenty times and fortified with elements corresponding to the first point of the calibration curve. Quantification limits for copper and zinc were the highest compared to the others elements. The explanation for this is that Cu and Zn are major elements present in high concentration in blood. The results were showed in Table 7. Analysis of blood samples after twenty-fold dilution for the determination of 22 elements showed no deterioration in the quantification limits of the method since LQ for most elements were below 1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Table 6: Summary of within and between-day accuracy and precision results for elements in fortified whole blood sample.

Analyte	Actual conc. (ug L ⁻¹)	Parameters					
		Within-day*			Between-day**		
		Observed conc. (ug L ⁻¹)	Recup (%)	CV (%)	Observed conc. (ug L ⁻¹)	Recup (%)	CV (%)
⁹ Be	1.0	1.04	104.0	4.0	1.06	107.8	4.7
⁵⁵ Mn	0.5	0.51	102.7	1.6	0.53	105.2	4.2
⁵⁹ Co	0.5	0.52	104.0	1.2	0.54	107.4	2.6
⁶⁰ Ni	2.0	1.96	98.1	1.7	1.99	102.6	3.8
⁶⁵ Cu	10.0	9.82	98.2	1.8	9.96	105.7	7.9
⁶⁶ Zn	50.0	48.78	97.6	3.0	50.86	99.6	11.0
⁶⁸ Zn	50.0	49.59	99.2	2.7	51.19	99.7	9.6
⁷⁵ As	0.5	0.50	100.4	3.2	0.50	101.4	4.1
⁷⁷ Se	10.0	9.86	98.6	2.0	9.87	100.1	2.7
⁷⁸ Se	10.0	9.39	93.9	3.8	9.67	96.7	2.6
⁸² Se	10.0	9.79	97.9	2.1	9.98	102.6	3.9
⁸⁸ Sr	1.0	0.95	94.6	3.2	0.97	101.7	6.6
⁹⁰ Mo	0.5	0.48	95.3	2.4	0.48	98.4	3.1
¹⁰³ Rh	1.0	1.02	101.8	0.9	1.05	104.4	2.8
¹⁰⁵ Pd	1.0	1.01	101.5	2.1	1.03	104.6	3.4
¹⁰⁶ Pd	1.0	1.02	101.6	3.1	1.02	104.7	5.4
¹⁰⁸ Pd	1.0	1.01	101.3	1.4	1.04	104.1	3.8
¹¹¹ Cd	0.5	0.51	102.3	1.7	0.51	102.6	1.8
¹¹² Cd	0.5	0.50	100.8	2.0	0.52	102.9	4.9
¹¹⁴ Cd	0.5	0.51	102.9	2.0	0.53	104.0	5.4
¹²¹ Sb	1.0	1.00	100.0	1.1	1.01	101.1	3.5
¹²³ Sb	1.0	0.99	99.2	0.7	1.01	100.7	3.5
¹⁹⁴ Pt	1.0	1.01	100.6	1.5	1.01	103.2	1.5
¹⁹⁵ Pt	1.0	1.01	100.9	1.0	1.03	103.6	2.9
¹⁹⁶ Pt	1.0	1.01	100.6	2.2	1.02	102.8	1.9
²⁰² Hg	0.2	0.20	101.0	1.4	0.2	107.0	4.4
²⁰³ Tl	1.0	1.03	102.7	1.5	1.05	104.9	2.3
²⁰⁶ Pb	1.0	1.08	107.5	1.8	1.09	108.7	2.8
²⁰⁷ Pb	1.0	1.07	107.4	2.5	1.08	107.6	3.1
²⁰⁸ Pb	1.0	1.08	108.0	1.9	1.09	109.1	3.0
²⁰⁹ Bi	1.0	1.00	99.6	1.4	1.00	100.4	2.2
¹³⁸ Ba	1.0	0.93	92.7	2.6	0.96	99.8	4.3
¹³⁵ Ba	1.0	0.93	92.6	3.7	0.96	99.9	5.1
¹³⁷ Ba	1.0	0.89	88.9	2.7	0.94	100.0	6.4
⁵² Cr	2.0	1.97	98.7	2.8	2.04	106.0	3.8
⁵¹ V	2.0	2.07	103.5	4.4	2.22	107.1	8.8

* mean (n = 6)

** mean (n=12)

Table 7: Detection limits and Quantification limits of the method (ug L⁻¹), slope, intercept and correlation coefficient of the calibration curve (r2)

Analyte	LD (ug L ⁻¹)*	LQ (ug L ⁻¹)*	Slope** (ug L ⁻¹)	Intercept** (ug L ⁻¹)	Correlation coefficient (r2)
⁹ Be	0.08	0.26	1.0119	0.0842	0.9992
⁵⁵ Mn	0.06	0.21	1.0205	-0.0133	0.9994
⁵⁹ Co	0.02	0.07	1.0198	-0.0097	0.9997
⁶⁰ Ni	0.11	0.37	1.0314	0.1324	0.9998
⁶⁵ Cu	2.83	9.43	1.0013	0.1751	0.9993
⁶⁶ Zn	19.9	66.3	1.0540	291.7248	0.9996
⁶⁸ Zn	18.2	60.7	1.0564	297.9272	0.9994
⁷⁵ As	0.07	0.25	1.0013	0.0427	0.9994
⁷⁷ Se	0.92	3.08	1.0104	0.0025	0.9998
⁷⁸ Se	1.43	4.75	1.0201	-0.6422	0.9999
⁸² Se	0.96	3.20	1.0276	-0.6797	0.9996
⁸⁸ Sr	0.18	0.60	1.0313	-0.0402	0.9991
⁹⁸ Mo	0.04	0.12	1.0274	0.0286	0.9998
¹⁰³ Rh	0.03	0.09	1.0028	-0.0013	0.9998
¹⁰⁵ Pd	0.06	0.21	0.9927	0.0385	0.9996
¹⁰⁶ Pd	0.10	0.32	1.0021	0.0312	0.9998
¹⁰⁸ Pd	0.04	0.15	0.9991	0.0205	0.9997
¹¹¹ Cd	0.03	0.09	1.0023	0.0224	0.9997
¹¹² Cd	0.03	0.10	1.0163	0.0031	0.9995
¹¹⁴ Cd	0.03	0.11	1.0083	0.0340	0.9996
¹²¹ Sb	0.04	0.12	0.9941	0.1189	0.9998
¹²³ Sb	0.02	0.08	0.9806	0.1562	0.9996
¹⁹⁴ Pt	0.04	0.15	0.9969	0.0714	0.9994
¹⁹⁵ Pt	0.03	0.10	0.9994	0.0540	0.9997
¹⁹⁶ Pt	0.07	0.22	0.9918	0.0897	0.9993
²⁰² Hg	0.01	0.04	1.0091	0.1070	0.9986
²⁰³ Tl	0.05	0.15	1.0022	0.0209	0.9997
²⁰⁶ Pb	0.27	0.91	1.0050	0.0999	0.9997
²⁰⁷ Pb	0.29	0.96	1.0056	0.0950	0.9996
²⁰⁸ Pb	0.30	0.99	1.0017	0.0968	0.9998

209Bi	0.04	0.14	1.0006	0.0353	0.9998
138Ba	0.08	0.25	0.9997	0.0524	0.9997
135Ba	0.10	0.35	0.9952	0.0648	0.9998
137Ba	0.08	0.26	0.9972	0.0601	0.9999
52Cr	0.16	0.54	1.0056	0.0960	0.9998
51V	0.16	0.52	1.0085	0.0019	0.9999
*n = 6 LD (detection limit) LQ (quantification limit) **n = 3					

Sample preparation

In the literature sample preparation procedures for analysis of blood by ICP-MS commonly involve digestion and dilution of the sample. The high organic matter content in whole blood can cause carbon deposition in the ICP-MS introduction system. This results in analytical signal suppression (Lemos and Carvalho, 2010). Furthermore direct analysis of samples with high organic matrix contents causes the plasma to be extinguished. Thus, it is important to apply one of the pretreatment of sample above mentioned. The digestion procedure consists in the destruction of organic matter of the sample using different acids or mixture of acids and hydrogen peroxide (Bolann *et al.*, 2007). This approach can reduce spectral and non-spectral interference problems, but has the risk of introducing contamination. Nowadays sample digestion using microwave is an interesting method (Kadar *et al.*, 2011; Pick *et al.*, 2010).3 Dilution is a way to reduce matrix effect of the sample and many studies report the use of different diluents applied to whole blood samples. Some of them include the use of diluted acid with Triton X-100 (Palmer *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2009), a non-ionic surfactant, which promotes the solubilization of proteins present in this matrix thereby preventing clogging on the nebulizer, sampler and skimmer cone (Mesko *et al.*, 2011; McShane *et al.*, 2008). On the other hand aqueous dilution of whole blood provokes precipitation of red cells (Subramanian, 1996). Methods in literature also report the use of phosphate and EDTA solutions (Bonnefoy *et al.*, 2002; Bonnefoy *et al.*, 2005; Krachler *et al.*, 2009) to improve the stability of the diluted blood solution preventing precipitation (Subramanian, 1996), but EDTA is hard to obtain in a pure form (Lemos and Carvalho, 2010). Direct dilution of whole blood can also be carried out with tetramethyl ammonium hydroxide (TMAH) which also aid in protein solubility and stability of the sample solution (Subramanian, 1996; McShane *et al.*, 2008). However, the TMAH solubilization has the disadvantage of presenting limited time-stability of the sample solution (Subramanian, 1996). Another approach is the use of butanol (Bonnefoy *et al.*, 2002; 2005), ethanol or propanol to increase the analytical signal and reduce carbon buildup on the cones (Subramanian, 1996; McShane *et al.*, 2008). First we tried to digest the sample blood by dry ashing but the time spent was too long. Furthermore, it was difficult to solubilize the digested sample with low acid concentration. Thus, we chose to use the procedure for diluting the blood sample with Triton in acid medium and subsequent reading of the sample directly on ICP-MS. The use of Triton X-100 improved the washout of the sample after the analysis and no blockages were observed during the analysis. After measuring 250 to 375 blood samples, that took five

days of measuring, the sample introduction system and torch were cleaned with diluted acid solution (10% (v/v) HNO₃) followed by rinsing with Milli-Q water. At the same time cones were cleaned with diluted acid solution (1% (v/v) HNO₃) and lenses were cleaned with Milli-Q water. Mercury memory effect is the major problem in mercury analysis by ICP-MS. Mercury adheres to the spray chamber wall (known as carryover problems or memory effects) and remains as vapor in the spray chamber and could be released during subsequent analyses (Fong *et al.*, 2007). In order to overcoming this problem gold, considered one of the most effective washout agents, was added to diluent to improve the washout for Hg. Use of gold prevents mercury volatilization and adsorption losses. When gold was removed from the diluent poorer precision was achieved. The suggested method involved simple dilution of the sample and proved to be fast since it enabled the simultaneous determination of 22 elements in just 4:22 minutes.

CONCLUSION

The proposed method uses low quantities of blood and this feature is essential when analyzes involve human biological samples. In conclusion, the proposed method for determining inorganic elements in human blood samples proved to be accurate, precise, sensitive, and for most elements limits of quantification were below 1 µg L⁻¹. The between-day percentage recovery ranged from 96.7% to 109.1%. The between-day precision did not exceed 11% for all analytes. Dynamic reaction cell (DRC) is an important tool in ICP-MS analysis for reduction or elimination of spectral interferences and its use was only necessary for chromium and vanadium determination in blood matrix. The proposed method requires minimal sample preparation involving a simple dilution. This fact contributes for its application in routine laboratory analysis for environmental and occupational monitoring studies.

The simultaneous inorganic elements determination in blood may be relevant since it may be useful as a quick and reliable research tool in public health and other areas.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

REFERENCES

- Ammann AA. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS): a versatile tool. *J Mass Spectrom*, 2007; 42: 419-27.
- AOAC. 2002. Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals.
- Apostoli P. Elements in environmental and occupational medicine. *J Chromatogr B*, 2002; 778: 63-97.

- Barány E, Bergdahl IA, Schütz A, Skafaving S, Oskarsson A. Inductively coupled plasma mass spectrometry for direct multi-element analysis of diluted human blood and serum. *J Anal Atom Spectrom*, 1997;12: 1005-9.
- Barbosa Jr F, Santos JET, Gerlach RF, Parsons PJ. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect*, 2005; 113(12): 1669-74.
- Batista BL, Rodrigues JL, Nunes JA, Souza VCO, Barbosa Jr F. Exploiting dynamics reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. *Anal Chim Acta*, 2009; 639: 13-8.
- Bazzi A, Nriagu JO, Linder AM. Determination of toxic and essential elements in children's blood with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J Environ Monit*, 2008; 10: 1226-32.
- Bolann BJ, Rahil-Khazen R, Henriksen H, Isrenn R, Ulvik RJ. Evaluation of methods for trace element determination with emphasis on their usability in the clinical routine laboratory. *Scand J Clin Lab Invest*, 2007; 67: 353-66.
- Bonnefoy C, Meunier A, Moesch C, Lachâtre G, Mermet J-M. Determination of chromium in whole blood by DRC-ICP-MS: spectral and non-spectral interferences. *Anal Bioanal Chem*, 2005; 383: 167-73.
- Bonnefoy C, Meunier A, Moesch C, Lachâtre G, Mermet J-M. Validation of the determination of lead in whole blood by ICP-MS. *J Anal At Spectrom*, 2002; 17: 1161-5.
- Bortoli A, Gerotto M, Marchiori M, Palouta R, Troncon A. Applications of inductively coupled plasma mass spectrometry to the early detection of potentially toxic elements. *Microchem J*, 1992; 46: 167-73.
- Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (CCMAS). GUIDELINES ON ANALYTICAL TERMINOLOGY. (CAC/GL 72-2009). 2009. Available at: www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../cxg_072e.pdf
- Commission of the European Communities. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities. Document number C(2002) 3044. 29 p. Available at: old.eu-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF
- D'Ilio S, Petrucci F, D'Amato M, DiGregorio M, Senofonte O, Violante N. Method validation for determination of arsenic, cadmium, chromium and lead in milk by means dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2008;624: 59-67.
- D'Ilio S, Violante N, Di Gregorio M, Senofonte O, Petrucci F. Simultaneous quantification of 17 trace elements in blood by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) equipped with a high-efficiency sample introduction system. *Anal Chim Acta*, 2006; 579: 202-8.
- D'Ilio S, Violante N, Majorani C, Petrucci F. Dynamic reaction cell ICP-MS for determination of total As, Cr, Se and V in complex matrices: Still a challenge? A review. *Anal Chim Acta*, 2011; 698: 6-13.
- De Boer JLM, Ritsers R, van Staden SP, Van den Beld W. Practical and quality-control aspects of multi-element analysis with quadrupole ICP-MS with special attention to urine and whole blood. *Anal Bioanal Chem*, 2004; 379: 872-80.
- Ek KH, Morrison GM, Rauch S. Environmental routes for platinum group elements to biological materials – a review. *Sci Total Environ*, 2004; 334-5:21-38.
- Fong BM, Lee TS, Tam S. Determination of mercury in whole blood and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, 2007; 31 (5): 281-7.
- Goullé JP, Mahieu L, Castermant J, Neveu N, Bonneau L, Lainé G, et al. Metal and metalloids multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values. *Forensic Sci Int*, 2005; 153(1): 39-43.
- Heitland P, Köster HD. Fast, simple and reliable routine determination of 23 elements in urine by ICP-MS. *J Anal At Spectrom*, 2004; 19: 1552-8.
- International Organization for Standardization – ISO (US). Clean room and associated controlled environments – Part 1: Classification of air cleanliness 14644-1: 1999. Geneva.
- Kadar A, Noël L, Chekri R, Vastel C, Millour S, Guérin T. Optimization of ICP-MS collision/reaction cell conditions for the determination of elements likely to be interfered (V, Cr, Fe, Co, Ni, As and Se) in foodstuffs. *Talanta*, 2011; 85: 2605-13.
- Krächler M, Heisel C, Kretzer P. Validation of ultratrace analysis of Co, Cr, Mo and Ni in whole blood, serum and urine using ICP-SMS. *J Anal At Spectrom*, 2009; 24: 605-10.
- Kuno R, Roquetti MH, Gouveia N. Conceitos e derivação de valores de referência para biomonitorização humana de contaminantes ambientais. *Rev Panam Salud Publica*, 2010; 27(1): 74-9.
- Lemos VA, de Carvalho AL. Determination of cadmium and lead in human biological samples by spectrometric techniques: a review. *Environ Monit Assess*, 2010; 171: 255-65.
- McShane WJ, Pappas RS, Wilson-McElprang V, Paschal D. A rugged and transferable method for determining blood cadmium, mercury, and lead with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*, 2008; 63: 638-44.
- Mesko MF, Hartwig CA, Bizzi CA, Pereira JSF, Mello PA, Flores EMM. Sample preparation strategies for bioinorganic analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom*, 2011; 307: 123-36.
- Needham LL, Calafat AM, Barr DB. Uses and issues of biomonitoring. *Int J Hyg Environ Health*, 2007; 210: 229-38.
- Palmer CD, Lewis Jr ME, Geraghty CM, Barbosa Jr F, Parsons PJ. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma-mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*, 2006; 61: 980-90.
- Paoliello MMB, Gutierrez PR, Turini CA, Matsuo T, Mezzaroba L, Barbosa DS, Alvarenga ALP, et al. Valores de referência para plumbemia em população urbana. *Rev Saude Publica*, 1997; 31(2): 144-8.
- Paquette V, Larivière P, Cormier D, Truchon G, Zayed J, Tra HV. Development and validation of analytical methods for ultra-trace beryllium in biological matrices. *J Anal Toxicol*, 2010; 34: 562-70.
- Parsons PJ, Barbosa Jr F. Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*, 2007; 62: 992-1003.
- Pick D, Leiterer M, Eimax, JW. Reduction of polyatomic interferences in biological material using dynamic reaction cell ICP-MS. *Microchem J*, 2010; 95: 315-9.
- Rivero Martino FA, Fernández Sánchez ML, Sanz-Medel A. Total determination of essential and toxic elements in milk whey by double focusing ICP-MS. *J Anal Atom Spectrom*, 2000; 15: 163-8.
- Santiago Muñoz C, Marchante-Gayón JM, García Alonso JJ, Sanz-Medel A. Multi-elemental trace analysis of human serum by double-focusing ICP-MS. *J Anal Atom Spectrom*, 1999; 14: 193-8.
- Subramanian KS. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*, 1996; 51: 291-319.
- Vanhoecke F, Vanhoe H, Dams R. The use of internal standards in ICP-MS. *Talanta*, 1992; 39(7): 737-42.
- Zhou Y, Zano RA, Barbosa Jr F, Parsons PJ, Krug FJ. Investigations of a W-Rh permanent modifier for the determination of Pb in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*, 2002; 57: 1291-1300.

How to cite this article:

Carmen Silvia Kira, Alice Momoyo Sakuma, Nelson da Cruz Gouveia., Fast and simple multi-element determination of essential and toxic metals in whole blood with quadrupole ICP-MS., *J App Pharm Sci*, 2014; 4 (05): XXX-XXX

REFERÊNCIAS

10 REFERÊNCIAS

Abduljaleel SA, Shuhaimi-othman M, Babji A. Assessment of trace metals contents in chicken (*Gallus gallus domesticus*) and Quail (*Coturnix coturnix japonica*) tissues from Selangor (Malaysia). *J Environ Sci Technol*. 2012;5(6):441-51.

Airaksinen R, Turunen AW, Rantakokko P, Männistö S, Vartiainen T, Verkasalo PK. Blood concentration of methylmercury in relation to food consumption. *Public Health Nutr*. 2010;14(3):480-9.

Akan JC, Abdulrahman FI, Sodipo OA, Chiroma YA. Distribution of heavy metals in the liver, kidney and meat of beef, mutton, caprine and chicken from Kasuwan Shanu market in Maiduguri metropolis, Borno State, Nigeria. *Res J Appl Sci, EngTechnol*. 2010;2(8):743-8.

Alessio L, Apostoli P, Braga M, Duca PG, Herber RFM, Nordberg G, Vesterberg O. Estimation of pooled reference values for cádmium in blood using meta-analysis and TRACY criteria. *Sci Total Environ*. 1994;152:169-77.

Alessio, P. Reference values for the study of low doses of metals. *Int Arch Occup Environ Health*. 1993;65:S23-S27.

Alimonti A, Bocca B, Mannella E, Petrucci F, Zennaro F, Cotichini R, D'Ippolito C, Agresti A, Caimi S, Forte G. Assesment of reference values for selected elements in a health urban population. *Ann Ist Super Sanità*. 2005;41(2):181-7.

Alimonti A, Petrucci F, Krachler M, Bocca B and Caroli S. Reference values for chromium, nickel and vanadium in urine of youngsters from the urban area of Rome. *J Environ Monit*. 2000;2:351-4.

Angerer J, Aylward LL, Hays SM, Heinzow B, Wilhelm M. Human biomonitoring assessment values: approaches and data requirements. *Int J Hyg Environ Health*. 2011;214:348-60.

Apostoli P, Minoia C, Hamilton EI. Significance and utility of reference values in occupational medicine. *Sci Total Environ*. 1998;209:69-77.

Apostoli P, Ricossa MC. The role and significance of reference values in the identification and evaluation of trace elements from diet. In: Caroli S, Záray, G. (Eds.). *Analytical techniques for clinical chemistry*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2012. chap. 4, p. 97-117.

Apostoli, P. Application of reference values in occupational health. *Int Arch Occup Environ Health*. 1999;72(4):191-4.

Apostoli, P. Criteria for the definition of reference values for toxic metals. *Sci Total Environ*. 1992;120(1-2):23-37.

Apostoli, P. Elements in environmental and occupational medicine. Review. *J Chromatogr B*. 2002;778:63-97.

Ashavaid TF, Todur SP, Dherai AJ. Establishment of reference intervals in indian population. *Indian J Clin Biochem*. 2005;20(2):110-8.

ATSDR. Agency for toxic substances and disease registry. *Draft toxicological profile for cadmium*. Atlanta: ATSDR, 2008. 512p.

ATSDR. Agency for toxic substances and disease registry. *Toxicological profile for lead*. Atlanta: ATSDR, 2007. 528p.

ATSDR. Agency for toxic substances and disease registry. *Toxicological profile for mercury*. Atlanta: ATSDR, 1999. 676p.

ATSDR. Agency for toxic substances and disease registry. *Toxicological profile for nickel*. Atlanta: ATSDR, 2005. 397p.

Azevedo FA, Nascimento ES, Chasin AAM. Mercúrio. In: Azevedo FA, Chasin AM. *Metais gerenciamento da toxicidade*. São Paulo: Editora Atheneu; 2003. cap. 11, p. 299-352.

Batariová A, Spevacková V, Benes B, Cejchanová M, Smíd J, Cerná M. Blood and urine levels of Pb, Cd and Hg in the general population of the Czech Republic and proposed reference values. *Int J Hyg Environ Health*. 2006;209:359-66.

Bazzi A, Nriagu JO, Linder AM. Determination of toxic and essential elements in children's blood with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J Environ Monit.* 2008;10:1226-32.

Becker JS. Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications. England. John Wiley & Sons; 2007. 518p.

Becker K, Conrad A, Kirsch N, Kolossa-Gehring M, Schulz C, Seiwert M, Seifert B. German Environmental Survey (GerES): Human biomonitoring as a tool to identify exposure pathways. *Int J Hyg Environ Health.* 2007; 210: 267-9.

Becker K, Kaus S, Krause C, Lepom P, Schulz C, Seiwert M, Seifert B. German Environmental Survey 1998 (GerES III): environmental pollutants in blood of the German population. *Int J Hyg Environ Health.* 2002;205:297-308.

Becker K, Schroeter-Kermani C, Seiwert M, Rüther M, Conrad A, Schulz C, Wilhelm M, Wittsiepe J, Günsel A, Dobler L, Kolossa-Gehring M. German health-related environmental monitoring: assessing time trends of the general population's exposure to heavy metals. *Int J Hyg Environ Health.* 2013;216:250-4.

Berlin M, Zalups RK, Fowler BA. Mercury. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT. *Handbook on the toxicology of metals.* [s.l.]: Academic Press; 2007. Chap. 33, p.675-729.

Birgisdottir BE, Knutsen HK, Haugen M, Gjelstad IM, Jenssen MTS, Ellingsen DG, Thomassen Y, Alexander J, Meltzer HM, Brantsaeter AL. Essential and toxic

element concentrations in blood and urine and their associations with diet: results from a Norwegian population study including high-consumers of seafood and game. *Sci Total Environ*. 2013;463-464:836-844.

Bocca B, Madeddu R, Asara Y, Tolu P, Marchal JA, Forte G. Assessement of reference ranges for blood Cu, Mn, Se and Zn in a selected Italian population. *J Trace Elem Med Biol*. 2011;25:19-26.

Boyd JC. Defining laboratory reference values and decision limits: populations, intervals, and interpretations. *Asian J Androl*. 2010;12:83-90.

Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. Addendum to the concept of reference and human biomonitoring values in environmental medicine. 2009;52(8):874-7.

CDC. Biomonitoring Summary. Cadmium. Atlanta, 2012. Available from: http://www.cdc.gov/biomonitoring/Cadmium_BiomonitoringSummary.html Cited: 2012 mar. 27.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Lead – Standard Surveillance Definitions and Classification. Atlanta, 2013c. Available from: www.cdc.gov/nceh/lead/data/definitions.htm. Cited: 2014 apr 27.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Health and Nutrition Examination Survey, 2013-2014 Overview. Let's improve health. 6p. Atlanta, USA.

2013b Available from: www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_13_14/2013-14_Overview_brochure.pdf. Cited: 2013b oct. 18.

CDC. Fourth national report on human exposure to environmental chemicals. Department of health and human services. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA, 2013a. 770p. Available from: www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport_UpdatedTables_Sep2013.pdf.

Cited: 2014 mar. 20.

Cerioti F, Hinzmann R, Panteghini M. Reference intervals: the way forward. Review article. *Ann Clin Biochem*. 2009;46:8-16.

Cerná M, Krsková A, Cejchanová M, Spevácková V. Human biomonitoring in the Czech Republic: an overview. *Int J Hyg Environ Health*. 2012;215:109-19.

Cerná M, Spevácková V, Batáiová A, Smíd J, Cejchanová M, Ocadlíková D, Bavorová H, Benes B, Kubínová R. Human biomonitoring system in the Czech Republic. *Int J Hyg Environ Health*. 2007;210:495-9.

CETESB. *Texto explicativo Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no estado de São Paulo*. São Paulo: 2012. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areas-contaminadas/2012/texto-explicativo.pdf.

Chasin AAM, Cardoso LMN. Cádmio. In: In: Azevedo FA, Chasin AM. *Metais gerenciamento da toxicidade*. São Paulo: Editora Atheneu, 2003; cap. 10, p. 263-298.

Clark NA, Teschke K, Rideout K, Copes R. Trace element levels in adults from the west coast of Canada and associations with age, gender, diet, activities, and levels of other trace elements. *Chemosphere*. 2007;70:155-64.

Clewell HJ, Tan YM, Campbell JL, Andersen ME. Quantitative interpretation of human biomonitoring data. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 231: 122-131.

CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline. Third Edition. Wayne, PA, 2008. 61p.

Coelho P, Costa S, Costa C, Silva S, Walter A, Ranville J, Pastorinho MR, Harrington C, Taylor A, Dall'Armi V, Zoffoli R, Candeias C, da Silva EF, Bonassi S, Laffon B, Teixeira JP. Biomonitoring of several toxic metal(loid)s in different biological matrices from environmentally and occupationally exposed populations from Panasqueira mine área, Portugal. *Environ Geochem Health*. august 2013. doi: 10.1007/s10653-013-9562-7.

Conti ME. Environmental biological monitoring. In: Conti ME. *Biological monitoring: theory & applications: bioindicators and biomarkers for environmental quality and human exposure assessment*. Southampton, Boston: WIT Press; 2008. Chap. 1, p. 1-21.

Cotta AJB. *Determinação de elementos traço em águas e rochas por ICP-MS quadrupolar com cela de colisão*. [tese online]. Campinas: Instituto de Geociências, Universidade de Campinas; 2010. [citado 17 dez. 2013]. Disponível em: www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?down=000783398.

D'Ilio S., Forastiere F, Draicchio A, Majorani C, Petrucci F, Violante N, Senofonte O. Human biomonitoring for Cd, Hg and Pb in blood of inhabitants of the Sacco Valley (Italy). *Ann Ist Super Sanita*. 2013;49(1):24-33.

Dybkaer R, Solberg HE. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values. *Clin Chim Acta*. 1987;170:S33-S42.

Ewers U, Krause C, Schulz C, Wilhelm M. Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. *Int Arch Occup Environ Health*. 1999;72:255-60.

Eyeson J, House I, Yang YH, Warnakulasuriya KAAS. Relationship between mercury levels in blood and urine and complaints of chronic mercury toxicity from amalgam restorations. *Br Dent J*. 2010;208.

Fernícola NAGG, Azevedo, FA. Níveis de chumbo e atividade da desidratase do ácido δ – aminolevulínico (δ – ALAD) no sangue da população da Grande São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*. 1981;15:272-82.

Forte G, Madeddu R, Tolu P, Asara Y, Marchal JA, Bocca B. Reference intervals for blood Cd and Pb in the general population of Sardinia (Italy). *Int J Hyg Environ Health*. 2011;214:102-9.

Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(7):758-64.

Freitas CU, De Capitani EM, Gouveia N, Simonetti MH, Paula e Silva MR, Kira CS, Sakuma AM, Carvalho MFH, Duran MC, Tiglea P, Abreu MH. Investigation of risk factors and assessment of the impact of lead abatement measures. *Environ Res.* 2007;103:338-44.

Fuentes-Arderiu X, Mas-Serra R, Alumá-Trullàs A, Martí-Marcet I, Dot-Bach D. Guideline for the production of multicentre physiological reference values using the same measurement system. A proposal of the Catalan Association for Clinical Laboratory Sciences. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(7):778-82.

Garte S. Case histories – lead, ozone, tobacco, GMOS. In: Garte S. Where we stand: a surprising look at the real state of our planet. New York; NY: AMACOM; 2008. Chap. 9, p. 204-240.

Geffré A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun JP. Reference values: a review. *Vet Clin Pathol.* 2009;38(3):288-98.

Gerhardsson L, Lundh T. Metal concentrations in blood and hair in pregnant females in southern Sweden. *J Environ Health.* 2010;72(6):37-41.

Gil F, Capitán-Vallvey LF, De Santiago E, Ballesta J, Pla A, Hernández AF, Gutiérrez-Bedmar M, Fernández-Crehuet J, Gómez J, López-Guarnido O, Rodrigo L, Villanueva E. Heavy metal concentrations in the general population of Andalusia, South of Spain. A comparison with the population within the area of influence of Aznalcóllar mine spill (SW Spain). *Sci Total Environ.* 2006;372:49-57.

Giné-Rosias MF. Espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS). Piracicaba: CENA, 1999. 118p.

Goullé J-P, Mahieu L, Castermant J, Neveu N, Bonneau L, Lainé G, Bouige D, Lacroix C. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair Reference values. *Forensic Sci Int.* 2005;153:39-44.

Grasbeck, R. Reference values, why and how. *Scand J Clin Lab Invest.* 1990;50 Supplement 201:45-53.

Grasbeck, R. Reference values: Relevant controls for clinical decision-making. *Eur J Haematol.* 1988;40:1-6.

Guedes, TA. Teoria da amostragem. Maringá, 2014. 18p. [citado 01 abr 2014]. Disponível em: www.des.uem.br/uploads/arquivos_professor/0306150432.pdf.

Haines DA, Arbuckle TE, Lye E, Legrand M, Fisher M, Langlois R, Fraser W. Reporting results of human biomonitoring of environmental chemicals to study participants: a comparison of approaches followed in two Canadian studies. *J Epidemiol Community Health.* 2011;65:191-8.

Haines DA, Murray J. Human biomonitoring of environmental chemicals - early results of the 2007-2009 Canadian health measures survey for males and females. Short communication. *Int J Hyg Environ Health.* 2012;215:133-7.

Hamilton EI, Sabbioni E, Van der Venne MT. Element reference values in tissues from inhabitants of the European Community. VI. Review of elements in blood,

plasma and urine and a critical evaluation of reference values for the United Kingdom population. *Sci Total Environ.* 1994;158:165-90.

Hassan AA, Rylander C, Brustad M, Sandanger TM. Level of selected toxic elements in meat, liver, tallow and bone marrow of young semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.) from northern Norway. *Int J Circumpolar Health.* 2012;71:18187.

He P, Lu Y, Liang Y, Chen B, Wu M, Li S, He G, Jin T. Exposure assessment of dietary cadmium: findings from Shanghainese over 40 years, China. *BMC Public Health.* 2013;13:590-9.

Heitland P, Köster HD. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS. *J Trace Elem Med Biol.* 2006;20:253-62.

Henny J, Petersen PH. Reference values: from philosophy to a tool for laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(7):686-91.

Henny J, Petitclerc C, Fuentes-Arderiu X, Petersen PH, Queraltó JM, Schiele F, Siest G. Need for revisiting the concept of reference values. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38(7):589-95.

Hill SJ, Fisher A, Liezers M. Plasma generation, ion sampling and focusing. In: Nelms SM, editor. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook.* Winsford, Cheshire: Blackwell Publishing; 2005. Chap. 1, p.1-25.

Hogervorst J, Plusquin M, Vangronsveld J, Nawrot T, Cuyspers A, Van Hecke E, Roels HA, Carleer R, Staessen JA. House dust as possible route of environmental exposure to cádmium and lead in the adult general population. *Environ Res.* 2007;103:30-7.

Ikeda M, Ohashi F, Fukui Y, Sakuragi S, Moriguchi J. Cadmium, chromium, lead, manganese and nickel concentrations in blood of women in non-polluted areas in Japan, as determined by inductively coupled plasma-sector field-mass spectrometry. *Int Arch Occup Environ Health.* 2011;84:139-50.

Ilcol YO, Aslan D. Use of total patient data for indirect estimation of reference intervals for 40 clinical analytes in Turkey. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(7):867-76.

Instituto de Estudos de Saúde Coletiva (IESC)/Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Relatório final Projeto piloto do I inquérito nacional de populações expostas a substâncias químicas. Rio de Janeiro, 2011. 137p.

Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull.* 2003;68:167-82.

Jenssen MTS, Brantsaeter AL, Haugen M, Meltzer HM, Larssen T, Kvaalem HE, Birgsdottir BE, Thomassen Y, Ellingsen D, Alexander J, Knutsen HK. Dietary mercury exposure in a population with a wide range of fish consumption – self capture of fish and regional differences are important determinants of mercury in blood. *Sci Total Environ.* 2012;439:220-9.

Johnson NH, Ash KO, Nuttal KL, Ashwood ER. The adequacy of capillary specimens for determining whole blood lead. *Ann. Clin Lab Sci.* 1997; 27(3):179-84

Jones G, Barker A. Reference Intervals. *Clin Biochem Rev.* 2008;29 Supplement (i):S93-S97.

Khalafalla FA, Ali FH, Schwagele F, Abd-El-Wahab MA. et al. Heavy metal residues in beef carcasses in Beni-Suef abattoir, Egypt. *Vet Ital.* 2011;47(3):351-61.

Kim N-S, Lee B-K. National estimates of blood lead, cadmium, and mercury levels in the Korean general adult population. *Int Arch Occup Environ Health.* 2011;84:53-63.

Kim N-Y, Ahn S-J, Ryu D-Y, Choi B-S, Kim H, Yu I-J, Park J-D. Effect of lifestyles on the blood mercury level in Korean adults. *Human and Experimental Toxicology.* 2013;32(6):591-9.

Klee GG. Clinical interpretation of reference intervals and reference limits. A plea for assay harmonization. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(7):752-7.

Klein C, Costa M. Nickel. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT. *Handbook on the toxicology of metals.* [s.l.]: Academic Press; 2007. Chap. 35, p.743-58.

Komaromy-Hiller G, Ash KO, Costa R, Howerton K. Comparison of representative ranges on U.S. patient population and literature reference intervals for urinary trace elements. *Clin Chim Acta*. 2000;296:71-90.

Korrich SA, Schwartz J, Tsaih S-W, Hunter DJ, Aro A, Rosner B, Speizer FE, Hu H. Correlates of bone and blood lead levels among middle-aged and elderly women. *Am J Epidemiol*. 2002;156(4):335-343.

Koyashiki GAK, Paoliello MMB, Matsuo T, de Oliveira MMB, Mezzaroba L, Carvalho MF, Sakuma AM, Turini C, Vannuchi MTO, Barbosa CSD. Lead levels in milk and blood from donors to the breast milk bank in Southern Brazil. *Environ Res*. 2010;110:265-71.

Kucera J, Bencko V, Sabbioni E and Van der Venne MT. Review of trace elements in blood, serum and urine for the Czech and Slovak populations and critical evaluation of their possible use as reference values. *Sci Total Environ*. 1995;166:211-34.

Kuno R, Roquetti MH, Gouveia N. Conceitos e derivação de valores de referência para biomonitorização humana de contaminantes ambientais. *Rev Panam Salud Publica*. 2010;27(1):74-9.

Kuno R., Roquetti MH, Becker K, Seiwert M, Gouveia N . Reference values for lead, cadmium and mercury in the blood of adults from the metropolitan area of São Paulo, Brazil. *Int J Hyg Environ Health*. 2013;216:243-49.

Kuno, R. *Valores de referência para chumbo, cádmio e mercúrio em população adulta da região metropolitana de São Paulo*. [tese online]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009 [citado 25 mar. 2010]. Disponível em: <http://www.teses/disponíveis/5/5137/tde-03062009-095040/>.

Lacerda, LD, Santos JA, Campos RC, Gonçalves RA, Salles R. Total-Hg and organic-Hg in *Cephalopholis fulva* (Linnaeus, 1758) from inshore and offshore waters of NE Brazil. *Braz J Biol*. 2007; 67(3):493-8.

Lauwerys R, Hoet P. Biological monitoring of exposure to inorganic and organometallic substances. In: Lauwerys R, Hoet P. *Industrial chemical exposure. Guidelines for biological monitoring*. Third Edition. Boca Raton, Flórida: Lewis Publishers; 2001. Chap. 2, p.21-180.

Lazarevic K, Nikolic D, Stosic L, Milutinovic S, Videnovic J, Bogdanovic D. Determination of lead and arsenic in tobacco and cigarettes: an important issue of public health. *Cent Eur J Public Health*. 2012; 20(1): 62-6.

Lin T-S; Wu C-C. Internal exposure to trace elements in non-smoking residents living in a northern Taiwan industrial city. *Biol Trace Elem Res*. 2011;144:36-48.

Linge KL; Jarvis KE. Quadrupole ICP-MS: Introduction to instrumentation, measurement techniques and analytical capabilities. *Geostand Geoanal Res*. 2009;33(4):445-67.

Liu J, Yuan E, Zhang Z, Jia L, Yin Z, Meng X, Du H. Age and sex specific reference intervals for blood copper, zinc, calcium, magnesium, iron, lead and cadmium in infants and children. *Clin Biochem.* 2012;45:416-9.

Llop S, Ibarlucea J, Sunyer J, Ballester F. Estado actual sobre la exposición alimentaria al mercurio durante el embarazo y la infância, y recomendaciones en salud pública. *Gac Sanit.* 2013;27(3):273-8.

Madeddu R, Solinas G, Forte G, Bocca B, Asara Y, Tolu P, Delogu LG, Muresu E, Montella A, Castiglia P. Diet and nutrients are contributing factors that influence blood cadmium levels. *Nutr Res.* 2011;31:691-7.

Madeddu R, Tolu P, Asara Y, Farace C, Forte G, Bocca B. Blood biomonitoring of metals in subjects living near abandoned mining and active industrial áreas. *Environ Monit Assess.* 2013;185:5837-46.

Mahaffey KR, Clickner RP, Jeffries RA. Adult women's blood mercury concentrations vary regionally in the United States: association with patterns of fish consumption (NHANES 1999-2004). *Environ Health Perspect.* 2009;117(1):47-53.

Mahaffey KR, Mergler D. Blood levels of total and organic mercury in residents of the upper St. Lawrence river basin, Québec: association with age, gender, and fish consumption. *Environ Res.* 1998;section A 77:104-14.

Malik RN, Hashmi MZ, Huma Y. Heavy metal accumulation in edible fish species from Rawal Lake Reservoir, Pakistan. *Environ Sci Pollut Res.* 2014;21:1188-96.

Massadeh A, Gharibeh A, Omari K, Al-Momani I, Alomari A, Tumah H, Hayajneh W. Simultaneous determination of Cd, Pb, Cu, Zn, and Se in human blood of Jordanian smokers by ICP-OES. *Biol Trace Elem Res*. 2010;133:1-11.

Mattos RCOC, Carvalho MAR, Mainenti HRD, Xavier Junior EC, Sarcinelli PN, Carvalho LBV, Borges RM, Quitério SL, Nogueira SM, Costa IC, Alves MFM. Avaliação dos fatores de risco relacionados à exposição ao chumbo em crianças e adolescentes do Rio de Janeiro. *Cien Saude Colet*. 2009;14(6):2039-48.

Mayan ON, Gomes MJ, Henriques A, Silva S, Begonha A. Health survey among people living near an abandoned mine. A case study: Jales mine, Portugal. *Environ Monit Assess*. 2006;123:31-40.

McKelvey W, Gwynn C, Jeffery N, Kass D, Thorpe LE, Garg RK, Palmer CD, Parsons PJ. A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York city adults. *Environ Health Perspect*. 2007;115(10):1435-41.

Mehmood A, Sarfraz RA, Qudoos A, Akbar F. Appraisal of some heavy metals in organ meat from non-industrialized areas of Faisalabad, Pakistan. *Glob Vet*. 2014;12(1):98-103.

Menezes Filho JA, Viana GFS, Paes CR. Determinants of lead exposure in children on the outskirts of Salvador, Brazil. *Environ Monit Assess*. 2012;184:2593-603.

Mijal RS, Holzman CB. Blood cadmium levels in women of childbearing age vary by race/ethnicity. *Environ Research*. 2010;110:505-12.

Ministério da Saúde. 2010. *Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde: panoramas, conjunturas, cartografias: gestão 2009-2010*. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: bvsms.saude.gov.br/bvs/publicações/vigilância_saude_panoramas_conjunturas.pdf.

Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P, Pietra R, Pozzoli L, Gallorini M, Nicolaou G, Alessio L, Capodaglio E. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *Sci Total Environ*. 1990; 95:89-105.

Montaser A, McLean JÁ, Liu H, Mermet J-M. An introduction to ICP spectrometries for analysis. In: Montaser A. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. United States of America: John Wiley & Sons; 1998. Chapter 1.

Montenegro SG. *Modelo de regressão logística ordinal em dados categóricos na área de ergonomia experimental*. [dissertação online]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2009 [citado 17 nov. 2013]. Disponível em: bdtd.biblioteca.ufpb.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=639.

Moraes JL. *Mercúrio total em peixes e crustáceos comercializados no Estado do Pará, Brasil*. [tese online]. Rio de Janeiro: Faculdade de Veterinária, Universidade

Federal Fluminense, Rio de Janeiro; 2011 [citado 28 nov 2013]. Disponível em: www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/joseluizmoraes.pdf.

Moreno ME, Acosta-Saavedra LC, Meza-Figueiroa D, Vera E, Cebrian ME, Ostrosky-Wegman P, Calderon-Aranha ES. Biomonitoring of metal in children living in a mine tailings zone in Southern Mexico: a pilot study. *Int J Hyg Environ Health*. 2010;213:252-8.

Mortada WI, Sobh MA, El-Defrawy M, Farahat SE. Reference intervals of cádmium, lead and Mercury in blood, urine, hair, and nails among residentes in Mansoura city, Nile Delta, Egypt. *Environ Res*. 2002;section A 90:104-110.

National Research Council. *Human biomonitoring for environmental chemicals*. Washington, DC: The National Academic Press, 2006. 316 p.

Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, Munters E, Cuypers A, Richart T, Ruttens A, Smeets K, Clijsters H, Vangronsveld J. Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *Biometals*. 2010;23:769-82.

Nogueira DP, Colacioppo S, Souza JMP, Pezza CB, Souza MLA, Gomes JR. Taxa de chumbo em amostra de voluntários “não expostos” habitantes da Grande São Paulo – Brasil. *Rev Saude Publica*. 1979;13:147-50.

Nordberg GF, Nogawa K, Nordberg M, Friberg LT. Cadmium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT. *Handbook on the toxicology of metals*. [s.l.]: Academic Press; 2007. Chap. 23, p.445-86.

Nordberg M, Nordberg GF. In: Sarkar, B. *Heavy metals in the environment*. New York: Marcel Dekker; 2002. Chap. 8, p.231-70.

Nunes JA, Batista BL, Rodrigues JL, Caldas NM, Neto JAG, Barbosa Junior F. A simple method based on ICP-MS for estimation of background levels of arsenic, cádmium, copper, manganese, nickel, lead, and selenium in blood of the Brazilian population. *J Toxicol Environ Health Part A*. 2010;73:878-87.

Nuttall KL. Review: Interpreting mercury in blood and urine of individual patients. *Ann Clin Lab Sci*. 2004;34(3):235-50.

Obasohan EE. Heavy metals concentrations in the offal, gill, muscle and liver of a freshwater mudfish (*Parachanna obscura*) from Ogba River, Benin city, Nigeria. *Afr J Biotechnol*. 2007;6(22):2620-7.

Oliveira JP. In: Azevedo FA, Chasin AM. *Metais gerenciamento da toxicidade*. São Paulo: Editora Atheneu; 2003. Cap. 5, p.127-42.

Olsson I-M, Bensryd I, Lundh T, Ottosson H, Skerfving S, Oskarsson A. Cadmium in blood and urine – impact of sex, age, dietary intake, iron status and former smoking – association of renal effects. *Environ Health Persp*. 2002;110(2):1185-90.

Ong CN, Phoon WO, Law HY, Tye CY, Lin HH. Concentrations of lead in maternal blood, cord blood, and breast milk. *Arch Dis Child*. 1985;60(8):756-9.

Paoliello MMB, Chasin AM. *Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos*. Salvador: Centro de Recursos Ambientais; 2001. v.3. 144p. (Série cadernos de referência ambiental).

Paoliello MMB, De Capitani EM, Cunha FG, Matsuo T, Carvalho MF, Sakuma A, Figueiredo BR. Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil. *Environ Res*. 2002;section A 88:120-8.

Paoliello MMB, Gutierrez PR, Turini CA, Matsuo T, Mezzaroba L, Barbos DS, Alvarenga ALP, Carvalho SRQ, Figueiroa GA, Leite VGM, Gutierrez AC, Nogueira KB, Inamine WAS, Zavatti AM. Valores de referência para plumbemia em população urbana. *Rev Saude Publica*. 1997;31(2):144-8.

Paoliello MMB, Gutierrez PR, Turini CA, Matsuo T, Mezzaroba L, Barbosa DS, Carvalho SRQ, Alvarenga ALP, Rezende MI, Figueiroa GA, Leite VGM, Gutierrez AC, Lobo BCR, Cascales RA. Valores de referência para plumbemia em uma população urbana do sul do Brasil. *Rev Panam Salud Publica/ Pan Am J Public Health*. 2001a;9(5):315-9.

Paoliello MMB. De Capitani EM. Chumbo. In: Azevedo FA, Chasin AM. *Metais gerenciamento da toxicidade*. São Paulo: Editora Atheneu; 2003. Cap. 12, p.353-98.

Parsons PJ, Reilly AA, Esernio-Jenssen D. Screening children exposed to lead: an assesement of the capillary blood lead fingerstick test. *Clin Chem*. 1997;43(2):302-11.

Pawlas N, Stromberg U, Carlberg B, Cerná M, Harari F, Harari R, Horvat M, Hrubá F, Koppova K, Krskova A, Krsnik M, Li Y-F, Lofmark L, Lundh T, Lundstrom N-G, Lyoussi B, Markiewicz-Górka I, Mazej D, Osredkar J, Pawlas K, Rentschler G, Spevackova V, Spiric Z, Sundkvist A, Tratnik JS, Vadla D, Zizi S, Skefving S, Bergdahl IA. Cadmium, mercury and lead in the blood of urban women in Croatia, The Czech Republic, Poland, Slovakia, Slovenia, Sweden, China, Ecuador and Morocco. *Int J Occup Med Environ Health*. 2013;26(1):58-72.

Perharic L, Vracko P. Development of national human biomonitoring programme in Slovenia. *Int J Hyg Environ Health*. 2012;215:180-4.

Petitclerc C, Solberg HE. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *Clin Chim Acta*. 1987;170:S3-S12.

Pino A, Amato A, Alimonti A, Mattei D, Bocca B. Human biomonitoring for metals in Italian urban adolescents: Data from Latium region. *Int J Hyg Environ Health*. 2012;215:185-90.

Pivetta F, Machado JMH, Araújo UC, Moreira MFR, Apostoli P. Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública. *Cad Saude Publica*. 2001;17(3):545-54.

Popovic M, McNeill FE, Chettle DR, Webber CE, Lee V, Kaye WE. Impact of occupational exposure on lead levels in women. *Environ Health Perspect*. 2005; 113(4):478-484.

Poulsen OM, Christensen JM, Sabbioni E, Van der Venne MT. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community. V. Review of trace elements in blood, serum and urine and critical evaluation of reference values for the Danish population. *Sci Total Environ.* 1994;141:197-215.

Puklová V, Batariová A, Cerná M, Kotlik B, Kratzer K, Melicherčík J, Rupric J, Rehurková I, Speváková V. Cadmium exposure pathways in the Czech urban population. *Cent Eur J Public Health.* 2005; 13(1): 11-9.

Puklová V, Krsková A, Cerná M, Cejchanová M, Rehurková I, Rupric J, Kratzer K, Kubínová R, Zimová M. The mercury burden of the Czech population: an integrated approach. *Int J Hyg Environ Health.* 2010;213:243-51.

Rice DC, Lincoln R, Martha J, Parker L, Pote K, Xing S, Smith AE. Concentrations of metals in blood of Maine children 1-6 years old. *J. Exp. Sci. Environ Epidemiology.* 2010;20:634-43.

Ritchie RF, Palomaki G. Selecting clinically relevant populations for reference intervals. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(7):702-9.

Roggi C, Sabbioni E, Minoia C, Ronchi A, Gatti A, Hansen B, Silva S, Maccarini L. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Union. IX. Harmonization of statistical treatment: blood cadmium in Italian subjects. *Sci Total Environ.* 1995;166:235-43.

Rojas E, Herrera LA, Poirier LA, Ostrosky-Wegman P. Are metals dietary carcinogens. *Mutat Res.* 1999;443(1-2):157-81.

Rustad P, Felding P, Lahti A. Proposal for guidelines to establish common biological reference intervals in large geographical areas for biochemical quantities measured frequently in serum and plasma. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(7):783-91.

Sabbioni E, Minoia C, Pietra R, Fortaner S, Gallorini M, Saltelli A. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community. II. Examples of strategy adopted and trace element analysis of blood, lymph nodes and cerebrospinal fluid of Italian subjects. *Sci Total Environ.* 1992;120:39-62.

Schroijen C, Baeyens W, Schoeters G, Hond ED, Koppen G, Bruckers L, Nelen V, Mierop EVD, Bilau M, Covaci A, Keune H, Loots I, Kleinjans J, Dhooge W, Larebeke NV. Internal exposure to pollutants measured in blood and urine of Flemish adolescents in function of area of residence. *Chemosphere.* 2008;71:1317-25.

Schulz C, Angerer J, Ewers U, Heudorf U, Wilhelm M. Revised and new reference values for environmental pollutants in urine or blood of children in Germany derived from the German Environmental Survey on Children 2003-2006 (GerES IV). *Int J Hyg Environ Health.* 2009;212:637-47.

Schulz C, Angerer J, Ewers U, Kolossa-Gehring M. The German Human Biomonitoring Commission. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2007;210:373-82.

Schulz C, Wilhelm M, Heudorf U, Kolossa-Gehring M. Reprint of “update of the reference and HBM values derived by the German human biomonitoring commission”. *Int J Hyg Environ Health*. 2012;215:150-8.

Schulz C, Wilhelm M, Heudorf U, Kolossa-Gehring M. Update of the reference and HBM values derived by the German Human Biomonitoring Commission. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2011;215:26-35.

Skerfving S, Bergdahl IA. Lead. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L. *Handbook on the toxicology of metals*. [s.l.]: Academic Press, 2007. Cap 31, p.599-643.

Solberg HE, Grasbeck R. Reference values. *Adv Clin Chem*. 1989;27:1-79.

Solberg HE, Petitclerc C. Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. *Clin Chim Acta*. 1988;177:S1-S12.

Solberg HE, Stamm D. IFCC recommendation: The theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. *J Automatic Chem*. 1991;13(5):231-4.

Solberg HE. Approved Recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *Clin Chim Acta*. 1987a;165:111-8.

Solberg HE. Approved Recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Clin Chim Acta*. 1987b;170:S13-S32.

Son J-Y, Lee J, Paek D, Lee J-T. Blood levels of lead, cadmium, and mercury in the Korean population: results from the Second Korean National Human Exposure and Bio-monitoring Examination. *Environ Res*. 2009;109:738-44.

Sunderman Junior FW. Biological monitoring of nickel in humans. *Scand J Work Environ Health*. 1993;19 Supplement 1:34-8.

Sunderman Junior FW. Current concepts of “normal values”, “reference values”, and “discrimination values” in clinical chemistry. *Clin Chem*. 1975;21(13):1873-7.

Sutherland JE, Costa, M. Nickel. In: Sarkar, B. *Heavy metals in the environment*. New York: Marcel Dekker; 2002. Chap. 11, p.349-408.

Thomas R. Practical guide to ICP-MS. United States of America. Marcel Dekker; 2004. 239 p.

UBA. Umweltbundesamt. *German Environmental Surveys* [online]; 2013 [cited 2013 Oct 21]. Available from: www.umweltbundesamt.de/en/topics/health/assessing-environmentally-related-health-risks/german-environmental-surveys.

UNEP. United Nations Environment Programme. Global Mercury Assessment 2013. Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. UNEP Chemical Branch, Geneva, Switzerland. 44 p.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. EA-452/R-97-007. Mercury Study. Report to Congress. Volume V: Health Effects of Mercury and Mercury Compounds. Dec 1997. 34 p.

White MA, Sabbioni E. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Union. X. A study of 13 elements in blood and urine of a United Kingdom population. *Sci Total Environ*. 1998;216:253-70.

WHO. World Health Organization. *Environmental Health Criteria 135. Cadmium – Environmental Aspects*. Geneva: WHO, 1992. 156p.

WHO. World Health Organization. *Environmental Health Criteria 165. Inorganic lead*. Geneva: WHO, 1995. 300p.

WHO. World Health Organization. Preventing Disease Through Health Environments. Exposure to Mercury: A major public health concern. Geneva: WHO, 2007. 4 p.

WHO. UNEP. Guidance for Identifying Population at Risk from Mercury Exposure. Geneva, 2008. 176 p.

Wilhelm M, Ewers U, Schulz C. Revised and new reference values for some persistent organic pollutants (POPs) in blood for human biomonitoring in environmental medicine. *Int J Hyg Environ Health*. 2003;206:223-9.

Wilhelm M, Ewers U, Schulz C. Revised and new reference values for some trace elements in blood and urine for human biomonitoring in environmental medicine. *Int J Hyg Environ Health*. 2004;207:69-73.

Wilhelm M, Heinzow B, Angerer J, Schulz C. Reassessment of critical lead effects by the German Human Biomonitoring Commission results in suspension of the human biomonitoring values (HBM I and HBM II) for lead in blood of children and adults. *Int J Hyg Environ Health*. 2010;213:265-9.

Wilhelm M, Schulz C, Schwenk M. Revised and new reference values for arsenic, cadmium, lead, and mercury in blood or urine of children: Basis for validation of human biomonitoring data in environmental medicine. *Int J Hyg Environ Health*. 2006;209:301-5.

Xu HM, Cao JJ, Ho KF, Ding H, Han, YM, Wang GH, Chow JC, Watson JG, Khol SD, Qiang J, Li WT. Lead concentrations in fine particulate matter after the phasing out of leaded gasoline in Xi'an, China. *Atmos Environ*. 2012; 46:217-24.

Yabe J, Nakayama SMM, Ikenaka Y, Muzandu K, Ishizuka M, Uemura T. Accumulation of metals in the liver and kidneys of cattle from agricultural áreas in Lusaka, Zambia. *J Vet Med Sci*. 2012;74(10):1345-7.