

# Conceitos e derivação de valores de referência para biomonitorização humana de contaminantes ambientais

Rubia Kuno,<sup>1</sup>  
Maria Helena Roquetti<sup>1</sup>  
e Nelson Gouveia<sup>2</sup>

**Como citar:** 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.

**Palavras-chave:** poluição ambiental; exposição ambiental; xenobióticos; valores de referência.

A exposição humana a substâncias químicas presentes no ambiente externo ou no ambiente de trabalho vem sendo tradicionalmente estimada pela mensuração periódica dos contaminantes em amostras ambientais de ar, água e solo, denominada monitorização ambiental. Essa avaliação, se combinada com a medida da substância química ou de seu metabólito na população exposta (biomonitorização humana), fornece uma relação direta entre exposição e possíveis efeitos à saúde. Essa medida direta é obtida por meio de “marcadores biológicos” ou “biomarcadores”, ou ainda através de “indicadores biológicos”, que refletem as alterações moleculares ou celulares que ocorrem em um sistema ou na amostra biológica de um organismo. Os biomarcadores de exposição e de efeito são os mais utilizados.

Existem diferentes biomarcadores de exposição, entre eles a concentração de compostos correlatos ou de seus metabólitos em fluidos biológicos como sangue, soro, urina, cabelo e dentina, adutos de DNA (formados pela ligação de contaminantes ambientais ao DNA), hemoglobina ou albumina, e outros que fornecem estimativas indiretas da concentração em tecidos e órgãos críticos de depósito, como o córtex renal e os ossos. Os mecanismos associados aos efeitos tóxicos devem orientar a escolha do indicador biológico de exposição. Um bom indicador ou biomarcador deve estar correlacionado com apenas uma substância química. Entretanto, deve também ser útil como variável independente para avaliar relações dose-efeito e dose-resposta (1). Sua análise deve ser, de preferência, realizada em matrizes biológicas de fácil obtenção, como urina, sangue, cabelo ou saliva. Vários indicadores biológicos de exposição já foram definidos e vêm sendo utilizados na biomonitorização ambiental.

A biomonitorização humana (BH) complementa a monitorização ambiental, sendo utilizada em saúde ocupacional e ambiental para verificar a adequação com os padrões legais definidos para cada substância (2, 3). Se, de um lado, a monitorização ambiental é necessária para identificar as fontes de exposição e facilitar as medidas para minimizar emissões, de outro a BH é indispensável para mostrar quanto o ser humano absorveu das substâncias químicas no ambiente. A BH é a forma mais direta de identificar e quantificar exposição e risco, entender os mecanismos tóxicos e definir medidas para reduzir a exposição. Sem dados de BH, a avaliação e o gerenciamento de riscos podem conduzir a estimativas incorretas e a adoção de medidas inadequadas de prevenção (4).

Na área ambiental, a BH pode identificar exposição a novas substâncias químicas, assim como tendências e alterações na exposição. Pode também estabelecer a distribuição da exposição na população

<sup>1</sup> Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental. Enviar correspondência para Rubia Kuno no seguinte endereço: Avenida Prof. Frederico Hermann Jr. 345, CEP 05459-900, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: rubiak@cetesbnet.sp.gov.br, rkuno@terra.com.br

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Medicina Preventiva, São Paulo (SP), Brasil.

geral, identificar grupos e populações vulneráveis com exposição mais elevada e riscos ambientais em áreas contaminadas com custo relativamente baixo. A grande vantagem da BH é que ela considera todas as vias de exposição — oral, dérmica e inalatória — e todas as fontes que são relevantes para a absorção humana. Um exemplo prático do uso da BH foi a redução do teor de chumbo na gasolina. Em 1977, a Comunidade Européia tomou a iniciativa de utilizar a BH para avaliar a população não exposta ocupacionalmente ao chumbo. Os dados da BH indicaram que o chumbo da gasolina era um importante determinante dos níveis de chumbo no sangue na população. A partir daí, vários países tomaram medidas eficazes para reduzir a quantidade de chumbo na gasolina (4, 5).

Os países que utilizam a BH não somente monitoram a exposição da população geral aos poluentes ambientais, mas também avaliam o seu estado de saúde. Assim, os estudos de BH têm crescido de tal forma que, nos últimos anos, vêm sendo utilizados para estabelecer e revisar limites de exposição ocupacional e para fornecer dados sobre exposição nos processos de avaliação de risco (6).

Acompanhando a tendência mundial, no Brasil a BH também está se configurando como instrumento para tomada de decisões na área da saúde. Em 2006, iniciou-se o projeto piloto do I Inquérito Nacional de Populações Expostas a Substâncias Químicas, conduzido pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde, por meio da Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental (CGVAM). O projeto tem como objetivo avaliar a exposição humana a substâncias químicas de interesse para a saúde pública e identificar as populações em risco. Desse modo, poderão ser subsidiadas ações de vigilância cada vez mais efetivas.

Em decorrência do uso cada vez maior da BH, é preciso definir valores de referência (VR) para os principais contaminantes de importância para o Brasil. A escolha dos contaminantes a serem avaliados deve ser feita com base não somente na toxicidade e ocorrência desses contaminantes em determinada região, mas também na disponibilidade de biomarcadores para esses contaminantes e na exequibilidade analítica. Assim, o objetivo do presente artigo é discutir os conceitos e a metodologia utilizada para derivar VR, com foco nos VR para biomarcadores de contaminantes químicos ambientais.

## UTILIZAÇÃO DO VALOR DE REFERÊNCIA

A presença de uma substância química ou de seu metabólito em amostras biológicas mostra que houve exposição, ou seja, ocorreu a absorção dessa substância pelo corpo a partir do ambiente; porém, não significa necessariamente que há risco de efeitos adversos para o organismo. Para uma avaliação real do risco para a saúde humana é necessário estabelecer as doses internas máximas admissíveis ou toleráveis. Esses limites são fundamentados nas relações dose-resposta, em estudos epidemiológicos e em outros fa-

tores, como coexposição, hábitos culturais e variáveis demográficas (1, 7).

Enquanto os resultados de BH em trabalhadores devem ser comparados com os limites biológicos de exposição (limites toleráveis), os resultados obtidos para a população geral podem ser comparados tanto com os limites toleráveis como com os VR. Normalmente, os limites de exposição estabelecidos para os trabalhadores são superiores aos estabelecidos para a população geral. Isso é devido, entre outros fatores, ao tempo de exposição que, no ambiente ocupacional, é restrito a 8 horas diárias, durante 5 ou 6 dias na semana; já no ambiente externo, a população pode ficar exposta 24 horas por dia ao agente tóxico. Outra diferença da exposição ocupacional e ambiental é que na população geral encontram-se grupos suscetíveis, como crianças, idosos, gestantes e doentes (7). Os valores toleráveis devem ser vistos como níveis de advertência, propostos com base no conhecimento da relação dose-resposta, e não como valores que separam exposições seguras de exposições de risco (8). Já os VR são obtidos a partir de estudos que determinam a concentração da substância de interesse em fluidos (ou outros materiais biológicos) em um grupo definido da população geral, sendo derivados por métodos estatísticos. Os VR determinam o limite superior da exposição basal da população geral em um determinado momento. O VR não representa, portanto, um critério de normalidade para uma análise toxicológica; deve ser usado, isso sim, para identificar indivíduos com nível aumentado (em relação à exposição basal) de exposição ambiental a determinada substância (9, 10).

Alguns países vêm derivando os valores ou intervalos de referência a partir de estudos que envolvem um grande número de indivíduos. Nos Estados Unidos, o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), um inquérito nacional que coleta dados sobre o estado nutricional e de saúde de adultos e crianças, inclui análises de contaminantes ambientais. Iniciado em 1999, o NHANES é um estudo populacional contínuo: a população americana é amostrada anualmente, e os dados são publicados a cada 2 anos. A amostra é representativa da população civil não institucionalizada dos Estados Unidos (11).

Na Alemanha, o *German Environmental Survey* (GerES), um estudo populacional realizado desde a década de 1980, tem por principal objetivo analisar e documentar a extensão, a distribuição e os determinantes da exposição aos poluentes ambientais por parte da população geral alemã. Os três principais instrumentos de pesquisa do GerES são a BH, o monitoramento do ambiente doméstico e a coleta de informações por meio de questionário sobre as vias de exposição e as condições de vida da população (12).

Na República Tcheca, um sistema nacional coleta, processa e avalia os dados sobre poluição ambiental e seus efeitos na saúde da população de 30 cidades, inclusive a capital Praga. É composto por subsistemas (projetos), conduzidos desde 1994. Em 2007, o sistema englobou oito projetos relacionados à avaliação de riscos e efeitos à saúde decorrentes da po-

luição do ar, poluição da água de consumo, ruído, dieta, ambiente ocupacional e poluição do solo urbano, além de BH e indicadores de saúde (13).

Além dos países já citados, Eslovênia e Itália também realizam estudos populacionais visando a determinar VR. No Brasil, Paoliello et al. (14) estabeleceram VR para chumbo em uma população não exposta ocupacionalmente da Cidade de Londrina.

Com a avaliação sistemática das séries históricas obtidas nesses estudos, é possível identificar tendências temporais ou sazonais que podem subsidiar as recomendações e as propostas de medidas a serem adotadas nas áreas de saúde pública e ambiente. Entretanto, mesmo com o aumento do uso da BH em saúde ambiental no mundo, percebe-se ainda a falta de informações acerca dos efeitos sobre a saúde dos diferentes contaminantes ambientais, assim como a necessidade de uma interpretação mais consistente dos dados de biomonitorização.

No Brasil, ainda é incipiente o uso de BH na saúde ambiental. Entretanto, nos raros estudos que utilizam essa ferramenta para avaliar a qualidade ambiental ou estimar a exposição em estudos de avaliação de risco, faltam informações sobre VR e valores limites adequados para a população brasileira. No caso de áreas contaminadas, por exemplo, os dados obtidos nos estudos brasileiros são comparados com VR de outros países, normalmente Estados Unidos e Alemanha. Essas comparações devem ser feitas com cautela, pois os VR se referem especificamente às características da população para a qual foram derivados e ao ambiente físico onde se encontra a população estudada, já que as substâncias de interesse podem ser de origem tanto antrópica como natural.

## CONCEITUAÇÃO DE VALOR DE REFERÊNCIA

O emprego do termo “valores de referência” sempre esteve relacionado à interpretação de resultados de exames de análises clínicas. Em geral, os médicos utilizam os termos “valor normal” ou “limite de normalidade” para definir parâmetros biológicos como glicemia e colesterolemia, naturalmente presentes no organismo de pessoas saudáveis, enquanto que os toxicologistas preferem “níveis *background*” ou “níveis basais” para a presença de contaminantes ambientais. Portanto, dependendo do contexto, o termo “valores normais” pode significar o valor associado à ausência de doença (não-patológico, sadio) ou ao valor encontrado na população em geral (1, 15).

Os ditos “valores normais”, usados na clínica, foram derivados de indivíduos que raramente passaram por exames minuciosos que atestassem ausência de doença. Nesse caso, normal significa subjetivamente saudável. Entretanto, o que é considerado como uma doença em um contexto pode ser considerado como saúde aceitável em outro, como no caso, por exemplo, da falta de um rim. Normal também significa usual, frequente, habitual. A maioria dos valores normais preconizados em química clínica foi obtida de jovens estudantes de medicina e técnicos de laboratório,

sem qualquer informação sobre a população estudada nem tampouco sobre os motivos que levaram à sua escolha (16).

O termo VR também é frequentemente empregado de forma inapropriada, em particular quando seu significado é confundido com o termo “valores limites”. Na verdade, os valores limites servem para identificar os níveis de exposição abaixo dos quais não ocorre dano à saúde nos indivíduos expostos e em sua descendência. O processo para estabelecer os valores limites difere daquele usado para estabelecer VR e ocorre em duas fases. A primeira fase envolve pesquisas que fornecem dados para recomendar os limites de exposição com base em efeitos na saúde oriundos de estudos de dose-resposta e relação dose-efeito. A segunda fase envolve a transformação desses níveis em padrões, que são associados a outros fatores, como econômico e social (17). Gräsbeck introduziu o conceito de VR como alternativa ao termo valor normal. A idéia fundamental é que os VR são derivados a partir de observações de indivíduos que, por suas características, possam ser controles para os pacientes estudados (16).

Deve-se reforçar que os VR não são derivados a partir de dados de saúde ou toxicológicos, como são os limites biológicos de exposição, e, portanto, não representam valores orientadores baseados em efeitos na saúde. Assim, se a concentração de um contaminante no sangue ou urina excede o VR, isso não significa, necessariamente, que há um aumento do risco à saúde. Por outro lado, não se exclui um risco à saúde somente porque a concentração medida de um poluente está abaixo do VR (10). Além disso, os VR devem ser revisados sempre que houver alterações nos níveis basais da população geral, ou seja, eles deverão ser revistos periodicamente, sempre com base em resultados de estudos recentes (9, 12).

## METODOLOGIA DE DERIVAÇÃO DO VALOR DE REFERÊNCIA

### Escolha da população de referência

Os cuidados na escolha da população de referência para derivar VR para biomarcadores de exposição de contaminantes ambientais devem ser os mesmos recomendados para a química clínica. Normalmente, a formação dos grupos de referência é baseada em critérios de exclusão/inclusão e de estratificação. Enquanto na química clínica o principal fator de exclusão é o estado alterado de saúde, na toxicologia ambiental o principal fator de exclusão é a exposição anormal aos xenobióticos (18).

A utilização de grupos saudáveis como referência deve ser avaliada com cautela, pois o conceito de saúde varia conforme o país, a época e a idade do indivíduo. O critério de saúde na seleção da população de referência deve ser orientado conforme o objetivo da pesquisa; portanto, nem sempre os indivíduos de referência são pessoas saudáveis (19).

Muitos fatores contribuem para a variabilidade biológica e devem fazer parte dos critérios de exclusão

e estratificação dos indivíduos de referência (19). Para a seleção da população é importante diversificar as características, coletando amostras de diferentes grupos, com idades, sexo, hábitos de vida e atividades profissionais distintas. O propósito de utilização dos valores de referência também contribui para determinar os critérios de exclusão que serão aplicados (15).

Assim, dependendo da intenção do uso dos VR e do tipo quantitativo da medida, alguns ou todos os seguintes critérios de exclusão devem ser aplicados: estados fisiopatológicos, utilização de agentes farmacologicamente ativos, estados fisiológicos alterados (gravidez, exercício físico, distúrbios mentais e psicológicos, ingestão de alimentos antes da coleta da amostra de sangue), exposições ao xenobiótico em estudo (ocupacional, atividade de lazer) e outros (obesidade, hipertensão). No entanto, em alguns casos, esses critérios são usados na estratificação ou classificação para obter VR em grupos amostrais bem identificados, como consumidores de bebida alcoólica, fumantes, mulheres que usam contraceptivos, mulheres grávidas, indivíduos obesos, etc. Ainda, a estratificação por origem étnica, área geográfica ou cor da pele pode ser útil em algumas medidas; em outras, os marcadores genéticos como grupo sanguíneo e抗ígenos de compatibilidade histológica podem ser mais apropriados (19).

A correta determinação dos VR é complexa e exige um delineamento bem conduzido, desde a fase de seleção da população, preparo de questionário validado e coleta das amostras biológicas obedecendo a critérios de ética, seguindo os preceitos da Declaração de Helsinki, além de aprovação dos comitês de ética pertinentes. A determinação do VR exige o uso de métodos analíticos validados, exatos e com limites de quantificação adequados para a detecção de concentrações baixas da substância no material biológico (15).

Em resumo, a produção de VR a partir de qualquer população ou indivíduo requer seleção apropriada e, geralmente, estratificação, que deve ser feita por meio de descrição cuidadosa das características dos indivíduos de referência e pela aplicação de critérios claramente estabelecidos (19).

### Cálculo e apresentação do valor de referência

O cálculo do VR é feito a partir de uma amostra oriunda da população de referência. Essa exclui os indivíduos expostos ao xenobiótico devido a situações de contaminação ambiental ou laboral. Devem ser definidos diferentes VR para subgrupos da população, que podem apresentar diferentes níveis de exposição, absorção, metabolização e excreção dos agentes tóxicos, como no caso de homens e mulheres, crianças, adolescentes e fumantes.

O cálculo do tamanho da amostra varia entre os estudos de derivação de VR. A Federação International de Química Clínica (*International Federation of Clinical Chemistry*, IFCC) recomenda que o número de observações para cada subclasse seja de pelo menos 120 (20). Vários autores concordam que a população de referência não pode ser determinada quantitativamente,

uma vez que o número total de indivíduos de referência ou não expostos é desconhecido. Dessa forma, a população de referência seria definida como uma entidade hipotética, e seu cálculo na prática pretende apenas garantir um número grande suficiente para tornar a amostra representativa (3, 21). Cabe destacar que o grupo amostral pode ser oriundo de um subgrupo da população de referência e até mesmo ser formado por apenas um membro, por exemplo, um indivíduo pode ser referência de si mesmo ou de outro indivíduo (21).

A avaliação estatística dos resultados das análises dos biomarcadores é fundamental para a obtenção de VR adequados e representativos de determinado grupo populacional (15). Os valores determinados no grupo de referência são comumente, por conveniência, condensados em um intervalo definido por dois limites de referência. Os procedimentos utilizados para derivar esses intervalos incluem desde técnicas estatísticas complexas até a simples estimativa intuitiva dos dados disponíveis (20). As determinações das concentrações de substâncias tóxicas em fluidos ou tecidos da população geral apresentam como valores de referência a média mais ou menos 2 desvios-padrão para distribuição normal, ou o valor dos percentis 90 ou 95 para qualquer tipo de distribuição, sendo o intervalo de confiança de 95% desses valores equivalente ao intervalo de referência (9, 22–25).

Os intervalos de referência definidos pelos percentis são os mais usados e podem ser facilmente estimados tanto por métodos estatísticos paramétricos como não-paramétricos. A IFCC estabelece como intervalos de referência os valores entre os percentis 2,5 e 97,5 e seus respectivos limites de confiança não-paramétricos de 90%. Esses limites cortam a fração 0,025 dos valores que se encontra em cada extremidade da distribuição, isto é, o intervalo de referência deve conter a fração 0,95 central (ou 95%) da distribuição. Em alguns casos, outros tamanhos, ou uma posição assimétrica do intervalo de referência, podem ser mais apropriados (20).

Em 1997, a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) recomendou a utilização do intervalo de cobertura que, para um dado nível de confiança, fornece informação direta sobre a probabilidade dos valores observados. Esse intervalo também abrange 95% da distribuição, porém com probabilidade de pelo menos 95 ou 90% (quando existem poucos dados) e intervalo entre  $(0,95 - \alpha)$  e  $(0,95 + \alpha)$  da distribuição. A vantagem dessa metodologia sobre a da IFCC é a possibilidade de se calcular o intervalo, com estimativa de incerteza, mesmo quando existem menos de 120 observações (25).

Os VR são apresentados de maneiras diferentes, de acordo com a finalidade de seu uso e o país ou entidade que os gerou. Assim, são geralmente expressos em valores médios, intervalo de confiança de 95 ou 99% e valor superior de referência (média + 2 desvios-padrão), com maior valor prático para médicos e higienistas, quando se quer comparar resultados individuais com a distribuição Gaussiana. Para distribuição não normal recomenda-se o uso de mediana, média

geométrica e percentil 95 ou 99%. Esses valores são usados para comparação individual de resultados obtidos na BH (15).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No âmbito ocupacional, a BH há tempos é considerada um instrumento importante e essencial para avaliar riscos à saúde. Mais recentemente, demonstrou-se que a BH pode ser utilizada em saúde ambiental, fornecendo consistente subsídio para decisões em saúde. A saúde ambiental, como parte da saúde pública que visa a proteção contra os efeitos dos perigos ambientais que podem afetar adversamente a saúde ou o equilíbrio essencial para a saúde humana e a qualidade ambiental, traz, em sua essência, o caráter preventivo. Nesse contexto, é fundamental conhecer os níveis basais de exposição da população geral, os chamados valores ou intervalos de referência (6). Grupos populacionais de risco podem ser identificados quando os valores do biomarcador de exposição ou efeito desses grupos apresentam desvios em relação à média da população (2).

Em razão das especificidades de cada população e exposição, existe a necessidade urgente de se definir valores limites e VR adequados para o Brasil. A utilização de valores que não levam em conta o entendimento amplo sobre os mecanismos de ação do agente tóxico (modelo toxicocinético/dinâmico) sobre o tipo de população exposta e sobre as condições de exposição específicas pode conduzir a conclusões equivocadas na estimativa do risco da exposição aos contaminantes.

Finalmente, a falta de padronização dos termos utilizados no âmbito da saúde ocupacional e ambiental dificulta muito a gestão integrada dos riscos nesses dois ambientes. Fica claro também que os valores limi-

tes, bem como os VR, tanto para os trabalhadores como para a população geral, devem ser definidos de forma conjunta para garantir a efetiva proteção da saúde da população de um país.

## SYNOPSIS

### Concepts and determination of reference values for human biomonitoring of environmental contaminants

*Human biomonitoring (HBM) of environmental contaminants plays an important role in estimating exposure and evaluating risk, and thus it has been increasingly applied in the environmental field. The results of HBM must be compared with reference values (RV). The term "reference values" has always been related to the interpretation of clinical laboratory tests. For physicians, RV indicate "normal values" or "limits of normal"; in turn, toxicologists prefer the terms "background values" or "baseline values" to refer to the presence of contaminants in biological fluids. This discrepancy leads to the discussion concerning which should be the population selected to determine RV. Whereas clinical chemistry employs an altered health state as the main exclusion criterion to select a reference population (that is, a "healthy" population would be selected), in environmental toxicology the exclusion criterion is the abnormal exposure to xenobiotics. Therefore, the choice of population to determine RV is based on the very purpose of the RV to be determined. The present paper discusses the concepts and methodology used to determine RV for biomarkers of chemical environmental contaminants.*

**Key words:** environmental pollution; environmental exposure; xenobiotics; reference values.

## REFERÊNCIAS

- Mutti A. Biological monitoring in occupational and environmental toxicology. *Toxicol Lett.* 1999;108(2-3):77-89.
- World Health Organization. Biomarkers and risk assessment; concepts and principles. Geneva: WHO. 1993. (Environmental Health Criteria 155).
- Apostoli P. Application of reference values in occupational health. *Int Arch Occup Environ Health.* 1999;72(4):191-4.
- Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health.* 2007;210(3-4):201-28.
- Rudnai P. Blood lead levels in children, 2007. Copenhagen: World Health Organization; 2007. (Fact sheet no. 4.5). Disponível em: [www.euro.who.int/Document/EHI/ENHIS\\_Factsheet\\_4\\_5.pdf](http://www.euro.who.int/Document/EHI/ENHIS_Factsheet_4_5.pdf). Acessado em 16 de dezembro de 2008.
- Levy LS, Jones K, Cocker J, Assem FL, Capleton AC. Background levels of key biomarkers of chemical exposure within the UK general population—pilot study. *Int J Hyg Environ Health.* 2007;210(3-4):387-91.
- Kuno R, Roquette MH, Umbuzeiro GA. Indicadores biológicos de exposição: ocupacional x ambiental. *Interfacehs.* 2009;4(1):1-13.
- Della Rosa VH, Siqueira MEPB, Colacioppo S. Monitoramento ambiental e biológico. Em: Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO, eds. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu; 2008. Pp. 241-60.
- Ewers U, Krause C, Schulz C, Wilhelm M. Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. Report on the work and recommendations of the Commission on Human Biological Monitoring of the German Federal Environmental Agency. *Int Arch Occup Environ Health.* 1999;72(4):255-60.
- Schulz C, Angerer J, Ewers U, Kolossa-Gehring M. The German Human Biomonitoring Commission. *Int J Hyg Environ Health.* 2007;210(3-4):373-82.
- Centers for Disease Control and Prevention. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta: CDC; 2005. Disponível em: [www.cdc.gov/exposurereport/report.htm](http://www.cdc.gov/exposurereport/report.htm). Acessado em 25 de novembro de 2008.
- Schulz C, Conrad A, Becker K, Kolossa-Gehring M, Seiwert M, Seifert B. Twenty years of the German Environmental Survey (GerES): human biomonitoring—temporal and spatial (West Germany/East Germany) differences in population exposure. *Int J Hyg Environ Health.* 2007;210(3-4):271-97.
- National Institute of Public Health. Environmental Health Monitoring System in the Czech Republic. Summary Report, 2007. Disponível em: [www.szu.cz/](http://www.szu.cz/)

- topics/environmental-health/environ mental-health-monitoring. Acessado em 8 de dezembro de 2008.
14. Paoliello MMB, Gutierrez PR, Turini CA, Matsuo T, Mezzaroba L, Barbosa DS, et al. Valores de referência para plumbemia em uma população urbana do Sul do Brasil. *Rev Panam Salud Publica*. 2001; 9(5):315–9.
  15. Oliveira DP, Siqueira MEPB. Valores de referência de bioindicadores: uma visão geral. *Rev Bras Toxicol*. 2003;16(1):49–53.
  16. Gräsbeck R. Reference values, why and how. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1990;201:45–53.
  17. Apostoli P, Alessio L. Identification of reference value for metals in the general population. *Rev Bras Toxicol*. 1991;4(1/2): 7–10.
  18. Apostoli P. Criteria for the definition of reference values for toxic metals. *Sci Total Environ*. 1992;120(1–2):23–37.
  19. PetitClerc C, Solberg HE. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. Determination of reference values. *Clin Chim Acta*. 1987;170:S3–12.
  20. 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*. 1987;170: S13–32.
  21. Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry. Scientific committee, Clinical Section. Expert Panel on Theory of Reference Values and International Committee for Standardization in Haematology Standing Committee on Reference Values. Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *Clin Chim Acta*. 1987;165(1): 111–8.
  22. Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P, Pietra R, Pozzoli L, Gallorini M, et al. 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.
  23. Kucera J, Bencko V, Sabbioni E, Van der Venne MT. Review of trace elements in blood, serum and urine for the Czech and Slovak population and critical evaluation of their possible use as reference values. *Sci Total Environ*. 1995;166:211–34.
  24. Umwelt Bundes Amt German. Health and environmental hygiene. Reference and HBM values (definitions and tables). Disponível em: [www.umweltbundesamt.de/gesundheit-e/monitor/definitionen.htm](http://www.umweltbundesamt.de/gesundheit-e/monitor/definitionen.htm). Acessado em dezembro de 2008.
  25. Poulsen OM, Holst E, Christensen JM. Calculation and application of coverage intervals for biological reference values. *Pure Appl Chem*. 1997;69(7):1601–11.

---

Manuscrito recebido em 13 de janeiro de 2009.  
Aceito em versão revisada em 18 de maio de 2009.