UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Renan Martins Varrique

**Elaboração de valores de referência urinários para elementos
químicos essenciais e não essenciais em crianças brasileiras**

Ribeirão Preto
2014

RENAN MARTINS VARRIQUE

Elaboração de valores de referência urinários para elementos químicos essenciais e não essenciais em crianças brasileiras

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Varrique, Renan Martins.

Elaboração de valores de referência urinários para elementos químicos essenciais e não essenciais em crianças brasileiras. Ribeirão Preto, 2014. 77 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barbosa Júnior, Fernando.

1. Biomonitoramento. 2. Valor de referência. 3. Crianças. 4. ICP-MS.

VARRIQUE, Renan Martins.

Elaboração de valores de referência urinários para elementos químicos essenciais e não essenciais em crianças brasileiras

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, José Sérgio e Cássia, por permitirem que eu voasse sozinho, mas estando sempre prontos para me acolher e me amparar, e aos meus irmãos, Rodrigo e Rodolfo, pelo companheirismo e carinho, por saberem ouvir, quando eu tenho algo a dizer, e saberem se impor, quando sou eu quem precisa escutar.

“Desejo que você não tenha medo da vida,
Tenha medo de não vivê-la.
Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes.
Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo.
Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la.
Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência.
Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina,
Sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas.
Seja um debatedor de ideias. Lute pelos seus sonhos.”
(Augusto Cury)

Gostaria de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, participaram do meu Mestrado e possibilitaram a concretização deste trabalho e a todos aqueles que me acompanharam e me ajudaram de alguma forma, estando perto ou longe.

Ao Professor Doutor Fernando Barbosa Júnior, pela oportunidade e credibilidade no trabalho.

Aos amigos de laboratório, companheiros do dia a dia de trabalho: Juliana, Eloísa, Vinícius, Maria Fernanda, Kátia, Airton, Ana Paula, Ana Carolina, Gustavo, Vivian, Vânia, Letícia e Rodolfo, pelas opiniões, motivações e pelo carinho do convívio.

À nossa técnica de laboratório, Vanessa, pela dedicação, paciência e disposição em ajudar e compartilhar todo o seu conhecimento.

Aos colegas que de forma mais próxima trabalharam comigo: Juliana, Ana Carolina e Kátia, por toda a ajuda prática e teórica, pela paciência e, principalmente, pelas experiências compartilhadas e pelas palavras de incentivo.

Aos professores Daniel Junqueira Dorta, pelas palavras de incentivo e pela grande ajuda para prosseguir o trabalho, e Danielle Palma de Oliveira, pelas diversas considerações feitas em relação ao estudo, as quais foram de extrema valia.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela dedicação ao trabalho e preocupação com cada aluno, em especial à Rosemary e à Rosana, pela atenção e paciência.

Aos meus pais, irmãos e a toda minha família, pelo carinho, apoio e palavras de motivação.

A toda minha “segunda família”: Poliana, Alessandra, Jamile, Flávia, Vanessa Munhoz, Vanessa Ceratti, Raquel, Leandro e João. Vocês me fizeram crescer, aprender, aproveitar, ouvir, falar, rir, chorar, rir novamente e agora, separados pela vida, me fizeram entender o verdadeiro significado da palavra saudade.

Ao amigo de longa data, altas aventuras e sincera parceria, Wellington (Guito), agradeço pelas inúmeras palavras de incentivo e apoio e, principalmente, por saber manter-se firme, mesmo diante do meu desespero.

Aos novos amigos que a vida me presenteou – Juliana, Otávio, Tiago, Larissa, Tainah e Júlio. É preciso encontrar o lado bom de toda mudança, essas pessoas com certeza tornam a vida muito mais alegre e divertida.

A Deus, por segurar minha mão a cada passo dado, colocando essas pessoas em minha vida, guiando meus caminhos e me dando força para ver que a vida vai muito além do que os olhos podem enxergar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de Mestrado e pelo apoio financeiro que permitiu a realização desta pesquisa.

“Não confunda jamais conhecimento com sabedoria. Um o ajuda a ganhar a vida; o outro a construir uma vida”.

(Sandra Carey)

VARRIQUE, R. M. **Elaboração de valores de referência urinários para elementos químicos essenciais e não essenciais em crianças brasileiras**. 2014. 77f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

No Brasil, ainda não há a realização de pesquisas envolvendo a determinação de elementos químicos em fluidos biológicos e a elaboração de valores de referência para a sua população infantil. O biomonitoramento de elementos químicos apresenta essencial importância na avaliação da saúde humana, no entanto, na análise dos dados dos estudos brasileiros de biomonitoramento, os resultados obtidos são geralmente comparados com valores estipulados para outros países, o que pode gerar uma estimativa equivocada do risco. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi descrever as concentrações médias urinárias de elementos químicos essenciais e não essenciais em crianças brasileiras em fase escolar (6-14 anos), propondo valores de referência para Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb. Para o desenvolvimento do estudo, foram utilizadas amostras de urina obtidas pela “Pesquisa Nacional para Avaliação do Impacto da Iodação do Sal” (PNAISAL), sendo tomada uma amostragem de 6.965, escolhidas aleatoriamente, abrangendo 19 unidades da federação e contemplando as 5 regiões brasileiras. As determinações dos elementos químicos foram realizadas por método de ajuste de matriz, com simples diluição de urina e análise direta por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Foi realizada dosagem de creatinina nas amostras para ajuste de matriz e correção de possíveis efeitos de diluição. As concentrações médias obtidas para os elementos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb foram 0,267, 0,769, 7,949, 66,839, 0,022 e 2,389 $\mu\text{g/g}$ de creatinina, respectivamente. Os dados obtidos foram comparados com resultados de estudos de biomonitoramento para população adulta brasileira e de outros países, evidenciando a necessidade da estipulação de valores próprios para a população infantil brasileira.

Palavras-chave: Valor de referência, biomonitoramento, urina, crianças, ICP-MS.

VARRIQUE, R. M. Establishment of urinary reference values for essential and non-essential chemical elements in Brazilian children. **2014**. 77f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, **2014**.

There is no research involving the determination of chemical elements in biological fluids and the development of reference values in Brazil for its child population. Human biomonitoring of chemical elements has great importance in human health assessment, however, in analysis of Brazilian biomonitoring studies, the results are usually compared with values established for other countries, which can lead to an erroneous estimate of the risk. Thus, the aim of this study was to determine the concentration of essential and nonessential elements in Brazilian children (6-14 years), proposing reference values for Cd, Co, Li, Mo, Pt and Sb. To develop the study, urine samples obtained by the “Pesquisa Nacional para Avaliação do Impacto da Iodação do Sal” (PNAISAL) were used, taking a sample of 6,965 randomly chosen, covering all Brazilian regions. Samples were directly analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry ICP-MS against matrix-matching calibration. Creatinine measurement was done to correct possible effects of sample dilution. The mean concentrations obtained for Cd, Co, Li, Mo, Sb and Pt elements were 0.267, 0.769, 7.949, 66.839, 0.022 and 2.389 $\mu\text{g/g}$ of creatinine, respectively. The data were compared with results from biomonitoring studies for Brazilian adult and foreign populations, highlighting the need for stipulation of reference values for Brazilian child population.

Keywords: Reference value, human biomonitoring, urine, children, ICP-MS.

Figura 1 - Determinação dos elementos químicos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb por método de ajuste de matriz e análise por ICP-MS	19
Figura 2 - Dosagem de creatinina pelo procedimento de ensaio direto por sistema colorimétrico por reação de ponto final.....	21
Figura 3 - Concentração de Co ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) da população infantil brasileira por idade (6 a 14 anos). ANOVA seguida de teste <i>Tukey</i> . (*) estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$).....	28
Figura 4 - Concentrações dos elementos químicos Cd, Li, Mo, Pt e Sb ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) da população infantil brasileira por idade (6 a 14 anos). ANOVA seguido do teste <i>Tukey</i>	29
Figura 5 - Concentrações dos elementos químicos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) da população infantil brasileira por região. ANOVA seguido do teste <i>Tukey</i>	32
Figura 6 - Concentrações dos elementos químicos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) da população infantil brasileira por sexo. Teste t.	35

Tabela 1. Número de amostras analisadas no presente estudo divididas por região, UF e sexo .	24
Tabela 2. Concentrações dos elementos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) para a população infantil brasileira estudada	25
Tabela 3. Comparação dos dados obtidos no presente estudo para a população de crianças brasileiras com valores obtidos por diferentes estudos	26

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AL	Alagoas
Al	Alumínio
As	Arsênio
BA	Bahia
Ba	Bário
Be	Berílio
Cd	Cádmio
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CE	Ceará
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHMS	<i>Canadian Health Measures Survey</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cs	Césio
Cu	Cobre
CZ-HBM	<i>Czech Republic-Human Biomonitoring Project</i>
DECIT	Departamento de Ciência e Tecnologia
DF	Distrito Federal
EHMS	<i>Environmental Health Monitoring System</i>
ELFE	<i>Etude Longitudinale Francaise depuis l'Enfance</i>
UNEP	<i>United Nations Environment Programme</i>
ENNS	<i>Etude Nationale Nutrition Sante</i>

ES	Espírito Santo
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Fe	Ferro
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
GO	Goiás
Hg	Mercurio
ICP-MS	Espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente
MA	Maranhão
MG	Minas Gerais
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
NCHS	Centro Nacional para Estatísticas de Saúde
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
Ni	Níquel
PA	Pará
Pb	Chumbo
PCB	Policloreto de bifenilo
PI	Piauí
PNAISAL	Pesquisa Nacional para Avaliação do Impacto da Iodação do Sal
PR	Paraná
PROBE	<i>Programme for Biomonitoring of the Exposure</i>

Pt	Platina
RJ	Rio de Janeiro
RS	Rio Grande do Sul
Sb	Antimônio
SC	Santa Catarina
SE	Sergipe
Se	Selênio
Si	Silício
Sn	Estanho
SP	São Paulo
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science®</i>
Tl	Tálio
TO	Tocantins
U	Urânio
UF	Unidades da Federação
USP	Universidade de São Paulo
V	Vanádio
VR	Valor de Referência
WHO	<i>World Health Organization</i>
Zn	Zinco

%	porcentagem
®	marca registrada
λ	lambda
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
HNO_3	ácido nítrico
h	horas
min	minutos
pH	potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

Resumo	ii
Abstract	iv
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
Lista de Símbolos	xiv
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Biomonitoramento e valores de referência.....	2
1.2 Elaboração de valores de referência	5
1.3 Determinação de elementos químicos em urina.....	5
1.3.1 Elementos químicos essenciais.....	8
1.3.2 Elemento químico potencialmente tóxico	10
1.3.3 Demais elementos químicos de interesse	11
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo principal.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 População e amostragem	17
3.2 Reagentes e instrumentação	18
3.3 Determinações dos elementos químicos por ajuste de matriz	19
3.4 Dosagem de creatinina	20
3.5 Análise estatística.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO.....	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biomonitoramento e valores de referência

O biomonitoramento tem sido usado por mais de um século na saúde ocupacional como parte de uma estratégia preventiva na vigilância em saúde do trabalhador e, mais recentemente, seu uso tem-se ampliado e sua eficácia cada vez mais reconhecida em outras áreas, como em pesquisas de saúde ambiental, vigilância sanitária e saúde pública (BOCCA et al., 2011).

O termo biomonitoramento, também chamado monitoramento biológico, é definido como a avaliação da exposição a uma determinada substância em fluidos biológicos (urina, sangue, saliva, entre outros) ou em um tecido pela medição da própria substância, de seus metabólitos ou de seus produtos de reação, por meio da avaliação de sua dose interna, ou seja, da medida da concentração que foi absorvida pelo organismo e agora se encontra nos fluidos biológicos ou no tecido, utilizando para isso biomarcadores que expressam alterações a nível celular ou molecular (PASCHAL, 2007).

Por meio de estudos de biomonitoramento, é possível identificar a deficiência de elementos essenciais em uma pessoa ou população ou ainda a exposição a elementos tóxicos, sendo uma medida de extrema valia no contexto da saúde humana, considerando que as pessoas estão expostas diariamente a um número enorme de substâncias químicas naturais e artificiais, bem como aos seus metabólitos. Esta exposição ocorre a partir do ar, dos alimentos e da água, além dos diversos produtos de consumo aos quais as pessoas estão em contato (PAUSTENBACH; GALBRAITH, 2006).

Em todo o mundo, o monitoramento biológico em diferentes matrizes tem-se tornado a prática padrão na avaliação de exposição a substâncias tóxicas, bem como, na avaliação e solução de problemas de saúde pública e ambiental, sendo considerado uma ferramenta pragmática capaz de fornecer os determinantes de exposição de uma população aos diversos tipos de contaminantes (BOOGAARD; HAYS; AYLWARD, 2011). Tal importância se torna evidente ao constatar a ação de diversos países desenvolvidos e órgãos internacionais, que cada vez mais estabelecem pesquisas em larga escala de estudos de biomonitoramento de sua população (CDC, 2012; WILHELM; SCHULZ; SCHWENK, 2006; SCHULZ et al., 2009).

No contexto de implementação de programas nacionais ou regionais de biomonitoramento alguns países ou regiões podem ser citados. A Alemanha possui o programa *Environmental Specimen Bank for Human Tissues*, como parte do programa

German Environmental Specimen Bank existente desde 1974. Nos Estados Unidos da América (EUA), a determinação de elementos químicos em amostras de urina e sangue de sua população faz parte do *U.S. National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), um programa de pesquisa realizado pelo Centro Nacional para Estatísticas de Saúde (NCHS) que avalia a saúde e o estado nutricional de adultos e crianças, acompanhando as mudanças ao longo do tempo (CDC, 2012).

Outros países se enquadram na atual realidade da maioria dos países desenvolvidos, como a Eslovênia e Suécia, e ainda a região de Flandres (região norte da Bélgica), com o fortalecimento da prática de biomonitoramento de suas populações desde 2002 (JOAS et al., 2012).

No Canadá, foi instaurado o programa *Canadian Health Measures Survey* (CHMS), uma pesquisa geral de saúde a nível nacional e que apresenta, como um de seus componentes, estudos de biomonitoramento. Como objetivos principais, os estudos de monitoramento da população canadense visam estabelecer concentrações de diversos elementos químicos em sangue e urina representativas de sua população, fornecer base de dados para possibilitar a comparação com valores encontrados para subpopulações canadenses e com populações de outros países e fornecer dados que permitam explorar a relação entre as concentrações dos compostos químicos com outras medidas físicas e com as informações coletadas no questionário aplicado aos participantes da pesquisa (HAINES; MURRAY, 2012).

Na República Checa, foi lançado em 1994 o *Human Biomonitoring Project* (CZ-HBM) como parte integrante do programa nacional *Environmental Health Monitoring System* (EHMS). O projeto CZ-HBM inclui três grupos populacionais, sendo um de adultos de faixa etária de 18 a 58 anos, um segundo grupo formado por crianças de 8 a 10 anos e um grupo final constituído por lactantes primíparas. Esse estudo já abrangeu dois períodos, o primeiro de 1994 a 2003 e o segundo de 2005 a 2009 (CERNÁ et al., 2012).

Já iniciativas mais recentes são encontradas na Itália, que estabeleceu em 2008 o *Programme for Biomonitoring of the Exposure* (PROBE), desenvolvido pelo Ministério da Saúde italiano e que avalia a exposição a vários metais no sangue (PINO et al., 2012). Já na França, foi instituído, como parte do *French Nutrition and Health Survey*, o programa *Etude Nationale Nutrition Sante* (ENNS), o qual tem como proposta a elaboração de valores de referência para 42 biomarcadores para a população francesa de idade de 6 a 74 anos, sendo complementado pelo *Etude Longitudinale Francaise depuis l'Enfance* (ELFE) que abrange o período neonatal e a infância (FRERY et al., 2012). Também recentemente, na Espanha o Ministério do Meio Ambiente espanhol fundou um estudo de biomonitoramento para a sua

população geral no intuito de determinar valores de referência para diversos elementos no sangue, na urina e no cabelo (CASTANO et al., 2012).

Além disso, algumas organizações mundiais também estão cada vez mais engajadas em estudos de biomonitoramento, desempenhando importante papel na determinação de concentrações de diversos elementos. Como exemplo pode-se citar a *World Health Organization* (WHO) que realiza o monitoramento de níveis de dioxina e de policloreto de bifenilo (PCB) em leite materno e também a *United Nations Environment Programme* (UNEP), a qual gerencia estudos relacionados ao biomonitoramento de mercúrio (ARENDT, 2008).

No entanto, para que o monitoramento biológico seja realizado é necessário comparar o resultado obtido na avaliação com um valor já determinado, o chamado valor de referência (VR). Tradicionalmente, a interpretação dos resultados de testes laboratoriais se dava através da comparação dos valores obtidos com os chamados “valores normais”. O termo “valor normal” apresenta três significados principais: clínico, epidemiológico e estatístico, de acordo com o contexto em que é usado. No entanto, esse termo não foi considerado apropriado para expressar os conceitos aos quais está teoricamente ligado na química clínica (APOSTOLI; MINOIA; HAMILTON, 1997).

Em 1968, o conceito de valor de referência foi proposto por Grasbeck e Saris no intuito de estabelecer uma terminologia mais adequada e objetivando interpretar corretamente os dados da química clínica. Para isso, basearam-se no conceito de comparação entre 2 termos: o “desconhecido” – que deve ser interpretado e o “referência” – que pode ser usado para interpretar. Outra importante observação foi feita ainda por Grasbeck e Saris (1989), quando estes afirmaram que a diferença mais importante entre valores normais e valores de referência é que, usando um VR têm-se informações garantidas em relação aos materiais analisados, bem como as condições de amostragem, a análise aplicada e o tipo de estatística utilizada na elaboração dos dados (KUNO, 2009).

Seguindo essa premissa afirma-se que, estudos de biomonitoramento tratam da comparação da concentração de substâncias presentes em tecidos ou fluidos humanos com o valor de concentração dessas mesmas substâncias que se espera encontrar em uma população não exposta, ou seja, compara-se com o VR (ZEINER et al., 2006). O uso dos VRs, portanto, tem grande valia na avaliação dos riscos à saúde, ressaltando o tipo e a magnitude da exposição, uma vez que, sabendo-se o VR de um determinado elemento químico, associado ao conhecimento das características toxicológicas desse elemento, torna-se possível avaliar a exposição de uma determinada população, caracterizando os riscos a essa exposição e

permitindo, por conseguinte, um gerenciamento mais elaborado de políticas em saúde pública (PASCHAL, 2007).

Por essa razão, muitos estudos de larga escala foram iniciados em diversos países a fim de estabelecer valores basais de elementos químicos para populações específicas a fim de evitar dados de biomonitoramento equivocados.

1.2 Elaboração de valores de referência

Para a elaboração de um VR, o seu propósito deve ser estabelecido com precisão. As várias fases dessa elaboração devem considerar os diferentes fatores da variabilidade biológica, como as características do indicador e da população analisada, assim como os fatores de variabilidade analítica relacionados à amostragem e tratamento das amostras, além dos métodos de análise e a elaboração de dados. Desse modo afirma-se que, entre os fatores determinantes na elaboração de VRs considera-se o uso de métodos analíticos precisos que possibilitem o fornecimento de dados confiáveis, além de sua correta interpretação. Fatores analíticos, instrumentação, controle de qualidade, seleção cautelosa da poluição a ser analisada e o correto tratamento estatístico compreendem outros aspectos influentes nesse processo, bem como os fatores pré-analítico, como a amostragem, transporte, conservação e preparo das amostras (APOSTOLI; MINOIA; HAMILTON, 1997).

1.3 Determinação de elementos químicos em urina

Os elementos químicos atuam nos sistemas biológicos participando de um modo geral do controle homeostático, mantendo assim o funcionamento constante e equilibrado do organismo, sendo esses elementos metálicos, semi-metálicos e não metálicos (GOYER; KLAASSEN; WAALKES, 1995). Entre eles têm-se os designados essenciais, sendo que desse grupo, alguns são considerados como elementos traço. A designação de elementos essenciais deve-se ao fato de seu baixo consumo gerar algumas patologias, sendo que os sintomas podem ser amenizados ou eliminados quando há inclusão desses nutrientes na dieta (PATRIARCA et al., 1998). Os elementos traço são aqueles encontrados no organismo em pequenas quantidades (menos que 0,1g/Kg corpóreo), como o Co, Cu, Cr, Mn, Mo, Ni, Se, Si, V e Zn. Alguns elementos, em especial o As, Cd, Hg, Pb e, em menor extensão, Ni, Sb, Tl e Pt, são uma preocupação no âmbito da saúde pública, sendo o As, Cd, Pb e Ni carcinogênicos (ZEINER et al., 2006).

Inúmeros estudos relatam a importância dos elementos traço relacionados na saúde humana e no quadro de algumas patologias.

Muitos elementos traço essenciais estão presentes na composição de complexos proteicos, como as metaloproteínas, e são necessários para o desenvolvimento das atividades enzimáticas. O organismo, quando em situações de escassez ou falta de elementos essenciais, não é capaz de completar o seu ciclo de vida normal e tampouco alcançar um crescimento saudável. Já os elementos traço não essenciais, são assim designados por não possuírem, até o momento, funções biológicas estabelecidas e, além disso, podem ser considerados tóxicos em condições específicas (BRYAN; CHRISTOPHER; BALMER, 2007)

A contaminação ambiental por um determinado elemento químico pode estar relacionada tanto a fontes naturais como a atividades industriais que dele se utiliza (KLAASSEN, 2001). Esses elementos chegam até o organismo através da alimentação, água potável e o ar inspirado e apresentam importância fisiológica, sejam essenciais ou tóxicos, como o cádmio e mercúrio (GOYER; KLAASSEN; WAALKES, 1995). Há várias vias de exposição a esses compostos, sendo as principais a via oral, a respiratória e a dérmica, onde a concentração final no organismo é relativa à sua taxa de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Por exemplo um elemento pode ser excretado sem ser biotransformado, ou ser metabolizado e rapidamente excretado, também pode ser armazenado no organismo e lentamente ser excretado ou ainda uma combinação de todos esses processos (NEEDHAM et al., 2005). Os elementos podem ser excretados em algumas matrizes como urina, fezes, saliva e leite materno ou ainda serem armazenados em alguns tecidos, como por exemplo, o tecido adiposo e ósseo. Sabe-se ainda que a presença de muitos desses elementos no organismo podem causar diversos efeitos negativos à saúde ou até mesmo levar a alguma patologia (CDC, 2012).

É válido considerar que uma resposta tóxica a um elemento, no entanto, é dependente não apenas das propriedades físico-químicas desse elemento, mas também da intensidade, frequência e duração da exposição, sendo muito curtos os intervalos de concentração determinantes entre deficiência, essencialidade e toxicidade.

Medidas de controle são, portanto, essenciais no intuito de reduzir o risco de exposição e, como reflexo, evitar os efeitos adversos da mesma. A presença de compostos químicos no meio ambiente pode ser determinada pela medida de suas concentrações em algumas matrizes ambientais como o ar, a água, o solo, alimentos, entre outros; essa medida é chamada de monitoramento ambiental. No entanto, a presença desses compostos em matrizes ambientais não necessariamente implica em risco aos seres humanos, sendo de fundamental

importância a medição das concentrações desses elementos em matrizes biológicas através do biomonitoramento. Por sua vez, a escolha da matriz biológica merece grande destaque no processo do monitoramento biológico, vários tipos podem ser usados, mas nenhuma delas pode ser considerada usual para todas as situações, ou seja, não há uma única matriz ideal. Uma matriz próxima do ideal deve possuir algumas características, como por exemplo, (1)- deve ser acessível em quantidades suficientes para as análises, (2)- não deve apresentar riscos ao doador, sendo de fácil coleta e armazenamento, (3)- deve conter concentrações do elemento detectáveis a técnica de análise a ser usada e (4)- deve ser funcional para a determinação do maior número de elementos possíveis (ESTEBAN; CASTAÑO, 2009).

O sangue é a matriz mais comumente utilizada, no entanto, o procedimento para sua coleta é invasivo. A urina, por sua vez, é a segunda matriz mais comumente utilizada em análises de biomonitoramento e a primeira em se tratando de matrizes não invasivas, particularmente para compostos químicos solúveis em água.

Além disso, trata-se de uma importante via de excreção de metais e é amplamente utilizada em estudos de biomonitoramento devido à facilidade de coleta e armazenamento e ao simples preparo da amostra (ZEINER et al., 2006).

A coleta pode se dar por duas formas, por amostras pontuais ou por urina de 24h, entretanto, como a coleta completa da urina no decorrer de um dia é de difícil aplicação prática o uso de coleta única tem-se tornado preferencial, podendo ser realizada a qualquer momento do dia. Porém, apesar de sua praticidade, dada a maior facilidade e rapidez de amostragem, o volume da amostra e as concentrações dos elementos presentes nela são variáveis, o que implica na necessidade de ajuste da matriz.

O ajuste de matriz pode ser feito por diferentes métodos, sendo a correção de concentração por creatinina o mais usual (BARR et al., 2005).

A creatinina plasmática é derivada quase que totalmente do catabolismo da creatina presente no tecido muscular. A sua excreção se dá exclusivamente por via renal já que não é reabsorvida e nem reaproveitada pelo organismo, sendo filtrada livremente pelo glomérulo e encontrando-se no filtrado glomerular na mesma concentração que o sangue. Sendo assim, os níveis de creatinina plasmática refletem a taxa de filtração renal, indicando que níveis elevados de creatinina são característicos de má funcionalidade dos rins.

Um estado de desidratação leva a intensa reabsorção de água nos túbulos renais o que gera, por conseguinte, o aumento da taxa de creatinina urinária. Já em casos de diurese o contrário é observado (CHEN et al., 1992).

A creatinina urinária é um importante parâmetro para o ajuste de concentração de elementos presentes em amostras em diferentes diluições, uma vez que a creatinina é eliminada na urina em taxas praticamente constantes. Dessa forma, a creatinina compensa os efeitos diuréticos, tais como a diluição ou concentração da urina, resultantes de uma ingestão farta ou escassa de água, respectivamente.

Bader, Messerer e Will (2013) demonstraram que, a administração de doses idênticas de um determinado elemento a diferentes indivíduos pode gerar diferentes resultados de concentração urinária desse analito. Naquele estudo, observou-se que, as concentrações do analito foram menores nas pessoas cuja urina estava diluída quando comparadas às pessoas que apresentaram urina concentrada.

Assim, a diferença causada pela diluição urinária pode levar a uma estimativa equivocada dos dados de concentração, especialmente quando a exposição ocorre em baixas doses.

Os elementos químicos considerados nesse projeto são relevantes do ponto de vista toxicológico e nutricional, cujos aspectos de maior importância são apresentados a seguir:

1.3.1 Elementos químicos essenciais

O cobalto (Co) é um metal branco-acinzentado com propriedades magnéticas similares ao ferro e seus principais estados de oxidação são +2 e +3, sendo a maioria de seus compostos disponíveis encontrados no estado de valência +2.

Trata-se de um elemento relativamente raro, ocorrendo na crosta terrestre na faixa de 0,001 - 0,002%, onde é encontrado na forma de minérios tais como a cobaltita, linneita, esmalta e eritrita (BARCELOUX, 1999).

O cobalto na forma de cobalamina, sintetizada na flora intestinal, é um componente essencial da vitamina B12, fundamental para a produção de células vermelhas e na prevenção da anemia perniciosa.

No uso industrial, a sua principal utilização se dá na produção de ligas metálicas. Do ponto de vista ocupacional, as principais vias de exposição são a respiratória e a dérmica aonde a exposição dos trabalhadores ocorre durante o processo de moagem do minério, mistura do pó com outros componentes e usinagem do aço na produção de ferramentas e peças para maquinários, tais como brocas e discos para polimento. Quantidades menores são também utilizadas na produção de outras manufaturas, como catalisadores e pigmentos (ALVES; ROSA, 2003).

Já a população em geral está exposta ao cobalto presente no solo, ar e água. No entanto, a dieta representa a principal fonte de exposição, com o consumo de alimentos como carne, leite, vegetais de folhas verdes, fígado, mariscos e ostras.

Quando absorvido por via oral, o cobalto não apresenta taxas de bioacumulação significativas, sendo as maiores concentrações encontradas no fígado. O excesso de elemento no organismo pode provocar diarreia, vômito, aumento da pressão sanguínea e cardiomiopatias. Cerca de 80% do cobalto ingerido é excretado na urina e 15% nas fezes. (SCHRAUZER, 1995).

O molibdênio (Mo) é um elemento químico de cor branco-prateado e de alta dureza, extensamente usado para proporcionar força e dureza e retardar o processo de corrosão de ligas metálicas. Compostos de Mo também são usados como catalisadores de hidrogenação, lubrificantes, reagentes químicos em laboratórios hospitalares e em pigmentos para cerâmicas e tintas. Seu uso mais recente tem sido verificado nas indústrias de baterias e semicondutores. Além disso, esse metal pode ser encontrado em águas naturais e no solo (CDC, 2012).

Trata-se de um elemento traço essencial com vários estados de oxidação (+3, +4, +5 e +6), atuando no organismo humano como co-fator para três classes de enzimas: sulfito oxidase, aldeído desidrogenase e xantina oxidase (ANKE et al., 2010).

Do ponto de vista ocupacional, a principal via de exposição se dá pela inalação de poeira e outras finas partículas produzidas durante o refinamento do Mo ou de ligas metálicas contendo esse metal.

A população em geral, no entanto, está exposta a partir de fontes dietéticas, pelo consumo de alimentos como leguminosas, grãos de cereais, vegetais de folha verde e vísceras.

Os compostos hexavalentes deste elemento são bem absorvidos no trato gastrointestinal e depois levados ao fígado, um dos principais locais de seu armazenamento, seguido pelos rins, tecido adiposo e sangue. A concentração no organismo de recém-nascidos é baixa e aumenta até os 20 anos, diminuindo novamente em seguida. A excreção se dá primeiramente pelos rins, fator considerável no uso da urina como matriz em estudos de biomonitoramento (KISKER; SCHINDELIN; REES, 1997).

1.3.2 Elemento químico potencialmente tóxico

O cádmio (Cd) é um dos poluentes ambientais mais importantes. Ele e seus compostos podem ser altamente tóxicos a humanos e animais, causando graves patologias em casos de exposições longas e excessivas.

O uso comercial predominante do cádmio se dá na fabricação de baterias, sendo usado também na produção de tintas e pigmentos. A inalação da fumaça do cigarro é outra fonte de exposição de grande importância, sendo as concentrações de cádmio em fumantes praticamente o dobro das encontradas em não fumantes (DIAMOND et al., 2003).

Já a população em geral, não fumante e não exposta no ambiente de trabalho, está exposta principalmente pela via oral pela ingestão de alimentos e água. O Cd presente no solo é captado pelas raízes dos vegetais, sendo encontrado em muitas culturas alimentares, como trigo, arroz, batata e diversos tipos de sementes. A água potável, em menor grau, também é uma fonte de exposição a este elemento (ROELS et al. 1999).

Entretanto, a principal via de absorção do cádmio é a respiratória, sendo que cerca de 55% do cádmio depositado nos pulmões é absorvido. Já a absorção gastrointestinal é alterada por fatores nutricionais, como a deficiência de ferro na dieta e o consumo de fibras. O Cd absorvido é distribuído a várias partes do organismo, sendo transportado no plasma complexado com metalotioneínas.

Um quadro de exposição crônica leva ao acúmulo de Cd no fígado e, principalmente, nos rins, acumulando-se ainda no pâncreas, pulmões, testículos e tireóide. Danos renais são os primeiros sinais de toxicidade ao Cd, com o desenvolvimento de quadros irreversíveis de proteinúria e redução progressiva da taxa de filtração glomerular. Na avaliação da exposição a este elemento é imprescindível considerar o tabagismo, pois se calcula que de 20 a 50% do cádmio proveniente do cigarro seja absorvido.

Uma vez absorvido através da via respiratória, a excreção se dá principalmente pela via urinária, já quando a exposição se dá por via oral, as maiores taxas de excreção se dão nas fezes. No entanto, nas exposições a pequenas ou médias concentrações, a quantidade excretada nas fezes é praticamente a mesma na urina (DIAMOND et al., 2003).

O Cd está entre os elementos químicos delineados na NHANES, publicado pela *National Center for Health Statistics* nos *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), o qual faz a avaliação da exposição da população dos EUA a esses elementos, bem como avaliação da saúde e do estado nutricional. A NHANES classificou-o como tóxico e sabe-se

que a urina é um dos caminhos fisiológicos de excreção de Cd, salientando o uso da urina para o biomonitoramento da população (MINNICH; MILLER; PARSONS, 2008).

1.3.3 Demais elementos químicos de interesse

O antimônio (Sb) é um elemento químico prateado e quebradiço em sua forma metálica, podendo ser encontrado em uma de suas quatro valências (-3, 0, +3 e +5). Pode ser encontrado em minérios combinado com o oxigênio, formando trióxido de antimônio, ou ainda associado com enxofre, levando à formação de stibnite.

O uso desse elemento é amplo, estando presente em ligas metálicas, baterias, na solda, em folhas e tubulações metálicas, em munições e rolamentos. Pode ser achado ainda em tintas, cerâmicas, fogos de artifício, esmaltes, em vidros, entre outros produtos (CDC, 2012). Além disso, dois compostos desse elemento são usados na indústria farmacêutica para a produção de medicamentos de primeira-escolha na terapia contra Leishmaniose (WHO, 2007).

O Sb é encontrado no ambiente pelo seu uso industrial e também por fontes naturais. A exposição ocupacional geralmente ocorre em fundições, usinas movidas a carvão e indústrias em geral que processam esse elemento, sendo a via dérmica e inalatória uma importante via de exposição ocupacional (CDC, 2012).

As pessoas em geral estão mais expostas aos compostos de antimônio através da alimentação. A ingestão pode causar efeitos tóxicos no intestino, estômago, coração, pele, fígado e sistema nervoso uma vez que a ligação com os grupos sulfidríla inibe o metabolismo de proteínas e carboidratos (HAYES, 2001). A absorção, distribuição e excreção de antimônio variam de acordo com seu estado de oxidação, onde a excreção urinária parece ser maior para o antimônio pentavalente (ELINDER; FRIBERG, 1986).

O lítio (Li) na sua forma pura é um metal macio, de coloração branco-prateada, que se oxida rapidamente no ar ou na água. É um elemento sólido, porém leve, com densidade menor que a da água. Trata-se de um elemento químico escasso na crosta terrestre, encontrado disperso em certas rochas e também em sais naturais, águas salgadas e águas naturais, no entanto, é um elemento alcalino, monovalente e bastante reativo, não sendo encontrado livremente na natureza.

Quando na forma pura, é altamente inflamável e ligeiramente explosivo quando exposto ao ar e, especialmente, à água, além disso, é corrosivo, requerendo o emprego de meios adequados de manipulação para evitar o contato com a pele.

Devido ao seu elevado calor específico, esse elemento é usado em aplicações de transferência de calor, principalmente na produção de ligas metálicas. Também é usado como um ânodo para a produção de baterias elétricas, graças ao seu elevado potencial eletroquímico. Além disso, os sais de lítio são amplamente utilizados no tratamento de transtorno bipolar (GRANDJEAN; AUBRY, 2009).

Os sais de lítio têm aprovação para o tratamento de transtorno bipolar no Brasil e nos EUA, sendo o carbonato de lítio a forma mais utilizada. Inicialmente, esse sal foi classificado como um antipsicótico sendo, posteriormente, reconhecido como antimaníaco, por seus efeitos reguladores de humor, e, secundariamente, como um antidepressivo (sua eficácia para a depressão unipolar, entretanto, ainda não foi bem estabelecida).

No entanto, o carbonato de lítio utilizado no tratamento de desordens maníaco-depressivas deve ser cuidadosamente biomonitorado, devido a seu baixo índice terapêutico, evitando assim quadros de intoxicação (KLAASSEN, 2001).

Foi estabelecido que grandes doses de lítio (até 10 mg L^{-1}) são indicadas para pacientes com transtorno bipolar, sabendo-se que quantidades superiores a essa podem intoxicar o usuário. Com o aumento dessa dose, há um aumento proporcional dos efeitos tóxicos, onde uma administração de 15 mg L^{-1} gera confusão mental e comprometimento da fala e, quando elevada para 20 mg L^{-1} , há um risco grande de morte (ARAL; VECCHIO-SADUS, 2008).

A população em geral está exposta ao Li por fontes dietéticas. A ingestão diária por meio da alimentação é de cerca de 2mg, sendo prontamente absorvido no trato gastrointestinal. A meia-vida biológica deste elemento químico em indivíduos saudáveis é de 12 a 27 horas no plasma.

A platina (Pt) é um metal brilhante de coloração prata-acinzentada, encontrado naturalmente em quantidades muito baixas na crosta terrestre e geralmente em associação ao Ni, Cu e Fe. Trata-se de um elemento químico resistente a corrosão, extremamente resistente a altas temperaturas e de alta atividade catalítica.

Compostos de Pt são usados em eletrodos, jóias, ligas dentárias, como catalisadores e também como medicamentos antitumorais (carboplatina, oxaloplatina e cisplatina). Os cristais de platina-ródio e platina-paládio são utilizados como catalisadores em veículos e no refinamento de petróleo, o que aumenta a concentração desse elemento em áreas próximas de rodovias (CDC, 2012).

Efeitos adversos resultantes de exposições ambientais a baixas doses de Pt ainda são desconhecidos. A toxicidade, no entanto, está relacionada à forma do elemento em questão.

De um modo geral, tem-se que os sais de platina são responsáveis por diversos tipos de alergias no homem, sendo que alguns sais podem permanecer no organismo durante anos. Já a Pt no estado metálico é biologicamente inerte, ao contrário dos compostos solúveis, que podem causar asma, bronquite e dermatites, dependendo da via de exposição. Os agentes antitumorais, por sua vez, apresentam graves efeitos de toxicidade renal, com especial atenção a cisplatina, pois estudos demonstraram potencial carcinogênico. (KLAASEN, 2001).

Uma vez em contato com a Pt, seja por ingestão ou inalação da forma metálica ou dos sais insolúveis, apenas uma pequena quantidade é absorvida, acumulando-se principalmente nos rins e sendo excretada pela urina (MOORE et al., 1975).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

O objetivo geral do estudo foi descrever as concentrações médias urinárias de elementos químicos essenciais e não essenciais em crianças brasileiras em fase escolar (6-14 anos).

2.2 Objetivos específicos

Dentro do contexto apresentado acima, os objetivos específicos deste estudo incluíram:

- Determinação dos elementos Co, As, Mo, Sb, Li, Pt e Cd em amostras de urina de crianças brasileiras em fase escolar (6-14 anos).
- Análise estatística dos resultados para verificar a distribuição dos elementos químicos, bem como as diferenças significativas entre os grupos.
- Elaboração de valores de referência para a população infantil brasileira.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População e amostragem

O presente estudo trata-se de uma extensão do programa “Pesquisa Nacional para Avaliação do Impacto da Iodação do Sal” (PNAISAL) financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia através do FINEP e pelo Ministério da Saúde através do DECIT.

O programa PNAISAL compreende um inquérito nacional, cuja primeira etapa do levantamento foi concluída com a coleta de mais de 14.000 amostras de urina de crianças estudantes de escolas públicas e privadas, de faixa etária entre 6 a 14 anos.

A área de abrangência das coletas abrangeu áreas urbanas e rurais de 19 unidades da federação, sendo elas: Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ), Sergipe (SE), Piauí (PI), Maranhão (MA), Ceará (CE), Bahia (BA), Alagoas (AL), Tocantins (TO), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Goiás (GO), Pará (PA) e Distrito Federal (DF), compreendendo assim as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte.

Serviços especializados foram contratados pelo Ministério da Saúde para a realização da amostragem e levantamento de informações detalhadas sobre os indivíduos elencados no programa. A coleta se deu em frascos coletores universais livres de metais e devidamente identificados, os quais foram posteriormente encaminhados para a FCFRP-USP - Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas – Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, designado para realizar a análise do teor de iodo na urina.

O volume unitário de urina das amostras foi suficiente para a realização das análises de determinação de iodo, não sendo utilizado todo o material coletado, havendo assim disponibilidade e suficiência para análises complementares.

Para a execução desse trabalho foi concedida pelo Ministério da Saúde uma autorização para realização de análises laboratoriais complementares utilizando as amostras de urina do programa PNAISAL (ANEXO 01).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCFRP-USP (ANEXO 02), o qual autorizou a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para uso das amostras devido à extrema dificuldade de localização de todos os sujeitos da pesquisa aliado ao fato de que uma nova coleta, a nível nacional, demandaria muito tempo e

altíssimo custo, além de não haver riscos previsíveis aos doadores, não havendo implicação alguma de prejuízo ou constrangimento sob aspectos éticos.

Junto ao mesmo comitê, foi reconhecido o Biorrepositório intitulado “DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS ESSENCIAIS E TÓXICOS EM AMOSTRAS DE URINA DE CRIANÇAS ESCOLARES (6 A 14 ANOS)”, para armazenamento dessas amostras de urina (ANEXO 03).

Para o desenvolvimento do estudo foram utilizadas assim as mesmas amostras obtidas pelo programa PNAISAL, sendo tomada uma amostragem de 6.965, escolhidas aleatoriamente e de forma a abranger cada uma das cinco regiões brasileiras.

Esse estudo visou à realização de análises para determinação de elementos químicos essenciais e não essenciais: Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb e a elaboração dos seus correspondentes VRs urinários.

3.2 Reagentes e instrumentação

Para eliminação de impurezas, foram utilizados água deionizada de alta pureza (resistividade $18,2\text{M } \Omega\text{cm}^{-1}$), obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore® RiOs-DITM, Bedford, MA, USA), e ácido nítrico (Synth 65% v/v) purificado por destilador *sub-boiling* de quartzo da Kürner (Analysentechnik).

Foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) o reagente Triton X-100®. Ródio (1000 mg L^{-1}) e soluções padrão de calibração multielementar (10 mg L^{-1}) foram obtidos da PerkinElmer (Shelton, CT, USA).

Os materiais utilizados no preparo das amostras e armazenamento de soluções foram descontaminados em banho de ácido nítrico 15 % v/v por 48 h, enxaguados com água Milli-Q por 5 vezes e secos em câmara de fluxo laminar (classe “100”).

Para as determinações dos elementos químicos, foi utilizado espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS - PerkinElmer, SCIEX, Norwalk, CT, USA). Este equipamento está ligado em um computador Dell Pentium 4 com o Software Elan®, Versão 3.4 e está instalado no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da FCFRP– USP. Todo o preparo de amostra e análise das amostras foram feitos em sala limpa classe “1000”.

3.3 Determinações dos elementos químicos por ajuste de matriz

As determinações dos elementos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb em urina foram realizadas pelo método de ajuste de matriz. As amostras foram diluídas 20 vezes em HNO_3 0,5% v/v sub-boiling e Triton X-100[®] 0,001% v/v e as curvas de calibração (0-20 $\mu\text{g L}^{-1}$) foram confeccionadas utilizando urina base (urina não exposta), com o mesmo diluente e soluções padrão para ICP-MS (PerkinElmer). Ródio foi utilizado como padrão interno em uma concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para as análises, foram preparadas duas soluções do branco: o branco da matriz contendo apenas o diluente, a urina diluída 1:20 v/v e os padrões internos; e o branco reagente contendo apenas o diluente e os padrões internos. Padrões e amostras, após diluição, foram injetados diretamente no ICP-MS, seguindo o método proposto por Batista et al., 2009 (Figura 1).

Para verificação da exatidão e precisão do método proposto, foram usados os materiais de referência certificados Human Urine ICP04U-04 – Center de Toxicologie/INSPQ e Human Urine ICP04U-07 – Center de Toxicologie/INSPQ.

Figura 1 - Determinação dos elementos químicos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb por método de ajuste de matriz e análise por ICP-MS

3.4 Dosagem de creatinina

A dosagem de creatinina nas amostras de urina analisadas foi realizada através de sistema colorimétrico por reação de ponto final, por meio de kit laboratorial da marca Labtest.

O kit é composto por quatro reagentes: ácido pícrico (44,4 mmol/L), tampão (hidróxido de sódio 208 mmol/L, tetraborato de sódio 12,7 mmol/L e surfactante), padrão (4,0 mg/dL) e acidificante (ácido acético 11,4 mmol/L). O princípio do teste é a creatinina da amostra que reage com a solução de picrato em meio alcalino formando um complexo colorido, o qual é medido fotometricamente. A adição do acidificante abaixa o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina.

A dosagem foi feita pelo procedimento de ensaio direto, onde a amostra de urina foi diluída 1:25 (0,2 ml de urina + 4,8 ml de água destilada). Foram então preparados os tubos contendo o branco, o padrão e as amostras, seguindo os volumes de reagentes especificados na bula do kit. Após o preparo, os tubos foram aquecidos a uma temperatura de 37 °C em banho-maria durante 10 minutos. Passado o tempo de aquecimento, as absorbâncias do padrão e das amostras foram determinadas em comprimento de onda 510 nm, por meio de espectrofotômetro λ 25 (PerkinElmer), acertando o zero com o branco e tendo assim a primeira leitura.

Após a primeira leitura foi adicionado à amostra e ao branco 0,1 ml do acidificante e passados 5 minutos, em temperatura ambiente, foi realizada a segunda leitura também a 510 nm. O resultado final da concentração de creatinina em mg/dL na amostra foi calculado a partir da diferença entre as duas leituras (Figura 2).

Amostras diluídas (1:25)

Figura 2 - Dosagem de creatinina pelo procedimento de ensaio direto por sistema colorimétrico por reação de ponto final

3.5 Análise Estatística

Os resultados das análises dos elementos determinados nas amostras de urina foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para avaliar as diferenças estatísticas entre as médias dos dados agrupados por sexo, foi aplicado o teste t. Para os grupos provenientes do agrupamento por região geográfica e por idade foi aplicado o teste ANOVA seguido do teste *Tukey*. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$. Para tal análise foi utilizado o programa “*Statistical Package for the Social Science®*” 20.0 for Windows (SPSS).

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Brasil ainda não há a realização de pesquisas envolvendo a determinação de elementos químicos em fluidos biológicos e a elaboração de valores de referência para a sua população infantil.

Batista e colaboradores (2009) determinaram pela primeira vez no Brasil intervalos de referência para os elementos traço Al, Ba, Be, Cd, Co, Cu, Cs, Mn, Ni, Pb, Pt, Sb, Se, Sn, Tl e U em urina, por técnica de simples diluição da amostra e análise direta por ICP-MS em um estudo que envolveu 412 voluntários sadios e não expostos, após recrutamento de 835 voluntários iniciais. Os voluntários selecionados tinham idade entre 15 e 60 anos e residiam nos estados de São Paulo ou Pará.

Neste estudo, os autores compararam diferenças existentes entre populações pertencentes a diferentes estados e regiões, avaliando a influência geográfica na concentração dos elementos na urina e estabelecendo intervalos de referência para a população adulta.

A determinação de VRs é complexa e deve respeitar alguns fatores determinantes, como por exemplo a faixa etária da população em questão. A não existência de VRs dificulta o processo de interpretação dos dados obtidos. Neste sentido, a prática mais comum na análise dos dados dos estudos brasileiros é a comparação dos resultados obtidos com os VRs estipulados para a população de outros países, principalmente dos EUA e da Alemanha. (KUNO, 2009).

No entanto, o uso de VRs sem o conhecimento literal de suas vertentes como as propriedades gerais do elemento em questão, o tipo de população exposta e as características da exposição, pode gerar uma estimativa equivocada do risco (LEVY et al., 2007).

A elaboração de VRs específicos a grupos de crianças é efetivamente importante visto que há grandes diferenças entre os subgrupos de uma população. Comportamentos, estilo de vida, dieta e, principalmente, as condições fisiológicas e de metabolismo se diferem (SCHULZ et al., 2009).

Crianças são consideradas um subgrupo da população mais suscetível, sendo mais vulneráveis aos efeitos tóxicos em razão de seus sistemas imune e nervoso ainda em desenvolvimento. Além disso, também são um subgrupo mais exposto por apresentarem maior ingestão de água, maior taxa respiratória e maior consumo calórico por unidade de peso corpóreo (JAROSINSKA; GEE, 2007).

O alto consumo de nutrientes pode levar a diferentes quadros de exposição, uma vez que os alimentos são a principal fonte de exposição da população geral para a maioria dos elementos químicos (OLMEDILLA; GRANADO, 2000).

Neste contexto, o presente estudo é inédito e envolveu a análise de 6.965 amostras de urina selecionadas aleatoriamente, provenientes do programa PNAISAL, de crianças estudantes das redes pública e privada, com idade entre 6 e 14 anos, residentes em áreas urbanas e rurais de 19 unidades da federação (UF) a saber: RS, SC, PR, SP, MG, ES, RJ, SE, PI, MA, CE, BA, AL, TO, MT, MS, GO, PA e DF, para a determinação das concentrações de elementos químicos essenciais e não essenciais, com a elaboração de valores de referência urinários para Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb. O número de amostras analisadas por região, UF e sexo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Número de amostras analisadas no presente estudo divididas por região, UF e sexo.

Região e UF	Masculino	Feminino	Total
Região Sul	579	544	1123
Paraná (PR)	207	203	410
Rio Grande do Sul (RS)	227	207	437
Santa Catarina (SC)	145	134	279
Região Sudeste	970	992	1962
Espírito Santo (ES)	233	241	474
Minas Gerais (MG)	335	325	660
Rio de Janeiro (RJ)	150	160	310
São Paulo (SP)	252	266	518
Região Centro-Oeste	674	757	1431
Distrito Federal (DF)	262	290	552
Mato Grosso (MT)	100	135	235
Mato Grosso do Sul (MS)	170	162	332
Goiás (GO)	142	170	312
Região Nordeste	846	984	1830
Alagoas (AL)	153	153	306
Bahia (BA)	75	99	174
Ceará (CE)	84	99	183
Maranhão (MA)	207	252	459
Piauí (PI)	196	225	421
Sergipe (SE)	131	156	287
Região Norte	286	333	619
Pará (PA)	69	94	163
Tocantins (TO)	217	239	456

O método de análise das amostras foi a simples diluição de urina com análise direta por ICP-MS (BATISTA et al., 2009). Foram determinadas as concentrações dos elementos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb e os valores obtidos foram corrigidos a partir dos valores de creatinina correspondentes e determinados por kit laboratorial.

Os resultados encontrados para a população analisada estão apresentados na Tabela 2, que descreve para cada elemento químico sua concentração média, mediana, a variação das concentrações médias e os percentis selecionados. Os valores foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de creatinina para corrigir os efeitos de possível diluição da urina, conforme explicado anteriormente, já que se trata de urina coletada pontualmente, apresentando assim volume e concentrações de elementos variáveis (CHEN et al., 1992).

Tabela 2. Concentrações dos elementos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) para a população infantil brasileira estudada

População						
Estudada	Cd	Co	Li	Mo	Pt	Sb
(n=6965)						
Média	0,267	0,769	7,949	66,839	0,022	2,389
Mediana	0,214	0,639	5,492	52,713	0,017	2,305
Desvio Padrão	0,226	0,596	8,906	56,885	0,058	1,413
Mínimo	<LOD*	<LOD*	<LOD*	<LOD*	<LOD*	<LOD*
Máximo	1,838	8,63	180,39	856,835	3,668	28,039
Percentis 5	0,019	0,053	0,592	6,908	0,0001	0,311
10	0,045	0,152	1,266	12,408	0,001	0,618
25	0,114	0,359	2,919	26,547	0,006	1,325
50	0,214	0,639	5,492	52,713	0,017	2,305
75	0,355	1,031	10,055	90,497	0,037	3,381
95	0,696	1,906	22,680	174,881	0,055	4,640

* menor que o limite de detecção

Conforme apresentado na Tabela 2, as concentrações médias obtidas para os elementos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb foram 0,267, 0,769, 7,949, 66,839, 0,022 e 2,389 $\mu\text{g/g}$ de creatinina, respectivamente. Quando estes dados são comparados aos obtidos para a população de adultos brasileiros estudada por Batista e colaboradores (2009) e também com os dados referentes à população infantil americana estabelecidos pelo CDC e descritos no

Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals (CDC, 2012) (Tabela 3), observa-se certas diferenças a saber.

Tabela 3. Comparação dos dados obtidos no presente estudo para a população de crianças brasileiras com valores obtidos por diferentes estudos

	<i>Dados obtidos</i>	<i>Adultos</i>	<i>População EUA</i>	<i>População EUA</i>
	<i>no presente</i>	<i>Brasileiros</i>	<i>(6 a 11 anos)</i>	<i>(12 a 19 anos)</i>
Elemento	<i>estudo</i>	<i>(n=412)</i>	<i>(n=378)</i>	<i>(n=451)</i>
Químico	<i>(6 a 14 anos)</i>	<i>(BATISTA et al.,</i>	<i>(CDC, 2012)</i>	<i>(CDC, 2012)</i>
	<i>(n=6965)</i>	<i>2009)</i>	<i>(µg/g de</i>	<i>(µg/g de</i>
	<i>(µg/g de</i>	<i>(µg L⁻¹)</i>	<i>creatinina)</i>	<i>creatinina)</i>
	<i>creatinina)</i>			
Cd	0,267	0,3	0,077	0,076
Co	0,769	0,2	0,578	0,435
Li	7,949	-	-	49,0
Mo	66,839	-	88,60	-
Pt	0,022	0,05	<LOD*	<LOD*
Sb	2,389	0,2	0,094	0,059

* menor que o limite de detecção

Uma comparação direta entre os dados permite observar que os valores encontrados para a população infantil brasileira foram em sua maioria maiores do que os encontrados para a população brasileira adulta, com exceção apenas do Cd (valores próximos) e da Pt, que apresentou um valor menor para a população infantil.

Já quando confrontados com os dados da população infantil americana, todos os analitos apresentaram discrepância, sendo que os valores para Cd, Co, Pt e Sb foram maiores para as crianças brasileiras, ao contrário do elemento Mo, que apresentou menor valor quando comparado à população infantil americana.

Esses resultados indicam que grupos específicos de uma mesma população diferem entre si em relação à exposição a elementos químicos, apresentando maiores ou menores concentrações no organismo e, dessa forma, estando mais ou menos passíveis de efeitos deletérios. Da mesma maneira, quando um mesmo subgrupo populacional de diferentes localidades é confrontado, como no caso das crianças brasileiras comparadas com as americanas, nota-se diferenças muitas vezes significativas entre os valores de concentrações,

denotando que estes subgrupos estão expostos de maneira desigual aos diversos elementos químicos.

Cada vez mais vem sendo comprovada a necessidade de estudos de biomonitoramento direcionados a grupos populacionais específicos, uma vez que eles diferem entre si em diversos aspectos. Adolescentes e crianças são reconhecidos como grupos populacionais de risco, assim como idosos, gestantes, neonatais, entre outros. O monitoramento biológico de crianças, no entanto, ainda é precário em todos os países (AGUILERA et al., 2010).

Em estudo populacional da Itália, Pino et al. (2012) demonstraram diferenças na exposição a certos elementos químicos entre grupos de adolescentes ao descreverem as concentrações encontradas no sangue de 450 jovens de 13 a 15 anos, comparando-as com adolescentes do Canadá, Estados Unidos e Alemanha.

Relatando os estudos de biomonitoramento da República Checa, Cerná et al. (2012) compararam os valores encontrados para alguns elementos tóxicos e essenciais com dados obtidos para a população alemã e americana. Os autores constataram que a população da República Checa está mais exposta que a alemã e aproximadamente no mesmo risco de exposição da americana.

Berman et al. (2012) compararam as concentrações obtidas em estudos de biomonitoramento da população de Israel com as de outros países como Espanha, Alemanha e Rússia, concluindo haver diferenças na exposição a estes elementos e enfatizando a necessidade de estabelecimento de VRs próprios para cada subgrupo da população israelita.

Fréry et al. (2011) descreveram os estudos realizados na França para grupos de adultos de 18 a 74 anos e crianças e adolescentes de 3 a 17, com a análise dos elementos As, Cd, Co, Cr, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, U e V. Os autores apontaram diferenças na exposição entre estas subpopulações francesas e ainda confrontaram os resultados com subgrupos de outros países, também verificando diferenças significativas nas concentrações de vários elementos.

A avaliação dos resultados deste estudo relacionando a variação de idade (6 a 14 anos) da população e as concentrações dos elementos, indicou haver diferença estatística significativa ($p < 0.05$) para o elemento Co entre as idades 6 e 9 anos e 9, 13 e 14 anos (FIGURA 3).

Ogabiela et al. (2011) correlacionaram as concentrações sanguíneas dos elementos químicos Ni, Mn, Cr e Co com diferentes faixas etárias de uma mesma população residente em Derata, Nigéria. A população estudada era constituída de 33 homens, os quais foram divididos em 4 grupos de acordo com sua idade – grupo A (1 a 10 anos), grupo B (11 a 20 anos), grupo C (21 a 30 anos) e grupo D (31 a 40 anos). Entre todos os elementos em questão,

os autores constataram uma diferença significativa entre os grupos apenas para as concentrações de Co. Os autores ainda observaram que o grupo A apresentou maiores concentrações de Co em comparação ao grupo B e relacionaram esse fato a maior ingestão de alimentos e água pelas crianças dessa idade.

Figura 3 - Concentração de Co ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) da população infantil brasileira por idade (6 a 14 anos). ANOVA seguido do teste *Tukey*. (*) estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$).

Os demais elementos Cd, Li, Mo, Pt e Sb, também foram analisados por teste ANOVA seguido do teste de *Tukey*. Estes não apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$), quando confrontados com a variação da idade. A concentração média $\pm$ desvio padrão de cada elemento por idade está representado na Figura 4.

Figura 4 - Concentrações dos elementos químicos Cd, Li, Mo, Pt e Sb (µg/g de creatinina) da população infantil brasileira por idade (6 a 14 anos). ANOVA seguido do teste *Tukey*.

Figura 4 (continuação) – Concentrações dos elementos químicos Cd, Li, Mo, Pt e Sb ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) da população infantil brasileira por idade (6 a 14 anos). ANOVA seguido do teste Tukey.

Muitas diferenças inter-regionais e geográficas podem causar variações expressivas nas concentrações encontradas nos solos, na água, nos alimentos e nos bens de consumo. Essas variações refletem de forma direta na exposição das populações locais.

É de extrema importância relatar que o Brasil é um país com ampla diversidade ambiental, diferenças geográficas e dividido em subpopulações com cultura, costumes e hábitos alimentares específicos. Torna-se importante assim verificar quais as influências resultantes de diferenças regionais e/ou geográficas nas concentrações dos elementos químicos (BATISTA et al., 2009).

Os gráficos de concentrações por estado federativo mostraram que o elemento Cd é encontrado em maiores concentrações na urina de crianças residentes na região Centro-Oeste e em menores concentrações em amostras providas da região Sul. Já para o elemento Co, maiores concentrações urinárias foram observadas em amostras providas das regiões Norte e Sul, com menores valores de concentração em urinas infantis providas da região Sudeste. As crianças do sul apresentaram maiores concentrações para o elemento Mo, enquanto as da região norte, as menores concentrações. As populações do Norte e do Nordeste apresentam as maiores concentrações urinárias do elemento Li, enquanto o Sudeste é a região com menores valores de concentrações urinárias para este elemento. As crianças nordestinas estão mais expostas ao Sb, e as residentes na região Norte são as menos expostas para este elemento químico. Já para as concentrações urinárias de Pt, o efeito inverso do Sb é observado, com crianças providas da região Norte apresentando maior valor de concentração para este elemento e as providas da região Nordeste menor valor. As concentrações médias $\pm$ desvio padrão dos elementos químicos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb encontradas para cada região brasileira estão ilustradas na Figura 5.

Figura 5 - Concentrações dos elementos químicos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) da população infantil brasileira por região. ANOVA seguido do teste *Tukey*.

Figura 5 (continuação) - Concentrações dos elementos químicos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) da população infantil brasileira por região. ANOVA seguido do teste Tukey.

Figura 5 (continuação) - Concentrações dos elementos químicos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) da população infantil brasileira por região. ANOVA seguido do teste *Tukey*.

Na literatura ainda há poucos registros a respeito da influência do sexo sobre a exposição a elementos químicos. Alguns estudos, no entanto, relatam haver diferenças entre homens e mulheres referentes à absorção, metabolismo, acúmulo no organismo e nas taxas de excreção de elementos, confirmando assim haver uma influência direta da idade nas concentrações de elementos (Fletcher et al., 1994; Harris et al., 1995; Arbuckle, 2006; Franconi et al., 2007).

Gandhi et al. (2004) relataram que a influência do sexo sobre as concentrações pode estar ligada a certos fatores, como por exemplo, o fato de mulheres apresentarem menor peso corpóreo médio, maior percentagem de gordura corporal e menor fluxo sanguíneo, influenciando na distribuição dos elementos.

No estudo da população infantil brasileira, apenas o elemento Sb apresentou maiores concentrações para o grupo feminino, enquanto Cd, Co, Li, Mo e Pt apresentaram concentrações mais elevadas nas crianças do sexo masculino. As concentrações médias $\pm$ desvio padrão por sexo para cada elemento químico determinado neste trabalho estão ilustradas na Figura 6.

Figura 6 - Concentrações dos elementos químicos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) da população infantil brasileira por sexo. Teste t.

Figura 6 (continuação) - Concentrações dos elementos químicos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) da população infantil brasileira por sexo. Teste t.

Considerando que a população em estudo é considerada não exposta, a principal explicação para as diferenças observadas pode estar baseada nos hábitos alimentares destas diferentes subpopulações, e investigações mais profundas dentro desta temática devem ser incentivadas a fim de melhor interpretação dos dados apresentados.

A determinação da concentração de elementos químicos nas amostras de urina selecionadas é de interesse direto a diferentes políticas de saúde, em especial as de alimentação e nutrição e de saúde ambiental, em um país onde há sérias deficiências de informação nesta área para crianças escolares (BATISTA et al., 2009).

5 CONCLUSÃO

Estudos de biomonitoramento são importantes fontes de dados para a avaliação da exposição de uma população, apresentando relevância política e epidemiológica, colaborando com a formação e reformulação de políticas de saúde, principalmente no âmbito da saúde ambiental, alimentação e nutrição.

No entanto, para uma análise concisa dos resultados, é necessária a comparação destes com valores de referência próprios da população em questão. No Brasil, no entanto, ainda não foram determinados esses valores para a sua população infantil.

Este estudo procurou assim, estabelecer valores de referência para alguns elementos químicos para a população infantil brasileira, abrangendo todas as regiões. Diante dos resultados apresentados, observa-se o cumprimento dos objetivos propostos, sendo que foi estabelecida as concentrações médias para os elementos químicos Cd, Co, Li, Mo, Pt e Sb para crianças brasileiras escolares de idade entre 6 e 14 anos.

Valores abaixo ou acima dos valores de referência propostos podem ocasionar quadros de intoxicações, além de problemas nutricionais graves, visto que a principal fonte de exposição a estes elementos se dá pela alimentação. Além disso, crianças estão mais expostas em comparação à população em geral, devido a um maior consumo calórico, entre outros fatores.

Dessa forma, o estudo possibilita melhor valia dos riscos à saúde da população infantil brasileira, contribuindo na manutenção da qualidade de vida e da saúde desses indivíduos, pois se espera que, a partir dos resultados encontrados, possam ser criadas novas diretrizes em saúde pública e estabelecidas medidas preventivas, contínuas e protetoras a fim de evitar a ocorrência de doenças de origem nutricional ou intoxicações por esses elementos.

Referências Bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AGUILERA, I; DAPONTE, A.; GIL, F.; HERNÁNDEZ, A. F.; GODOY, P.; PLA, A.; RAMOS, J. L. Urinary levels of arsenic and heavy metals in children and adolescents living in the industrialized area of Ria de Huelva (SW Spain). **Environment International**, v. 36, p. 563-569, 2010.

ALVES, A. T. L.; ROSA, H. V. Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 2, p. 54-62, 2003.

ANKE, M.; SEIFERT, M.; ARNHOLD, W.; ANKE, S.; SCHAFER, U. The biological and toxicological importance of molybdenum in the environment and in the nutrition of plants, animals and man. **Acta Alimentaria**, v. 39, p. 12-26, 2010.

APOSTOLI, P.; MINOIA, C.; HAMILTON, E. I. Significance and utility of reference values in occupational medicine. **The Science of the Total Environment**, v. 209, p. 69-77, 1997.

ARAL, H.; VECCHIO-SADUS, A. Toxicity of lithium to humans and the environment – A literature review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 349-356, 2008.

ARBUCKLE, T. E. Are there sex and gender differences in acute exposure to chemicals in the same setting? **Environmental Research**, v. 101, p. 195-204, 2006.

ARENDT, M. Communicating human biomonitoring results to ensure policy coherence with public health recommendations: analysing breast milk whilst protecting, promoting and supporting breastfeeding. **Environmental Health**, v. 7, (Suppl 1):S6, 2008.

BADER, M.; MESSERER, P.; WILL, W. Urinary creatinine concentrations in an industrial workforce and comparison with reference values of the general population. **Occupational Environmental Health**, v. 86, p. 673-680, 2013.

BARCELOUX, D. G. Cobalt. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, v.37, p. 201-206, 1999.

BARR, D. B.; WILDER, L. C.; CAUDILL, S. P.; GONZALES, A. J.; NEEDHAM, L. L.; PIRKLE, J. L. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, p. 192-200, 2005.

BATISTA, B. L.; RODRIGUES, J. L.; TORMEN, L.; CURTIUS, A. J.; BARBOSA JR, F. Reference concentrations for trace elements in urine for the Brazilian population based on q-ICP-MS with a simple dilute-and-shoot procedure. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1406-1413, 2009.

BERMAN, T.; AMITAI, Y.; ALMOG, S.; RICHTER, E. D. Human Biomonitoring in Israel: Past, Present, Future. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 215, p. 138-141, 2012.

BOCCA, B.; MADEDDU, R.; ASARA, Y.; TOLU P.; MARCHAL J.; FORTE, G. Assessment of reference ranges for blood Cu, Mn, Se and Zn in a selected Italian population. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 25, p. 19-26, 2011.

BOOGAARD, P. J.; HAYS, S.M.; AYLWARD, L. L. Human biomonitoring as a pragmatic tool to support health risk management of chemicals – examples under the EU REACH programme. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 59, p. 125–132, 2011.

BRYAN, C. E.; CHRISTOPHER, S. J.; BALMER, B. C. Establishing baseline levels of trace elements in blood and skin of bottlenose dolphins in Sarasota Bay, Florida: implications for non-invasive monitoring. **Science of the Total Environment**, v. 12, p. 325-388, 2007.

CASTANO, A.; SANCHES-RODRIGUEZ, J. E.; CANAS, A.; ESTEBAN, M.; NAVARRO, C.; RODRIGUEZ-GARCIA, A. C.; ARRIBAS, M.; DIAZ, G.; JIMENEZ-GUERRERO, J. A. Mercury, lead and cadmium levels in the urine of 170 Spanish adults: a pilot human biomonitoring study. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 215, p. 191-195, 2012.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm>. Acesso em: Out. 2012.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 2005. Disponível em: <www.cdc.gov/exposurereport>. Acesso em: Set. 2012.

CERNÁ, M.; KRSKOVÁ, A.; CEJCHANOVÁ, M.; SPEVACKOVÁ, V. Human biomonitoring in the Czech Republic: an overview. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 215, p. 109-119, 2012.

CHEN, X. B.; GRUBIC, G.; ORSKOV, E. R.; OSUJI, P. Effect of feeding frequency on diurnal variation in plasma and urinary purine derivatives in steers. **Animal Production**, v. 55, p. 185-191, 1992.

DIAMOND, G. L.; THAYER, W. C.; CHOUDHURY, H. Pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) modeling of risks of kidney toxicity from exposure to cadmium: estimates of dietary risks in the U.S. population. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 66, p. 2141-2164, 2003.

ELINDER, C. G.; FRIBERG L. Antimony. In: FRIBERG L., NORDBERG G.F., VOUK V.B. Handbook on the toxicology of metals. **Elsevier**, New York, 2a. ed., p. 26-42, 1986.

ESTABAN, M.; CASTAÑO, A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. **Environment International**, v. 35, p. 438-449, 2009.

FLETCHER, C. V.; ACOSTA, E. P.; STRYKOWSKI, J. M. Gender differences in human pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Journal of Adolescent Health**, v. 15, p. 619-629, 1994.

FRANCONI, F.; BRUNELLESCHI, S.; STEARDO, L.; CUOMO, V. Gender differences in drug responses. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 81-95, 2007.

FRERY, N.; VANDENTORREN, S.; ETCHEVERS, A.; FILLLOL, C. Highlights of recent studies and future plans for the French human biomonitoring (HBM) programme. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 215, p. 127-132, 2012.

GANDHI, M.; AWEEKKA, F.; GREENBLATT, R. M.; BLASCHKE, T. F. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 499-523, 2004.

GOYER, R. A.; KLAASSEN, C. D.; WAALKES, M. P. Metal Toxicology. **Academic Press**, San Diego, p. 305-338, 1995.

GRANDJEAN, E. M.; AUBRY, J. M. Lithium: updated human knowledge using an evidence-based approach: part III: clinical safety. **CNS Drugs**, v. 23, p. 397-418, 2009.

GRASBECK, R.; SARIS, M. E. Establishment and use of reference values. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 27, p. 1-79, 1989.

HAINES, D. A.; MURRAY, J. Human biomonitoring of environmental chemicals- early results of the 2007-2009 Canadian Health Measures Survey for males and females. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 215, p. 133-137, 2012.

HARRIS, R. Z.; BENET, L. Z.; SCHWARTZ, J. B. Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Drugs**, v. 50, p. 222-239, 1995.

HAYES, W. A. Principles and Methods of Toxicology. **Taylor & Francis**, Philadelphia, 4a edição, p. 654-682, 2001.

JAROSINSKA, D.; GEE, D. Children's environmental health and the precautionary principle. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, p. 541-546, 2007.

JOAS, R.; CASTELEYNB, L.; BIOTC, P.; KOLOSSA-GEFRING, M.; CASTONE, A.; ANGERER, J.; SCHOETERS, G.; SEPAI, O.; KNUDSENI, L.; JOAS, A.; HORVAT, M.; BLOEMEN, L. Harmonised human biomonitoring in Europe: activities towards an EU HBM framework. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 215, p. 172-175, 2012.

KISKER, C.; SCHINDELIN, H.; REES, D. C. Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 66, p. 233-267, 1997.

KLAASSEN, C. D. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. **McGraw-Hill**, USA, 6a. ed., p. 811-868, 2001.

KUNO, R. **Valores de referência para chumbo, cádmio e mercúrio em população adulta da Região Metropolitana de São Paulo**. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2009. 166p

LEVY, L. S.; JONES, K.; COCKER, J.; ASSEM, F. L.; CAPLETON, A. C. Background levels of key biomarkers of chemical exposure within the UK general population – Pilot study. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, p. 387-391, 2007.

MINNICH, M. G.; MILLER, D. C.; PARSONS, P. J. Determination of As, Cd, Pb, and Hg in urine using inductively coupled plasma mass spectrometry with the direct injection high efficiency nebulizer. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 63, p. 389-395, 2008.

MOORE, W.; HYSELL, D.; HALL, L.; CAMPBELL, K.; STARA, J. Preliminary studies on the toxicity and metabolism of palladium and platinum. **Environmental Health Perspective**, v. 10, p. 63-71, 1975.

NEEDHAM, L. L.; PATTERSON, D. G.; BARR, D. B.; GRAINGER, J.; CALAFAT, A. M. Uses of speciation techniques in biomonitoring for assessing human exposure to organic environmental chemicals. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 38, p. 397-404, 2005.

OGABIELA, E. E.; OKONKWO, E. M.; OKLO, D. A.; UBIDA, U. U.; HAMMUEL, C.; ADE-AJAYI, A. F.; MAHMUD, A. Status of trace metal levels of different age population of Dareta Village, Anka, Nigeria. **Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**, v. 1, p. 96-111, 2011.

OLMEDILLA, B.; GRANADO, F. Growth and micronutrient needs for adolescents. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 11-15, 2000.

PASCHAL, D. Biological monitoring of toxic elements. **Journal of Chemical Health and Safety**, p. 8-13, 2007.

PATRIARCA, M.; MENDITTO, A.; DI FELICE, G.; PETRUCCI, F.; CAROLI, S.; MERLI, M.; VALENTE, C. Recent developments in trace element analysis in the prevention, diagnosis and treatment of diseases. **Microchemical Journal**, v. 59, p. 194-202, 1998.

PAUSTENBACH, D.; GALBRAITH, D. Biomonitoring: is body burden relevant to public health? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 44, p. 249-261, 2006.

PINO, A.; AMATO, A.; ALEMONTI, A.; MATTEI, D.; BOCCA, B. Human biomonitoring for metals in Italian urban adolescents: data from Latium Region. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 215, p. 185-190, 2012.

ROELS, H. A.; HOET, P.; LISON, D. Usefulness of biomarkers of exposure to inorganic mercury, lead, or cadmium in controlling occupational and environmental risks of nephrotoxicity. **Renal Failure**, v. 21, p. 251-262, 1999.

SCHRAUZER, G. N. Functional roles of cobalt, in: BETHON, G. Handbook of Metalligand Interactions in Biological Fluids. **Marcel Dekker**, New York, p. 244-247, 1995.

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 German derived from the German Environmental Survey on Children 2003-2006 (GerES IV). **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 212, p. 637-647, 2009.

ZEINER, M.; OVARI, M.; ZARAY, G.; STEFFAN, I. Selected urinary metal reference concentrations of the Viennese population – urinary metal reference values. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 20, p. 240-244, 2006.

WHO (World Health Organization), Leishmaniasis: disease information, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.html>>. Acesso em: Set. 2012.

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. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 209, p. 301-305, 2006.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

ANEXO 1 - Autorização do Ministério da Saúde para a realização de análises complementares com as amostras de urina da PNAISAL.

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA
COORDENAÇÃO-GERAL DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO
 SAF Sul Quadra 2 Lote 5/6 Bloco II – Sala 8 - Auditório (Subsolo) - Edifício Premium
 70.070 - 600 - Brasília-DF - e-mail: cgan@saude.gov.br

SIPAR - MINISTÉRIO DA SAÚDE
 Registro Número:
 25000.039810/2012-29
 DATA: 14 1 03 2012

Ofício nº 40/2012-CGAN/DAB/SAS/MS

Brasília, 14 de Março de 2012.

Ao Senhor

FERNANDO BARBOSA JUNIOR

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo
 Avenida do Café s/n Monte Alegre
 14040903 Ribeirão Preto/SP

Assunto: **Autorização para a realização de análises laboratoriais complementares com as amostras de urina da Pesquisa Nacional de Iodação do Sal (Pnaisal).**

Prezado Senhor,

O Ministério da Saúde é responsável pela realização da Pesquisa Nacional de Iodação do Sal – Pnaisal, cujo objetivo maior é subsidiar a política de prevenção dos distúrbios por deficiência de iodo por meio da fortificação obrigatória do sal com iodo, por meio da avaliação da ingestão do consumo de iodo pela população. A Pesquisa também responde a compromissos internacionais assumidos em relação ao controle e monitoramento dessas carências e contribui para a atual discussão da revisão da faixa de iodação do sal no país.

A primeira etapa do levantamento de campo da Pnaisal, foi concluída em 19 Unidades da Federação, tendo sido coletadas mais de 14 mil amostras de urina de estudantes de escolas públicas e privadas, que já foram analisadas quanto ao teor de iodo (iodúria), conforme previsto no projeto da pesquisa. Constatou-se ainda que o volume unitário das amostras de urina foi suficiente para completar as análises laboratoriais previstas, sem a necessidade de utilizar todo o material coletado.

Nesse sentido, tendo em vista a disponibilidade e suficiência de material das amostras para a realização de análises complementares de outros elementos químicos essenciais e tóxicos pelo Laboratório de Química da Universidade de São Paulo sem custos adicionais para ao Ministério da Saúde, cujos resultados interessam diretamente a diferentes políticas de saúde, particularmente as de alimentação e nutrição e de saúde ambiental, manifestamos oficialmente o interesse do Ministério da Saúde na realização dessas análises e a autorização para a utilização das amostras para este fim.

Colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos adicionais que se façam necessários.

Atenciosamente,

EDUARDO AUGUSTO F. NILSON
 Coordenador-Geral Substituto de Alimentação e Nutrição

ANEXO 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 027/2013
kms

Ribeirão Preto, 13 de junho de 2013.

Ao Pós-graduando
Renan Martins Varrique
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior
FCFRP/USP

Prezados Pesquisadores,

Aprovado, *ad referendum* do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP na presente data, o projeto de pesquisa intitulado "**ELABORAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA URINÁRIOS PARA ELEMENTOS QUÍMICOS ESSENCIAIS E NÃO ESSENCIAIS EM CRIANÇAS BRASILEIRAS**", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 299**.

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,

PROF.ª DR.ª MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO 3 – Aprovação do Reconhecimento do Biorrepositório

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 020/2013
kms

Ribeirão Preto, 28 de maio de 2013.

Ao
Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior
Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP/USP

Prezado Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou em sua 116ª Sessão Extraordinária realizada em 23 de maio de 2013, o reconhecimento do Biorrepositório intitulado “DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS ESSENCIAIS E TÓXICOS EM AMOSTRAS DE URINA DE CRIANÇAS ESCOLARES (6 A 14 ANOS)”, sob sua responsabilidade.

De acordo com a Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011, o prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa, e pode ser autorizado por até dez anos. Lembramos que ainda, que, de acordo com a Resolução 441, toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado deverá ser submetida para aprovação deste CEP e que a legislação brasileira veda o patenteamento e a utilização comercial de material biológico humano armazenado em Biorrepositórios.

Atenciosamente,

PROF.ª, DR.ª. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP