UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

MÉTODO ESTATÍSTICO PARA DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA DE XENOBIÓTICOS: CASO DO ÁCIDO HIPÚRICO

JOSÉ ANTÔNIO LEITE

2004

57501
049324

JOSÉ ANTÔNIO LEITE

MÉTODO ESTATÍSTICO PARA DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA DE XENOBIÓTICOS: CASO DO ÁCIDO HIPÚRICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Estatística e Experimentação Agropecuária, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador:

Prof. Dr. Augusto Ramalho de Morais - UFLA

Co-orientadores:

Prof. Dr. Mário Javier Ferrua Vivanco - UFLA

Profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira - EFOA

LAVRAS

MINAS GERAIS – BR

2004

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da UFLA

Leite, José Antônio

Método estatístico para determinação de valores de referência de xenobióticos: caso do ácido hipúrico / José Antônio Leite – Lavras : UFLA, 2004.

70 p. : il.

Orientador: Augusto Ramalho de Morais.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Biomonitorização. 2. Ácido hipúrico. 3. Xenobiótico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-001.43

JOSÉ ANTÔNIO LEITE

MÉTODO ESTATÍSTICO PARA DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA DE XENOBIÓTICOS: CASO DO ÁCIDO HIPÚRICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Estatística e Experimentação Agropecuária, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADO em 16 de fevereiro de 2004

Profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira	EFOA/CEUFE
Prof. Dr. Mário Javier Ferrua Vivanco	UFLA
Prof. Dr. Mário César Guereiro	UFLA

Prof. Dr. Augusto Ramalho de Morais
UFLA
(Orientador)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Dedico este modesto trabalho:

Ao meu pai, José Murilo;

Aos meus filhos,

Sérgio, Sílvio e Saulo;

À memória do meu irmão Fernando;

Às mulheres da minha vida:

Maria de Lourdes,

Regina Maura,

Simone Maria,

Daniella e

Júlia;

Ao pai do céu, pelos tesouros acima.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos que fazem da minha existência uma Vida.

À Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, Centro Universitário Federal e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Estatística e Experimentação Agropecuária da UFLA, pela oportunidade.

A Augusto Ramalho de Morais, Mário Javier Ferrua Vivanco e Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira, pela orientação e pela dedicação.

Aos mestres Daniel Furtado Ferreira, Eduardo Bearzoti, Júlio Sílvio de Sousa Bueno Filho, Lucas Monteiro Chaves, Luíz Henrique de Aquino, Marcelo Silva de Oliveira, Paulo César Lima, Ruben Delly Veiga e Thelma Sáfadi, dos quais me orgulho de ser discípulo.

Às funcionárias Edila, Maria das Dores, Maristela, Meire, Selma e Sheila, pela dedicação e pela amizade.

Ao professor Joel Augusto Muniz, pelo zelo na coordenação do curso.

Aos colegas: Ana Lúcia, Andréa Cristina, Antônio, Carla Regina, Deive Ciro, Denismar e Família, Devanil, Élcio, Eliana, Eric, Fabyano, Francisco Luiz e Família, Francisco Regilson, Gisele, Janser, João Marcos, José Airton, José Ermelindo, José Marcelo, José Otaviano, José Waldemar e Família, Leandro, Léo, Lúcia Aparecida, Luciane, Luiz Alberto, Luiza, Marcelo Ângelo, Marcelo Inácio, Marcos Antônio, Maria Imaculada, Maria Laucinéia, Mônica Fabiano, Nilson, Odete, Rafaela, Rejane, Renata, Roberta, Rômulo, Taciana, Vânia Fátima, Waldemar e Washington, pelo convívio fraterno e pelo apoio mútuo.

Aos funcionários do Hotel Alvorada e do Edinho's Restaurante, a minha família de Lavras.

Às sobrinhas Edmara, Eveline e Hélia, pelo afeto marcante que não se esquece.

SUMÁRIO

Página

RESUMO i

ABSTRACT ii

1 INTRODUÇÃO 01

2 REVISÃO DE LITERATURA 03

2.1 Conceito de valores de referência 05

2.2 Bioindicador 06

2.3 Aplicação dos valores de referência 07

2.4 Amostra 09

2.5 Fatores circunstanciais 09

2.6 Questionário 11

2.7 Variabilidade analítica 11

2.8 Estratificação 12

2.9 Análise multivariada 13

2.10 Inferência bayesiana 13

2.11 Trabalhos similares 14

3 MATERIAL E MÉTODOS 18

3.1 A região geográfica de referência 18

3.2 Amostragem 18

3.3 Procedimento laboratorial 19

3.3.1 Análise das amostras de urina 19

3.3.2 Concentrações não quantificadas 19

3.4 Procedimentos estatísticos 20

3.4.1 Distribuição dos dados em classes 20

3.4.2 Correlação entre as concentrações absoluta e relativa 21

3.4.3 Teste de normalidade 21

3.4.4 Teste de ajustamento a uma distribuição clássica 22
3.4.5 Teste não paramétrico 22
3.4.6 Valores e intervalos de referência 23
3.4.7 Intervalo de confiança para a média da distribuição exponencial 24
3.4.8 Inferência bayesiana 24
3.5 Recursos computacionais 25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 26
4.1 Considerações iniciais 26
4.2 A distribuição dos dados 27
4.3 Os fatores de estratificação 31
4.4 Os valores e intervalos de referência 33
4.4.1 O método não paramétrico 34
4.4.2 O método paramétrico freqüentista 34
4.4.3 O método paramétrico com inferência bayesiana 36
5 CONCLUSÕES 38
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 40
ANEXOS 43

RESUMO

LEITE, José Antônio. **Método estatístico para determinação de valores de referência de xenobióticos: caso do ácido hipúrico.** 2004. 70 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Estatística e Experimentação Agropecuária) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Os valores de referência de um xenobiótico são as medidas do seu indicador biológico detectados em indivíduos sadios, não expostos ocupacionalmente ao mesmo, necessários à biomonitorização da população exposta, mormente a que está exposta a baixos níveis, sem manifestação clínica de intoxicação em curto prazo. Para definir se um indivíduo está ou não exposto a certo toxicante, compara-se a sua concentração orgânica com o intervalo de concentrações do mesmo em pessoas sadias, seguramente não expostas a ele. Em face dos múltiplos fatores que interferem na concentração do toxicante, os valores de referência (VR) devem ser determinados por região, não sendo correto valer-se de VR de regiões desconhecidas ou de características diversas. O grupo de referência deve ser selecionado criteriosamente, considerando o número total de pessoas sadias e dos subgrupos de possíveis estratificações. O tratamento estatístico adequado é necessário para definir a distribuição dos dados, detectar valores discrepantes, incorporar conhecimentos prévios à distribuição e inferir seguramente sobre a população. O intervalo de referência da concentração urinária de ácido hipúrico para a região de Alfenas é de 0,21 a 0,29 g/g de creatinina e indivíduos com concentração acima de 0,76 g/g de creatinina são suspeitos de exposição ao tolueno.

Comitê Orientador: Augusto Ramalho de Morais - UFLA (Orientador),
Mário Javier Ferrua Vivanco - UFLA (Co-orientador),
Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira - EFOA/CEUFE (Co-orientadora).

ABSTRACT

LEITE, José Antônio. **Statistical procedure for determination of xenobiotcs reference values: case of the hipuric acid.** 2004. 70 p. Dissertation. (Master in Agronomy/Statistics and Agricultural Experimentation) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.

The reference values of the xenobiotics are values of its biological indicator detected in healthy individuals, not exposed occupationally to the xenobiotc, necessary to monitoring the exposed population, mainly that exposed to low levels, without short term clinical manifestation of intoxication. To define if an individual is or not exposed to certain toxicant, we compare its concentration in biological fluids with the interval of concentrations of the same toxicant in healthy people, surely not exposed to it. Because of the multiple factors that interfere in the concentration of the toxicant, the reference values (RV) should be determined by areas, not being correct to use RV of unknown areas or of several characteristics. The reference group should be selected approachly, taking in account the total number of healthy people and of the subgroups of possible beddings. The appropriate statistical treatment is necessary to define the distribution of the data, to detect outliers values, to incorporate previous knowledge to the distribution and to infer surely on the population. The interval of reference of the urinary hipuric acid concentration for the Alfenas area is from 0,21 to 0,29 g/g of creatinin, and individuals with concentration above 0,76 g/g of creatinin are suspicious of exposure to the toluen.

Guidance Committee: Prof. DSc. Augusto Ramalho de Morais - UFLA (Adviser),
Prof. DSc. Mário Javier Ferrua Vivanco - UFLA (Co-adviser),
Prof. DSc Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira - EFOA/CEUFE (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

Toda medida, independente da sua natureza ou do procedimento usado, só tem significado após a sua comparação com um grupo de informações relevantes, assumido como referência. Em ciências biológicas, mormente em ciências médicas, essa comparação é rotineira. No entanto, por mais difundida que esteja esta prática, somente na segunda metade do século XX desenvolveu-se algo que possa ser chamado de ciência dos valores de referência. E, para que tais valores possam refletir a origem biológica da variação, essa ciência deve incluir conceitos e métodos estatísticos.

Discussões sobre os limites de referência têm ocupado espaço na literatura da química clínica. No entanto, dois problemas ainda não foram bem esclarecidos até hoje: o tamanho da amostra necessário para determinar o intervalo de referência e os procedimentos estatísticos definidos na obtenção dos valores de referência. O uso de procedimentos, como análise multivariada, modelos de regressão e análise bayesiana, pode agregar informações importantes ao estudo dos intervalos de referência, embora exijam conhecimentos mais aprofundados da estatística.

A análise multivariada é de suma importância quando se consideram dois ou mais analitos simultaneamente, por terem efeitos orgânicos concorrentes (sinergismo) ou contrários (antagonismo). A região de referência multivariada pode ser mais desejável do que o intervalo de referência univariado devido à sua maior especificidade quanto aos falsos positivos.

A regressão múltipla é procedimento necessário e seguro para apontar os possíveis fatores de estratificação da população de referência.

A inferência bayesiana é útil sempre que se tem alguma informação de interesse relacionada com a concentração da substância tóxica em foco. Se os valores determinados com esse recurso diferem dos obtidos com inferência freqüentista, os primeiros devem ser tomados como referência.

Do progresso rápido que vem ocorrendo nos recursos computacionais, na automatização dos laboratórios, na medicina em geral, aliados à facilidade de uso de métodos estatísticos, surge a necessidade de uma revisão no processo de definição dos valores de referência.

Entre os vários indicadores biológicos, para os quais é necessário determinar valores de referência, próprios para cada região, destaca-se o ácido hipúrico (AH) em urina, visto ser um bioindicador da exposição ao tolueno e outros agentes químicos que formam o ácido benzóico no organismo humano.

Devido à falta de uma metodologia simples e objetiva para a determinação desses valores, o presente trabalho teve por objetivo apresentar alguns procedimentos estatísticos importantes para a obtenção dos valores de referência, estudando o caso específico do ácido hipúrico em urina para a região de Alfenas, município de Minas Gerais, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Desde 1980, e mesmo antes, associações nacionais e internacionais de químicos clínicos, como a Federação Internacional de Química Clínica, vêm recomendando normas para as diversas etapas da definição dos valores de referência (VR). São quase todas dirigidas à obtenção do grupo de referência, ao tratamento de fatores que afetam os VR e à condução das experiências.

A Estatística sempre esteve envolvida nos estudos das variações orgânicas, embora inicialmente de modo muito restrito. Por algum tempo, sob o ponto de vista prático, o avanço da pesquisa, em geral, superou o da Estatística, que exige cálculos extremamente extensos. Mas a Estatística Computacional recuperou essa diferença e pode agora acompanhar qualquer avanço tecnológico.

A importância de se estabelecer valores de referência pode ser exemplificada na área da Saúde Ocupacional que revela, ainda hoje, números preocupantes quanto às doenças causadas por xenobióticos, ou seja, substâncias produzidas fora do organismo. Monitorizar a exposição ocupacional, principal mecanismo para prevenir essas doenças, freqüentemente evidencia ineficácia porque os limites permitidos e valores de referência de bioindicadores são meramente compilados de estudos realizados noutras regiões (países, continentes) de condições sócio-econômicas, climáticas, clínicas e nutricionais essencialmente diferentes. E o que é mais lastimável: a legislação brasileira vem, de longa data, perpetuando essa aberração.

Muitas atividades profissionais expõem os trabalhadores a toxicantes, tornando necessário avaliar, com certa regularidade, a concentração desses elementos (xenobióticos) no organismo. Se o teor detectado é inferior ao índice biológico máximo permitido (IBMP), supõe-se que a exposição é a quantidades consideradas não nocivas. No entanto, parte da população tem atividade ocupacional que a obriga a uma exposição a níveis baixos de toxicantes, mas que

implica numa concentração orgânica significativamente superior à da população não exposta. A determinação dos valores de referência da população não exposta ocupacionalmente ao toxicante é necessária para que se obtenha uma norma de identificação dos casos de exposição ao mesmo, ainda que seja a baixos níveis.

Necessária também é a pesquisa de fatores estratificantes, como idade, sexo, uso de bebida alcoólica, hábito de fumar, ingestão de medicamentos, atividades de recreação, local de moradia e de trabalho, estados patológicos, entre outros, que alteram a concentração do bioindicador de indivíduos igualmente expostos ao xenobiótico.

A população de referência, para a qual se pretende estabelecer valores de referência (VR), deve ser claramente definida. Um questionário bem elaborado, seguido de exames hematológicos e bioquímicos adequados, constitui procedimento capaz de selecionar uma amostra representativa de tal população, qual seja, regional, sadia e não exposta ocupacionalmente ao xenobiótico.

Para obter de resultados fidedignos, deve-se observar cuidadosamente a validação do método de análise quanto à precisão, à sensibilidade, aos limites de detecção e de quantificação, e à linearidade e exatidão, pois, trabalhando com valores baixos do analito, pequenos erros de amostragem são significativos.

A determinação dos VR, pela sua complexidade, exige uma equipe multiprofissional e um delineamento experimental criteriosamente definido e bem conduzido em todas as suas etapas: elaboração do questionário validado, seleção da amostra populacional e coleta das amostras biológicas observando os critérios da ética e análise estatística apropriada dos resultados.

O tolueno ($C_6H_5CH_3$) é solvente orgânico utilizado industrialmente na manufatura de colas, borracha sintética, tintas e vernizes e está envolvido na dependência a inalantes. Tem ação tóxica significativa no sistema nervoso central, no fígado e nos rins. A biomonitorização dos indivíduos expostos se faz pela determinação do ácido hipúrico (AH) em urina, seu principal metabólito.

O AH é um metabólito fisiologicamente encontrado na urina, podendo a sua concentração urinária ser alterada pela ingestão de certos medicamentos ou alimentos, ou pela exposição a outros toxicantes. Alimentos que contêm ácido benzóico ou seus precursores, certos antidepressivos, miorrelaxantes e ansiolíticos podem aumentar bastante a excreção fisiológica do AH pela urina. Daí a importância do questionário, pois, não sendo observadas as condições pré-analíticas, os valores de referência do ácido hipúrico perdem o seu significado, mormente para a monitorização de exposições leves.

A análise de AH é realizada por cromatografia gasosa (CG) utilizando detector de ionização de chama (CG/IC) ou por CG acoplada à espectrometria de massa ou por cromatografia líquida de alta eficiência.

A identificação por cromatografia gasosa/ionização de chama requer prévia derivação do composto, sendo várias as indicadas na literatura. Alvarez-Leite et al. (1994) propuseram um agente metilante, o hidróxido de trimetilfenilamôneo, que se mostrou bastante eficiente na derivação do AH e sua subseqüente identificação por CG/IC.

A legislação brasileira, pela Portaria nº 24 de 29/12/1994, do Ministério do Trabalho (Brasil, 1994), por meio do Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO), adotou o AH como bioindicador na monitorização de trabalhadores expostos ao tolueno, pois, apesar de não ser específico, apresenta excelente relação com os níveis ambientais desse solvente. Porém, como a coleta da urina deve realizada em trabalhador aparentemente sem intoxicação e em atividade normal, só é possível obter amostras de uma única micção. Esse procedimento requer a correção dos valores do AH urinário (g/L) pela creatinina excretada (g/L) e os VR e IBMP são expressos por massa do analito (em g) em relação à massa de creatinina (em g), determinada nas mesmas amostras.

2.1 Conceito de valores de referência

Valores de referência de bioindicadores são valores do xenobiótico, ou de seu metabólito, ou qualquer alteração bioquímica relacionada à exposição ao toxicante detectada em indivíduos não expostos aos mesmos ocupacionalmente (Aitio, 1994; Alessio, 1993; Apostoli, 1994; Berlin et al., 1974). Os VR de bioindicadores em tecidos e fluidos biológicos humanos são valores importantes que possibilitam comparar estes indicadores na população ocupacionalmente exposta ao xenobiótico em questão. O conhecimento dos valores de referência na população não exposta forma uma base de dados relevante para a avaliação da exposição visando proteger a saúde pública e ocupacional. Além disso, podem fornecer base científica para pesquisas biomédicas de doenças causadas pelos respectivos agentes tóxicos (Kucera et al., 1995).

2.2 O bioindicador

Na escolha do bioindicador deve-se considerar a sua importância na avaliação da exposição ao xenobiótico, bem como na sua aplicação visando preservar a saúde dos trabalhadores que estão sendo monitorizados.

Periodicidade: a biomonitorização deve ser refeita periodicamente, pois as condições de contaminação ambiental com substâncias químicas variam com o tempo (National Institute of Occupational Safety and Health, 1978).

Notação: os VR são expressos de maneiras diferentes, conforme o seu objetivo e o país ou entidade que os gerou. Em geral, são expressos em valores médios, intervalos de 95% ou 99% de confiança e limite superior de referência (de maior interesse para médicos e higienistas). São usados para a comparação individual de resultados obtidos na monitorização biológica (Odone et al., 1988).

Expressões correlatas: em análises clínicas, as expressões "valor normal" ou "limite de normalidade" foram muito utilizadas. Em monitorização biológica, são usuais as expressões: "limite de referência" e "valor de referência" (Odone et al., 1988). A International Federation of Clínical Chemists

(IFCC, 1984) [Federação Internacional de Química Clínica (FIQC)] recomenda algumas definições visando diferenciar o uso dessas expressões (Kucera et al., 1995; Odone et al., 1988):

– valor de referência: é a medida da concentração de uma substância química numa amostra biológica de um indivíduo da população de referência.

– intervalo de referência: é o intervalo que contém a maioria (cerca de 95%) dos valores de referência da população.

Uso clínico: tradicionalmente, os valores de referência de indivíduos supostamente saudáveis têm sido muito utilizados em laboratórios clínicos. Mas, saúde não é uma condição facilmente definível; é uma condição relativa, o que torna necessário definir clinicamente o estado de sanidade que não interfere na concentração do xenobiótico em estudo (Alessio, 1993). Assim, para o caso do tolueno, os VR devem ser obtidos de indivíduos isentos de patologias que afetem a concentração do AH urinário. Em análises clínicas, um intervalo de referência é usado para diferenciar uma pessoa saudável de uma doente, para contribuir na determinação da causa específica de uma enfermidade, para acompanhar a evolução da doença de um paciente ou para a monitorização terapêutica ou ocupacional (Odone et al., 1988).

2.3 Aplicação dos valores de referência

Sem valores de referência adequados fica difícil estabelecer relação entre a concentração da substância e os seus efeitos tóxicos na população geral, na exposta ocupacionalmente e em pesquisas biomédicas, entre estados patológicos e concentrações relacionadas às doenças (Alessio et al., 1990).

A necessidade atual de estabelecer estes valores para substâncias químicas reside no fato de que, nos últimos anos, houve uma diminuição nos níveis de exposição entre o ambiente de trabalho e o macroambiente (Odone et al., 1988). A definição dos critérios de saúde reduziu o risco de exposição a

baixos níveis. Para a determinação desse risco é necessário conhecer os níveis dos toxicantes no organismo humano e a definição dos VR. O progresso neste campo só vem crescendo nos últimos anos. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura denota que as concentrações no organismo são próximas às de impacto toxicológico (Alessio et al., 1990).

Regionalidade: o interesse pela saúde no ambiente de trabalho é universal e os princípios da saúde ocupacional devem ser os mesmos para todos os países e regiões. Mas, freqüentemente, há grande variedade de práticas ocupacionais e problemas entre regiões ou entre países e a adoção de valores de referência deve ser baseada em diferentes critérios. A aplicação direta desses valores não é adequada, pois podem não ser os mesmos para os diversos grupos da população exposta (ONG, 1999). Normalmente, são determinados para cada região que tenha características sócio-econômicas e industriais uniformes. O estabelecimento de um grupo de referência apresenta dificuldades de organização e custo. Por isso, com freqüência, usam-se valores publicados na literatura, com o risco de utilizar dados de populações com características diversas (Odone et al., 1988).

Em saúde ocupacional os valores de referência são indispensáveis à monitorização biológica de alguns xenobióticos. O nível do indicador biológico nos indivíduos expostos, que permite o estabelecimento de estratégias de controle, é confrontado com o nível deste mesmo indicador, determinado numa população cuja principal característica é a de não estar exposta, por motivo profissional ou por qualquer situação ambiental, ao agente químico considerado (Dybaer, 1983; Odone et al, 1988).

Atuação brasileira: no Brasil, em 1993, foi criado o Grupo Brasileiro de Estudo para a Definição de Valores de Referência, em intercâmbio técnico e científico com a "Medicina del Lavoro", Itália, que se dedica a esse estudo no âmbito internacional. Fazem parte desse grupo, pesquisadores ligados a

laboratórios de toxicologia, como os da Faculdade de Farmácia da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas/Centro Universitário Federal, Universidade de São Paulo, Universidade do Estado de São Paulo, Universidade Federal de Minas Gerais e Universidade Estadual de Londrina.

2.4 Amostra

Um grupo de referência se caracteriza pelo conjunto de fatores que têm influência sobre o indicador estudado (Dybaer, 1983; Kucera et al., 1995; Odone et al., 1988; ONG, 1999). A *International Federation of Clinical Chemists* preconiza que, ao definir valores de referência, deve-se considerar a idade, o sexo, a raça e a herança genética.

Tamanho da amostra: antes de iniciar o trabalho é necessário definir o número de indivíduos que deve constituir a amostra. Esse número depende da finalidade requerida e deve ser tanto maior quanto maior for a variabilidade do indicador biológico na população em geral, embora seja sempre limitado pelo custo financeiro da pesquisa (Kucera et al., 1995; Odone et al, 1988). O "n" deve ser de, no mínimo, 120 pessoas, para avaliar adequadamente a população não exposta ocupacionalmente de uma região. Tal amostra deve apresentar número aproximadamente igual de homens e mulheres e de diferentes faixas etárias, entre 18 e 60 anos, sendo recomendado ao menos 50 (cinqüenta) para cada critério de estratificação da amostra (Bezener et al., 1983; BURATTI, 1978; Odone et al., 1988).

2.5 Fatores circunstanciais

Para a definição dos VR em Saúde Ocupacional devem ser considerados: o hábito de fumar, a ingestão de bebidas alcoólicas ou de medicamentos, a obesidade e os fatores patológicos, além dos fatores inerentes à natureza humana (Apostoli, 1994; Alessio et al., 1990), como:

fatores regionais: cuidados especiais devem ser tomados quando se selecionam valores de referência definidos em diferentes regiões, pois são valores baseados em populações de diferentes grupos étnicos. As diferenças bioquímicas e imunológicas podem ser muito diferentes;

fatores ambientais: a exposição não profissional a uma substância geralmente decorre da alimentação e da poluição ambiental. Outro elemento ambiental importante, quando se considera um grupo de referência, é a condição sócio-econômica, que expressa as condições de vida e higiene;

fatores religiosos, sociais e culturais: os mulçumanos, por exemplo, jejuam durante o dia no período do Ramadan, em certas regiões a fome persiste e os italianos tomam muito vinho. Fatos como esses podem alterar de modo significativo a biotransformação de alguns agentes químicos;

fatores fisiológicos: ingestão excessiva de líquidos aumenta a diurese, logo, reduz a concentração dos componentes urinários, naturais ou não;

estado nutricional e patológico: dietas ricas em alimentos que contêm ácido benzóico (ameixa, pêssego, grãos verdes de café, alimentos e bebidas conservados com benzoatos) podem elevar a concentração do AH a níveis semelhantes aos da exposição ocupacional. As hepatopatias e as nefropatias podem alterar o metabolismo dos agentes químicos e interferir na eliminação dos mesmos. Ainda, o uso de certos medicamentos pode alterar a excreção fisiológica do AH pela urina (Alvarez Leite et al., 1998). Disso resulta a impraticabilidade de estabelecer valores de referência para a população toda e a necessidade de excluir, do grupo de referência, indivíduos com tratamento terapêutico em curso;

condições climáticas: a atividade física intensa e a exposição a temperaturas elevadas aumentam a razão respiratória e, conseqüentemente, a inalação de substâncias toxicantes. O clima quente aumenta a velocidade de absorção de vários xenobióticos pela pele.

2.6 Questionário

Um questionário deve ser utilizado para fornecer detalhes sobre idade, sexo, residência, ocupação, tabagismo, peso corporal, alimentação, fatores sócio-econômicos, fontes poluidoras próximas da residência ou do trabalho e queixas sobre enfermidades. Como a população de referência deve ser saudável, os voluntários devem ser submetidos a exames bioquímicos e hematológicos para identificar possíveis anomalias fisiológicas ou patologias (Alessio et al., 1990).

Método laboratorial: para a análise química do bioindicador, deve-se padronizar (Petitclere & Wilding, 1984) os procedimentos de coleta, o tratamento das amostras, o método analítico e o controle de qualidade.

2.7 Variabilidade analítica

No laboratório existem fontes de variação indefinidas, além das causadas pela temperatura, pela técnica, pela validade dos reagentes e pelas características dos pacientes, que alteram a média e o desvio padrão. Um pequeno coeficiente de variação do AH indica que as determinações estão bem controladas e um coeficiente alto sugere a necessidade de um número maior de amostras (Odone et al., 1988).

A variabilidade analítica do método deve estar dentro dos limites aceitáveis. A padronização do método e dos programas internos de qualidade é necessária, além da validação por meio do estudo da sua precisão, sensibilidade, limites de detecção e de quantificação, linearidade e exatidão, de modo a obter resultados fidedignos (Buratti, 1978; Petitclere & Wilding, 1984). Nesse tipo de análise, o estudo destas condições é imprescindível, pois se trabalha com baixos valores do analito, próximos ao limite de detecção, fazendo com que pequenos erros sejam significativos (Odone et al., 1988).

Exposição coletiva: ultimamente, a monitorização biológica tem sido usada para avaliar a exposição de grupos de trabalhadores, preferencialmente à

avaliação individual. Para caracterizar esta exposição, tem sido recomendada a distribuição dos VR (por técnicas estatísticas determinadas) que é comparada com a distribuição dos valores encontrados no grupo ocupacionalmente exposto.

2.8 Estratificação

Definidos os VR da população geral, deve-se verificar se esses são diferentes para os subgrupos, caracterizados por sexo, faixa etária, etc. No contexto inferencial, utiliza-se um teste estatístico para detectar possíveis diferenças significativas. A eficiência desse teste é chamada "poder" e indica a probabilidade de detectar diferenças quando, de fato, elas existem. Obviamente, o poder do teste aumenta com o tamanho da amostra, logo, recomendam-se amostras grandes para a comparação de subgrupos (Odone et al., 1988).

Parâmetros: os parâmetros necessários à estimativa dos intervalos de referência devem fornecer uma descrição adequada da população (Kucera et al., 1995), logo, deve-se preliminarmente identificar a população da qual foi extraída a amostra, o que se consegue de forma exploratória e pela construção de histogramas. Esses são os diagramas que melhor caracterizam a distribuição normal e suas propriedades. A análise numérica da população consiste em testes estatísticos, como é o caso do Shapiro-Wilk para a normalidade (Alessio, 1993; Siegel., 1995). Se um teste apontar a não normalidade, o recurso alternativo é a transformação dos dados visando obter uma distribuição normal (Dybaer, 1983; Kucera et al., 1995) ou a análise não paramétrica. As duas alternativas têm desvantagens. A transformação dos dados modifica a escala original e acarreta dificuldades na interpretação dos VR. A análise não paramétrica tem pré-suposições menos rigorosas, logo os seus testes (Wilcoxon-Mann-Witney, por exemplo) são menos poderosos que os paramétricos correspondentes (t-Student).

– Média e mediana apontam a centralidade da distribuição.

– Define-se o intervalo de referência por "média ± σ" para distribuição não paramétrica ou o intervalo de confiança para distribuição paramétrica, baseados em, pelo menos, 120 valores de referência (Bezener et al., 1983).

– Outro valor de referência importante é o limite superior de referência (L.S.R.) dado pelo 95º percentil para distribuição não paramétrica ou por "média + 2σ" para distribuição paramétrica (Kucera et al., 1995).

2.9 Análise multivariada

Harris et al. (1995) enfatizam que, em pessoas sadias as concentrações de diferentes analitos bioquímicos são geralmente independentes umas das outras. Na enfermidade, entretanto, as variáveis são altamente correlacionadas e o diagnóstico pode então ser beneficiado pelo conhecimento de regiões multivariadas, derivadas de pacientes anteriores com essas enfermidades. Nesse contexto, Gerges (1993) avaliou os efeitos nocivos que a combinação "ruído e inalação de tolueno" pode causar.

2.10 Inferência bayesiana

Outra abordagem para o estudo dos VR é a utilização da inferência bayesiana, que pressupõe algum conhecimento prévio sobre a variável de interesse a partir do qual, às vezes, pode-se estabelecer uma distribuição que tem o nome de "priori". Dessa e com a função de verossimilhança, obtém-se a distribuição "posteriori". A relação entre "priori" e "posteriori" é expressa por:

$$\text{posteriori} \propto \text{priori} \times \text{verossimilhança}.$$

Se a priori tem uma distribuição estatística, é chamada de informativa; se é uma constante, é dita não informativa (Morettin et al., 2003).

Norma geral: se todos os trabalhadores do grupo exposto têm valores de biomarcadores acima da metade do valor superior de referência, este grupo, provavelmente, foi exposto ocupacionalmente.

2.11 Trabalhos similares

Nos últimos congressos de toxicologia tem sido divulgada a existência de 15 trabalhos, feitos no Brasil, relacionados a valores de referência de xenobióticos. Abaixo são relacionados alguns deles:

1) Costabeber, E. et al., do Instituto de Toxicologia, da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em 1995, com o objetivo de analisar a repercussão da Norma Regulamentadora nº 7, da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho, que adotou a unidade de medida da concentração de AH urinário corrigida pelo teor de creatinina, na avaliação de risco de uma população ocupacionalmente exposta ao tolueno. Foram comparados 390 resultados de amostras corrigidas pela creatinina e, pela densidade, verificando-se que em 6,9% dos casos os resultados alteraram, aproximando-se mais dos valores reais quando ajustados pela creatinina.

2) Thiesen, F.V. et al., do Instituto de Toxicologia, da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em 1995, determinaram a concentração de ácido hipúrico na urina de 50 jovens e crianças em situação de rua de Porto Alegre, RS, caracterizados como usuários de *loló*. O diagnóstico clínico do uso abusivo de *loló* se confunde com o da embriaguez alcoólica. O objetivo da pesquisa foi obter um elemento para o diagnóstico diferencial dessas duas situações patológicas. Seis amostras apresentaram resultados normais. As demais (88%) tiveram níveis entre 1,6 e 46,1, com média 18,4 e desvio padrão 10,32 (com unidade em g/g de creatinina).

3) Thiesen, F.V. et al., do Instituto de Toxicologia, da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em 1996, coletaram 70 amostras de urina de voluntários não expostos ao tolueno e em abstinência de três ou mais dias de alimentos ricos em seus precursores, 28 dos quais eram consumidores de chimarrão e 42 não usaram produtos à base de erva-

mate nos últimos três dias. O objetivo era evidenciar o aumento significativo da concentração de AH urinário para os usuários de chimarão. Das 28 amostras de consumidores de chimarrão investigadas, 32% apresentaram concentrações de AH urinário acima dos VR para indivíduos não expostos ao tolueno. Dentre os 42 indivíduos não expostos, nenhuma amostra apresentou valor alterado.

4) Alvarez-Leite, E.M. et al., do Departamento de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, em 1998, coletaram amostras de urina de 281 pessoas não expostas ocupacionalmente ao tolueno visando determinar a faixa de valor de referência para o ácido hipúrico na região metropolitana de Belo Horizonte, obtendo o resultado, definido pelo intervalo de 95% de confiança da distribuição exponencial (0,361; 0,481)g/L.

5) Siqueira, M.E.P.B et al., do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, Centro Universitário Federal, em 2002, coletaram amostras de sangue de 56 homens e 57 mulheres do distrito de Alfenas, Sul de Minas Gerais, Brasil, para estabelecer VR para a atividade do delta-aminolevulínico de dehydratase ácida (ALA-D, EC 4.2.1.24), obtendo: $\bar{x} \pm \sigma = 54,5 \pm 9,8$; intervalo de 95% de confiança = 52,7 – 56,4; menor valor de referência ($\bar{x} - 2\sigma$) = 34,9; unidade: μmol/min.L eritrócitos.

6) Alvarez-Leite et al., do Departamento de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, em 2002, coletaram amostras de urina de 247 indivíduos (sendo 127 homens e 120 mulheres, com faixa etária entre 15 e 60 anos), residentes na região metropolitana de Belo Horizonte, com o objetivo de determinar o efeito dos fatores: sexo, idade e ingestão de café na concentração de AH urinário, para a população não exposta ocupacionalmente ao tolueno. Utilizando o teste de Kruskal concluiu não haver influência significativa desses fatores sobre a concentração do AH urinário.

7) Martins, Isarita et al., bolsista do PIBIC/CNPQ, apresentaram no IX Congresso Brasileiro de Toxicologia, em Ribeirão Preto, em 1995, o trabalho:

Valores de Referência para Metemoglobina na Região Sul de Minas Gerais, no qual relatam que, com uma amostra de 200 voluntários não fumantes e não expostos ocupacionalmente aos metemoglobinizantes, determinaram: o intervalo de 95% de confiança e o valor de referência superior. O valor médio foi 0,73% e o intervalo de 95% de confiança 0,70% a 0,76%. O teste t de Student não apontou diferença significativa definida pelo sexo ou pela idade do voluntário.

8) Silva, Zelaine, L. et al., do Departamento de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, em 1996, coletaram amostras de sangue de 83 pessoas da região metropolitana de Belo Horizonte, visando determinar os VR da acetilcolinesterase, bioindicador da exposição ocupacional a inseticidas organofosforados e carbamatos, obtendo, em valores expressos em ΔpH/h, 0,81 para homens e 0,74 para mulheres quanto à atividade eritrocitária, e 0,69 para homens e 0,68 para mulheres quanto à atividade plasmática. Usaram o teste t de Student para a comparação dos grupos.

9) Siqueira, M.E.P.B. et al., do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, Centro Universitário Federal, em 1996, coletaram sangue e urina de 193 voluntários não fumantes saudáveis visando estabelecer os VR do tiocianato plasmático e do urinário, bioindicadores da exposição ocupacional aos xenobióticos que os afetam. Os intervalos de 95% de confiança obtidos foram: 2,04 ± 0,22 mg/L e 1,13 ± 0,11 g/g de creatinina, respectivamente. Dentre os fatores estratificantes, só a mandioca cozida elevou significativamente os níveis plasmáticos.

10) Paolielo, Mônica M.B. et al., do Departamento de Patologia Aplicada, Legislação e Deontologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Londrina, em 1997, coletaram sangue de 206 pessoas saudáveis acima de 15 anos, da região Sul de Londrina, visando determinar os VR da plumbemia, obtendo: 2,4 a 16,6 μg/dL ($\bar{x} \pm \sigma$) e mediana = 7,0 μg/dL.

11) Siqueira, M.E.P.B. et al., do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, Centro Universitário Federal, em 1997, coletaram amostras de sangue de 200 voluntários não fumantes e não expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono visando definir os VR para carboxiemoglobina, encontrando: $\bar{x} \pm \sigma =$ $(1,0 \pm 0,75)\%$, intervalo de 95% de confiança entre 0,9% e 1,1% e valor superior de referência ($\bar{x} \pm 2\sigma$) de 2,5%. O teste t de Student não detectou diferenças significativas nesses valores segundo o sexo, idade ou uso de bebidas alcoólicas.

12) Alvarez-Leite, E.M. et al., do Departamento de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, em 1999, coletaram urina de 96 homens e 99 mulheres não expostos ocupacionalmente ao tolueno, visando analisar os efeitos do uso de bebidas alcoólicas e do hábito de fumar na concentração do AH urinário. Foi usado o teste de Kolmogorov-Sirnov para a normalidade e o de Wilcoxon-Mann-Witney para comparação dos grupos com o controle. Os resultados não foram significativos.

13) Passarelli, M.M. et al., do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em 1999, coletaram amostras de urina de 84 indivíduos da cidade de São Paulo, não expostos ocupacionalmente ao metanol, com o objetivo de definir os VR do mesmo, encontrando 0,5 a 4,78 mg de metanol/L de urina para a população em geral, não detectando diferença significativa devida ao sexo.

14) Oliveira, Danielle P. et al., da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em 2003, publicou, na Revista Brasileira de Toxicologia, 16(1), p.49-53, um interessante trabalho intitulado *Valores de referência de bioindicadores: uma visão geral*, no qual faz um relato histórico dos procedimentos usados na determinação desses, aponta critérios de seleção e exclusão dos voluntários, indica os possíveis fatores de estratificação e recomenda procedimentos estatísticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 A região geográfica de referência

A população de referência, da qual foi extraída a amostra aleatória de elementos não expostos ocupacionalmente ao tolueno, é a população do município de Alfenas, situado na região Sul do estado de Minas Gerais, Brasil. Os valores de referência aqui definidos são válidos para todos os residentes nesse município e nas áreas circunvizinhas que têm características bem próximas às de Alfenas (Anexo 1), isto é, o Sul de Minas Gerais.

3.2 Amostragem

Observando as recomendações de Bezener et al. (1983), Buratti (1978) e de Odone et al. (1988), bem como as limitações impostas pelo tempo e pelo custo financeiro, foram coletadas amostras de urina de 226 indivíduos não expostos ao tolueno, residentes em Alfenas, MG, no Laboratório de Análises Toxicológicas da EFOA/CEUFE, para esse trabalho. Os voluntários selecionados responderam ao protocolo toxicológico (Anexo 2) e, para garantir a sanidade dos mesmos, foram submetidos a exames bioquímicos e hematológicos (Anexo 3). A coleta de material foi processada após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da EFOA/CEUFE. Dos 226 voluntários, 45 ($\cong$ 20%) foram excluídos por suspeita ou certeza de: alteração da função pulmonar, hepática ou renal; exposição ao tolueno; ingestão, nas últimas 24 horas, de alimentos conservados em benzoatos ou em ácido benzóico; uso de medicamentos que podem alterar a excreção fisiológica do ácido hipúrico pela urina, restando 181 voluntários considerados saudáveis e não expostos. A amostra ficou, então, assim constituída: 69 homens e 112 mulheres, 45 fumantes

(que fumam mais de 5 cigarros por dia) e 136 não fumantes (que fumam 5 ou menos de 5 cigarros por dia), 75 que ingerem bebidas alcoólicas (mais de 5mL/dia) e 106 que não ingerem (ingerem 5 ou menos de 5mL/dia), 89 com menos de 39 anos de idade e 92 com idade de 39 ou mais anos.

3.3 Procedimento laboratorial

Coleta de sangue: as amostras de sangue (12mL), foram obtidas por coleta a vácuo com heparina e as análises, bioquímica e hematológica, foram realizadas no mesmo dia. Os indivíduos amostrados ficaram em jejum de 12 horas antes da coleta. As análises forneceram teor de: glicose, colesterol, triglicérides, bilirrubina (direta, indireta e total), aspartato aminotransferase (AST), aspartato alaminotransferase (ALT) e o hemograma completo.

Coleta de urina: as amostras de urina foram coletadas de uma única micção do trabalhador em atividade normal, em frascos de polietileno (50ml) e guardadas sob resfriamento (–20ºC) até a análise (realizada até 4 dias da coleta), detectando: AH(g/L), creatinina(g/L), densidade e uréia.

3.3.1 Análise das amostras de urina

O método analítico empregado foi o de Kira (1977), com a identificação usando a técnica de Alvarez-Leite et al. (1994) de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, conforme descrito no Anexo 4.

3.3.2 Concentrações não quantificadas

Aos valores não quantificados, por serem inferiores ao limiar de detecção do método validado, é atribuído, geralmente, o menor valor detectado (limite de detecção) dividido por 2, procedimento de origem não encontrada na literatura. Ocorre que, tratando-se de populações seguramente não expostas, com

baixas concentrações do toxicante, o menor valor detectado varia de método para método. Neste trabalho optou-se por definir esses valores da seguinte maneira: "o menor valor detectado menos o desvio padrão dos 20 menores valores encontrados". Outra alternativa recomendada seria "a análise de sobrevivência com censura à esquerda".

3.4 Procedimentos estatísticos

Entre os parâmetros usados para a caracterização de uma população, foram avaliados os elementos típicos das medidas de posição, como: média, mediana e quantis, e as medidas de variabilidade, como variância, desvio padrão e coeficiente de variação (Oliveira et al., 2003).

Inúmeras técnicas estatísticas podem ser aplicadas ao estudo dos valores de referência. Alguns procedimentos usados neste trabalho são descritos a seguir.

3.4.1 Distribuição dos dados em classes

A distribuição dos dados em classes foi feita segundo o procedimento usual (Morettin et al., 2003) de tal modo que o ponto médio da primeira classe seja exatamente igual ao menor dado. Então, obteve-se a distribuição de freqüência dos dados de AH do seguinte modo:

a) o número recomendado de classes (n) foi obtido usando o estimador (inteiro mais próximo de) $n = 5 \times \log N$, sendo N o número de valores da amostra;

b) amplitude da amostra: $A = Ls - Li$ = maior dado – menor dado;

c) amplitude de classe: $h = A/(n - 1)$;

d) limite inferior da primeira classe: $li = Li - h/2$.

Definidos esses valores contou-se quantos dados havia em cada classe de freqüência e, com esses resultados, construiu-se o histograma sobre o diagrama cartesiano, representando, na abscissa, os limites das classes e, na

ordenada, as suas freqüências absolutas. Como o limite inferior obtido para a primeira classe foi negativo, então ele foi alterado para 0 (zero).

3.4.2 Correlação entre as concentrações absoluta e relativa

A legislação brasileira adota, desde 1994, a concentração da creatinina como correção da concentração urinária de certos xenobióticos, entre eles o tolueno ou seus metabólitos. Deve-se, no entanto, determinar a correlação linear entre a concentração absoluta do analito (g/L) e a relativa (g do analito por g de creatinina) mormente quando o biomarcador é fisiologicamente encontrado na urina. A estatística do coeficiente de correlação foi determinada por:

$$r = \frac{SP(xy)}{\sqrt{SQ(x)SQ(y)}},$$

$$\text{sendo } SP(xy) = \Sigma x_i y_i - \frac{\Sigma x_i \Sigma y_i}{n},\ SQ(x) = \Sigma x_i^2 - \frac{(\Sigma x_i)^2}{n} \text{ e}$$

$$SQ(y) = \Sigma y_i^2 - \frac{(\Sigma y_i)^2}{n},$$

em que x_i e y_i são os i-ésimos valores das variáveis: concentração absoluta e relativa do analito, respectivamente.

3.4.3 Teste de normalidade

Um teste comumente usado é o de normalidade: teste Shapiro-Wilk, que consiste em obter a estatística (W) dada pela razão entre o quadrado de uma combinação linear adequada dos valores esperados das estatísticas de ordem da distribuição normal, e o quadrado dos desvios em relação à média, atendidas às pré-suposições de aleatoriedade da amostra e de se ajuste a uma distribuição desconhecida. Assim, obtém-se W por (Ferreira, 2003):

$W = b^2/D^2$, com $b = \sum_{i=1}^{k} a_{n-i+1}(y_{n-i+1} - y_i)$, $D^2 = \sum_{i=1}^{k}(y_i - \bar{y})^2$ e $k = n/2$, se n é par e $k = (n-1)/2$, se n é ímpar. Aceita-se a normalidade se W > quantil apropriado.

3.4.4 Teste de ajustamento a uma distribuição clássica

O teste mais utilizado é o de aderência pelo qui-quadrado. Segundo Mood et al. (1974), consiste em comparar a densidade de probabilidade da população representada pelos dados amostrais com a densidade de probabilidade da distribuição de interesse. Assim, para testar o ajuste a uma distribuição exponencial, a hipótese nula deve ser: H_0: "A função de densidade de probabilidade da população de origem dos dados amostrais é uma distribuição exponencial de parâmetro λ".

As pressuposições requeridas nesse teste são: aleatoriedade da amostra e escala contínua de medida. Sendo F_o a freqüência observada e F_e a freqüência esperada, a estatística do teste é $\chi_e^2 = \Sigma[(F_o - F_e)^2/F_e]$, que deve ser comparada com $\chi^2_{1-\alpha;n-p-1}$, em que n é o número de classes e p é o número de parâmetros da distribuição de interesse. Se $\chi_e^2 \leq \chi^2_{crítico}$, aceita-se H_0. Esse teste não deve ser usado se mais de 20% das freqüências esperadas são menores que 5, o que pode ser contornado "fundindo" as classes adjacentes que apresentem essa restrição.

3.4.5 Teste não paramétrico

O teste de Wilcoxon-Mann-Whitney indica se duas amostras vêm da mesma população (H_0) ou de populações distintas (H_1). Neste trabalho, as duas amostras são os dois subgrupos da amostra de referência definidos por um fator de estratificação: sexo (homens e mulheres), idade (com menos de 39 anos e com idade igual ou superior a 39 anos), etc., quanto à concentração de AH urinário. Segundo Costa Neto (1977), tem-se:

a) $u_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1+1)}{2} - T_1$ e $u_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2+1)}{2} - T_2$, em que n_1 e n_2 são os tamanhos das amostras, T_1 e T_2 as somas dos valores, u_1 e u_2 as estatísticas dos subgrupos.

b) $\mu(u_1) = \mu(u_2) = n_1 n_2/2$ e $\sigma(u_1) = \sigma(u_2) = \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}$.

c) $\mu(T) = \frac{n(n+1)}{2}$ e $\sigma(T) = \sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1)}{24}}$.

d) As pressuposições do teste são:

I) Os subgrupos são amostras aleatórias das respectivas populações.

II) Existe independência mútua entre os subgrupos.

III) A escala de medida é, pelo menos, ordinal.

e) $z = \frac{u_1 - \mu(u)}{\sigma(u)}$; rejeita-se H_0 se $|z| > z_{\alpha/2}$, sendo $z_{\alpha/2}$ o valor crítico da distribuição normal padrão.

3.4.6 Valores e intervalos de referência

Para a caracterização dos valores e intervalos de referência foram obtidas, de acordo com Harris et al. (1995), as estimativas para:

– tamanho da amostra: n (implica na representatividade da amostra);

– intervalo de referência: $\overline{x} \pm \sigma$, é o intervalo de referência que se define quando os dados amostrais não se ajustam a nenhuma distribuição clássica (de modo direto ou mediante transformação);

– mediana: Md ou Med (é o valor central das concentrações detectadas);

– intervalo experimental: (Li; Ls), é o intervalo limitado pelos valores amostrados extremos;

– intervalo de 95% de confiança: é o intervalo de referência da média para a distribuição que melhor se ajustou aos dados amostrais;

– limite superior de referência: ($\overline{x}$ + 2σ), é o limite de decisão clínica quanto à exposição ocupacional ao toxicante;

– P95 ou 95º percentil: é o limite de decisão clínica quanto à exposição ocupacional, para a estatística não paramétrica.

3.4.7 Intervalo de confiança para a média da distribuição exponencial

Conforme Mood (1974), se uma variável aleatória X tem densidade dada por $f_X(x; \lambda) = \lambda e^{-\lambda x} I_{[0,\infty)}(x)$, $\lambda > 0$, então X tem uma distribuição exponencial, com $E[X] = 1/\lambda$, $var[X] = 1/\lambda^2$ e intervalo de confiança definido por:

$$\frac{2n.\overline{x}}{\chi^2_{\alpha/2;\nu=2n}} \leq \frac{1}{\lambda} \leq \frac{2n.\overline{x}}{\chi^2_{1-\alpha/2;\nu=2n}},$$

sendo "n" o tamanho da amostra, $\overline{x}$ a média da mesma, $\chi^2_{\alpha/2}$ e $\chi^2_{1-\alpha/2}$ os valores críticos da distribuição qui-quadrado ao valor nominal α/2.

3.4.8 Inferência bayesiana

A inferência bayesiana (Box & Tiao, 1992) baseia-se no conhecimento prévio de alguma característica peculiar da variável de interesse (priori), mesmo sendo subjetiva, que se acrescenta à análise (por exemplo: IBMP = 2,5g(AH)/g(creatinina)), obtendo:

priori × verossimilhança ∝ posteriori

Se a priori não afeta a distribuição dos dados, então ela assume o valor "1", resultando: posteriori = verossimilhança.

Neste trabalho foram feitas três inferências, ao nível de significância de 5%, a saber:

1ª) com priori não informativa;

2ª) com priori não informativa, mas gerando uma gama truncada nos limites definidos por 0,01 (limiar de detecção do método) e 2,5 (IBMP);

3ª) com priori informativa baseada numa gama (b = 3 e a = 2), (Anexo 7).

Assim, antes de executar uma análise bayesiana, deve-se conhecer a distribuição da verossimilhança e definir convenientemente a priori.

3.5 Recursos computacionais

Para a efetivação dos procedimentos estatísticos foram usados os seguintes programas: SISVAR, versão 4.3 e SAS, versão 6.12.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Considerações iniciais

O anexo 3 contem, dispostos em tabela, as características individuais (idade, sexo, hábito de fumar e uso de bebida alcoólica) de interesse e a concentração urinária de ácido hipúrico (AH), em g/L, além da concentração urinária de creatinina (g/L) e a concentração de AH, em g de AH/g de creatinina, dos 181 indivíduos citados na seção 3.2, saudáveis e não expostos ao tolueno.

A taxa de filtração renal do AH, e de outros toxicantes, varia muito num curto espaço de tempo. Logo, uma concentração elevada do analito (g/L) detectada num exame laboratorial tanto pode indicar exposição ao toxicante, como pode decorrer de uma menor filtração renal do indivíduo. O Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO), órgão subordinado ao Ministério do Trabalho, em 1994, adotou uma medida de concentração relativa, que pudesse indicar exclusivamente o nível de exposição. Como a taxa de filtração renal da creatinina é constante, adotou-se o quociente entre a concentração do AH e a concentração de creatinina como taxa indicadora da exposição ao toxicante. Assim: grama de AH por litro de urina, dividido por grama de creatinina por litro de urina, é igual a grama de AH por grama de creatinina. O PCMSO estabeleceu, pela Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7), da Portaria nº 24 de 29/12/1994, publicada no DOU, Brasília, 1994, p. 21278-9, o valor de referência para o AH como sendo $\leq$ 1,5 g/g de creatinina e o índice biológico máximo permitido (IBMP) igual a 2,5 g/g de creatinina.

Antes de qualquer inferência, determinar a correlação entre as duas concentrações, absoluta e relativa, para cada indivíduo.

Uma correlação baixa indica que a concentração do analito está variando muito, em relação à da creatinina, de indivíduo para indivíduo (devido a

diferenças interindividuais: idade, raça, sexo, sanidade, etc.) ou para um mesmo indivíduo (devido a diferenças intra-individuais: condições pré-analíticas, gravidez, período pré e pós menopausa, tensão pré-mestrual, etc.). É prudente rever, neste caso, os critérios de seleção da amostra. Uma correlação alta indica que a concentração do analito não está variando muito de modo acidental.

A estimativa do coeficiente de correlação (linear) entre as concentrações de AH em g/L e g/g, calculada conforme indicado na seção 3.4.2, foi de 0,9823 ($P<0,01$), indicando alta e significativa associação positiva entre essas unidades, ou seja, a variação das concentrações de AH é aleatória e não acidental.

4.2 A distribuição dos dados

A distribuição dos valores da última coluna da Tabela A3, do Anexo 3, concentrações do AH urinário em g/g de creatinina, em classes e construindo o histograma, conforme descrito na seção 3.4.1, com as respectivas freqüências absolutas, relativas e acumuladas crescentes, está apresentada na Tabela 1:

TABELA 1. Distribuição dos dados relativos às concentra ções de ácido hipúrico, em g/g de creatinina, creatinina, em classes de freqüência.

AH (g/g)	F	Fr	Fa	Far
(0,000; 0,082]	52	0,287	052	0,287
(0,082; 0,226]	54	0,298	106	0,585
(0,226; 0,370]	36	0,198	142	0,783
(0,370; 0,514]	17	0,094	159	0,877
(0,514; 0,658]	08	0,044	167	0,921
(0,658; 0,802]	07	0,039	174	0,960
(0,802; 0,946]	02	0,011	176	0,971
(0,946; 1,090]	01	0,006	177	0,977
(1,090; 1,234]	02	0,011	179	0,988
(1,234; 1,378]	01	0,006	180	0,994
(1,378; 1,522)	01	0,006	181	1,000
Soma	181	1,000		

Observando-se a Tabela 1 verifica-se a não normalidade dos dados, com muitos valores nas classes menores e poucos nas maiores, indicando forte assimetria à direita, o que é confirmado pelo teste Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965), conforme visto na seção 3.4.3 e apresentado na Tabela 2.

TABELA 2 – Estimativa dos parâmetros: nº de dados, média, desvio padrão, coeficientes de assimetria, de curtose e de variação, erro padrão da média, estimativa do teste de normalidade e sua respectiva probabilidade relativa a amostra de ácido hipúrico (AH), na região de Alfenas.

Parâmetro	Valor
Número de dados	181
Soma dos dados	44,64
Média da amostra	0,24663
Variância da amostra	0,066862
Desvio padrão	0,258578
Simetria	2,002168
Curtose	4,966577
Coeficiente de variação	104,8445
Erro padrão da média	0,01922
Estatística do teste Shapiro-Wilk	0,795884
Pr < W (p valor)	0,0001

Os principais quantis são mostrados no esquema abaixo:

0%	25%	50%	75%	95%	100%
0,01	0,07	0,16	0,34	0,74	1,45

A distribuição de freqüência na forma de histograma, juntamente com a curva de Gauss, está mostrada na Figura 1. Nota-se claramente que os dados possuem assimetria à direita, ressaltada pelo valor 2,002 obtido na Tabela 2.

Confirmada a não normalidade da distribuição, um recurso usual nos procedimentos para a determinação dos valores de referência é a transformação dos dados. As transformações mais comumente utilizadas são $y = \log x$, $y = \sqrt{x}$

e y = 1/x. Nenhuma transformação de dados aproximou satisfatoriamente a variação da concentração de AH de uma distribuição normal.

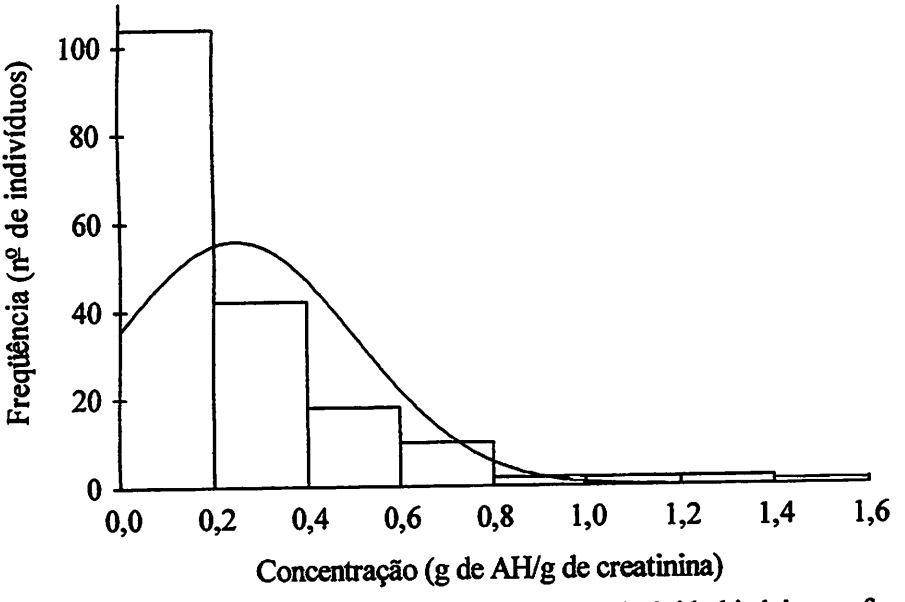


FIGURA 1 – Representação gráfica da concentração de ácido hipúrico na forma de histograma, em g/g de creatinina, com a curva normal.

Confirmada a não normalidade da distribuição, um recurso usual nos procedimentos para a determinação dos valores de referência é a transformação dos dados. As transformações mais comumente utilizadas são y = log x, y = $\sqrt{x}$ e y = 1/x. Nenhuma transformação de dados aproximou satisfatoriamente a variação da concentração de AH de uma distribuição normal.

Investigando se alguma distribuição conhecida descreve satisfatoriamente os dados originais, verificou-se, como indicado na sessão 3.4.4, que esses se ajustam adequadamente a uma distribuição exponencial, com estimativa do parâmetro $\lambda = 0{,}24663$ e a uma distribuição gama, com estimativa do parâmetro de escala $\hat{a} = 0{,}259$ e do parâmetro de forma $\hat{b} = 0{,}950$.

Utilizando-se a distribuição exponencial obteve-se o valor médio da concentração de AH de 0,246 g de AH/g de creatinina e o intervalo de referência variando de 0,21 a 0,29 g de AH/g de creatinina, com 95% de confiança.

O coeficiente de determinação para a distribuição exponencial foi de 0,91406, indicando que 91,406% das variações observadas nas concentrações de AH podem ser representadas por uma distribuição exponencial (Figura 2). De modo semelhante, verificou-se que 91,682% das variações podem ser explicadas pela distribuição gama, de parâmetros $\hat{a} = 0,259$ e $\hat{b} = 0,950$ (Figura 3).

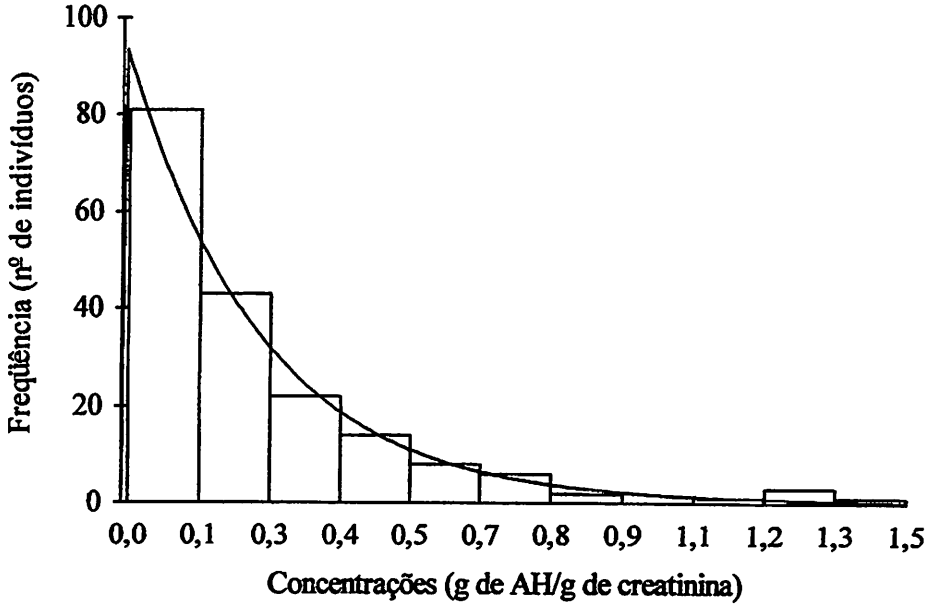


FIGURA 2 – Representação gráfica da concentração de ácido hipúrico na forma de histograma, em g/g de creatinina, com a curva exponencial.

Logo, neste caso, transformar os dados para obter valores que se ajustem a uma normal, implica em afastar-se da exponencial e da gama, que, no caso, são distribuições mais adequadas para estudar as concentrações de AH. Igualmente, não é procedimento adequado usar o método não paramétrico para obter

intervalos de referência, pois, ao contrário da exponencial e da gama, ele não assegura nenhuma probabilidade de acerto nas inferências.

Ainda, quanto à opção de se usar a distribuição exponencial ou a gama, para as quais os dados tiveram ajustamentos praticamente idênticos, é preferível trabalhar com a primeira, que possui menos parâmetros do que a gama; em geral, a distribuição exponencial pode ser tomada como um caso particular da distribuição gama (MOOD et al., 1974). É o princípio da parcimoniosidade que rege os trabalhos realizados com bom senso.

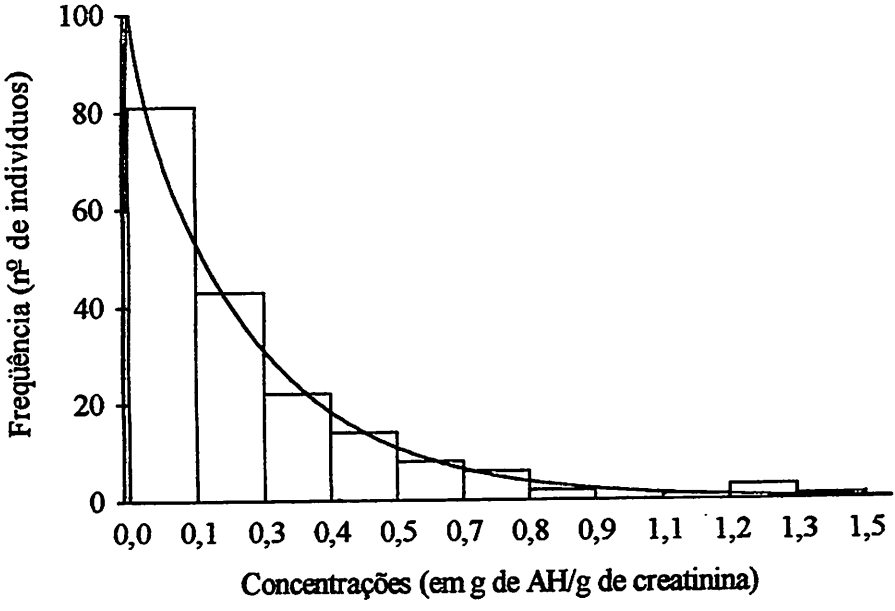


FIGURA 3 – Representação gráfica da concentração de ácido hipúrico na forma de histograma, em g/g de creatinina, com a distribuição gama.

4.3 Os fatores de estratificação

A análise dos fatores estratificantes consiste em obter os intervalos para os subgrupos definidos por: idade, sexo, hábito de fumar e uso de bebida alcoólica. Para outros fatores, em geral, não são feitos esses intervalos, porque a subdivisão da amostra resulta número insuficiente de dados para cada subgrupo.

Não havendo diferenças significativas entre os valores dos subgrupos definidos por um dado fator, a estratificação correspondente é descartada. As concentrações médias dos subgrupos e da amostra estão mostradas na Tabela 3.

TABELA 3 – Médias das concentrações de AH urinário dos subgrupos definidos pelo sexo, pela idade, pelo hábito de fumar e pelo uso de bebida.

Categoria:	Total	Sexo		Idade		Tabagismo		Beb. alcoólica	
		Fem.	Masc.	< 39ª	≥ 39a	Não	Sim	Não	Sim
nº pessoas:		114	67	89	92	136	45	106	75
Média:	0,246	0,230	0,274	0,228	0,264	0,235	0,279	0,210	0,296

O Box-Plot (Figura 4) sugere que nenhum dos subgrupos gerados pelos fatores acima citados apresenta diferença significativa, não justificando assim a estratificação. A Figura 4 evidencia, além disso, uma acentuada assimetria à direita (média > mediana), o que está em conformidade com o ajuste ao modelo exponencial, já discutido.

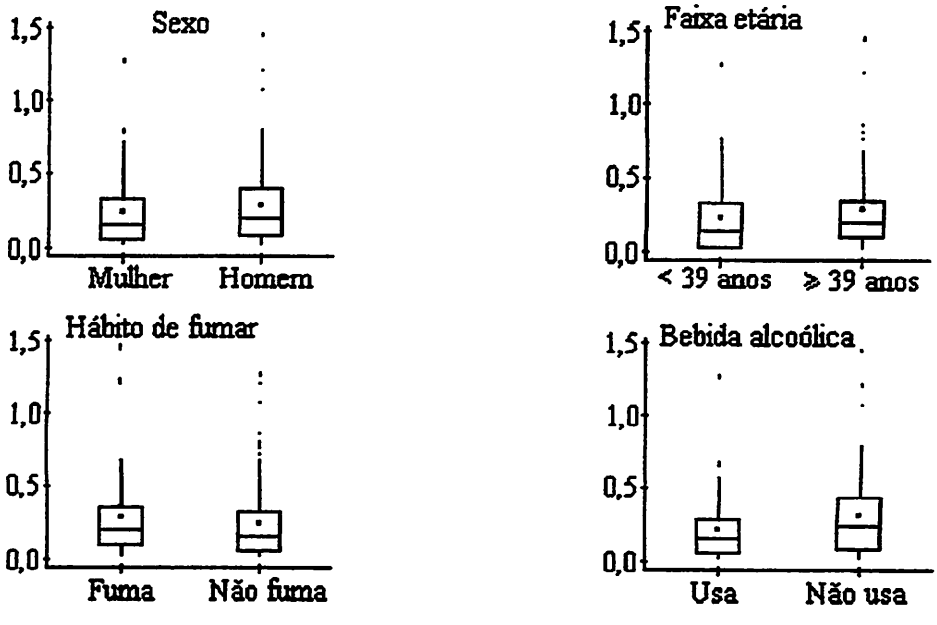


FIGURA 4: Box-Plot da concentração de AH em g/g de creatinina, segundo os fatores de estratificação: sexo, idade, hábito de fumar e uso de be bida alcoólica)

O teste qui-quadrado indica que, a 5% de significância, essas médias não diferem entre si: $\chi_c^2 = 0{,}023 < 15{,}507 = \chi^2_{8g.l.;5\%}$. Conforme 3.4.5, o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (Anexo 5) apresentou, para o nível de 5% de significância, os mesmos resultados, como mostra a Tabela 4.

TABELA 4 – Resultados do teste qui-quadrado para os subgrupos

Subgrupo:	Resultado:
Faixas etárias (< 39 anos e ≥ 39 anos)	$z_c = 0{,}86 < 1{,}96 = z_c$
Sexos	$z_c = 1{,}04 < 1{,}96 = z_c$
Hábito de fumar	$z_c = 1{,}24 < 1{,}96 = z_c$
Uso de bebida alcoólica	$z_c = 1{,}96 = 1{,}96 = z_c$

Caso houvesse significância para um dado fator estratificante, os seus subgrupos seriam tratados como amostras diferentes, para as quais seriam obtidos os parâmetros próprios.

4.4 Os valores e intervalos de referência

As estimativas de valores e intervalos de referência de interesse, para o AH na região de Alfenas, são:

tamanho da amostra: 181

intervalo de referência ($\overline{x} \pm \sigma$): ..... 0,25 ± 0,26

mediana: 0,16

amplitude amostral: ..... (0,01; 1,45)

IC de 95% da média: ..... (0,21; 0,29)

limite superior de referência ($\overline{x} \pm 2\sigma$): 0,77

P95 (95º percentil): 0,74

4.4.1 Método não paramétrico

Alguns VR de interesse são estimados por procedimentos que não dependem do ajuste dos dados amostrais a qualquer distribuição clássica. É o caso do tamanho da amostra, da mediana, da amplitude amostral, do limite superior de referência e do 95º percentil. Mas, o Intervalo de referência não paramétrico ($\overline{x} \pm \sigma$) só deve ser usado quando os dados amostrais não forem descritos por nenhuma distribuição que mostre o comportamento sistemático da variável em estudo (no caso presente, a concentração do AH em g/g de creatinina).

A estimativa da média dos valores de concentração de AH foi de 0,25 g/g de creatinina, com um desvio padrão de 0,26 g/g de creatinina, evidenciando uma acentuada dispersão desses dados em torno da média, o que é óbvio considerando a não normalidade dos mesmos. Como os valores variaram de 0,01 a 1,45g/g de creatinina e a média está mais próxima do valor mínimo, então existe uma maior quantidade de dados com menores valores.

Os valores do L.S.R. e do 95º percentil estão muito próximos, indicando que, quando se obtém o L.S.R. em alguma avaliação clínica, os valores acima deste ocorrem com uma probabilidade de 5%.

4.4.2 Método paramétrico freqüentista

Como os dados se ajustam bem a uma distribuição exponencial, pode-se determinar o intervalo de 95% de confiança, obtendo-se, segundo 3.4.7:

$$0{,}21 \leq \frac{1}{\lambda} \leq 0{,}29.$$

Estratificando-se a amostra segundo os fatores: sexo, idade, hábito de fumar e uso de bebida alcoólica, foram obtidos os intervalos de 95% de confiança para as médias apresentadas na Tabela 5.

TABELA 5 – Estimativas dos limites inferiores e superiores das concentrações de ácido hipúrico (g/g de creatinina) a partir da distribuição expo nencial, para a amostra total e para os sub-grupos definidos por: sexo, idade, hábito de fumar e uso de bebida alcoólica.

AH		Amostra	Sexo		Idade		Tabagismo		Beb. alcoólica	
		Total	Fem.	Masc.	<39a	≥39a	Não	Sim	Não	Sim
Expon.	Li	0,21	0,19	0,22	0,20	0,20	0,20	0,21	0,18	0,24
	Ls	0,29	0,28	0,35	0,31	0,31	0,28	0,38	0,26	0,38

Nota-se que as maiores dispersões de valores, independente do método de estimação, estão nos subgrupos dos homens, dos fumantes e dos que usam bebidas alcoólicas, e as menores dispersões nos subgrupos dos não fumantes e dos que não usam bebidas alcoólicas. A Figura 5 visualiza esses intervalos.

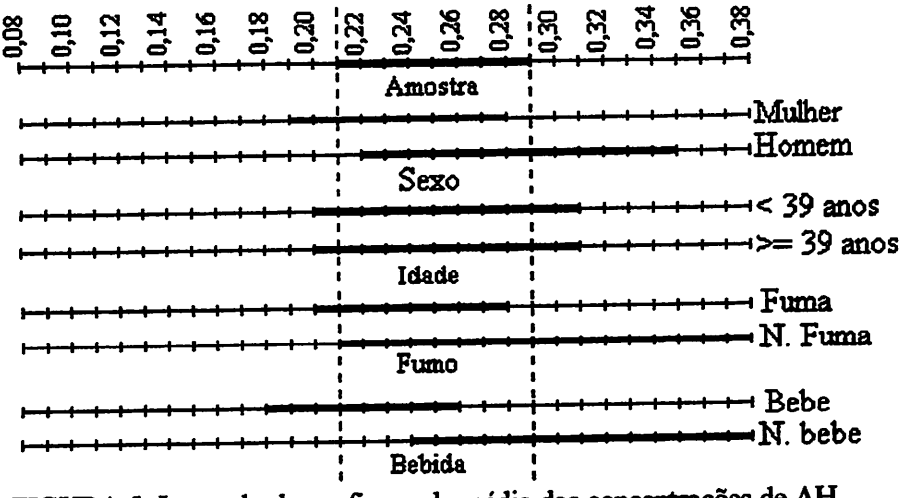


FIGURA 5: Intervalo de confiança da média das concentrações de AH (g/g de creatinina) para a amostra total e para os subgrupos: sexo, idade, hábito de fumar e uso de bebida alcoólica.

Mas, como agora o intervalo de confiança foi determinado com base numa distribuição definida, isto é, numa distribuição que mostra um comportamento sistemático da variável, pode-se inferir que, nas condições amostradas, ou seja, para a população saudável da região de Alfenas, não

exposta ocupacionalmente ao tolueno, a concentração de AH urinário deve estar no intervalo (0,21; 0,29) g/g de creatinina, com 5% de probabilidade de que uma pessoa de tal população tenha a sua concentração fora desse intervalo.

O Box-Plot, o teste qui-quadrado e o teste Wilcoxon-Mann-Whitney permitiram concluir que as diferenças nos estratos constituídos pelos fatores: sexo, idade, hábito de fumar e uso de bebida alcoólica, vistas em 4.3, não são significativas, isto é, são diferenças casuais e não persistentes. Logo, ao inferir sobre a população de referência, os estratos não devem ser considerados.

4.4.3 Método paramétrico com inferência bayesiana

Os intervalos de referência, obtidos a 5% de significância, utilizando os três tipos de priori, são mostrados na Tabela 12. Nota-se que as suas estimativas são bem próximas, sem diferenças marcantes entre os procedimentos.

TABELA 12 – Intervalos de credibilidade para a concentração de AH obtidos das inferências bayesianas segundo os respectivos procedimentos.

Procedimento	Intervalo de credibilidade
Priori não informativa	(0,21; 0,29) g/g de creatinina
Priori não informativa com gama truncada	(0,19; 0,33) g/g de creatinina
Priori informativa com gama (b = 3; a = 2)	(0,20; 0,35) g/g de creatinina

Por fim, foram gerados 10.000 valores da marginal e obtendo-se os intervalos de HPD baseados nos quantis, na média, na mediana, na moda, no erro de Monte Carlo, pelo BOA (*bayesiana output analise* = pacote do software "R") (Anexo 7). As estimativas para os intervalos de HPD dos três métodos anteriores estão apresentadas na Tabela 13.

Observe-se ainda que os parâmetros obtidos mantiveram-se dentro da faixa experimental, mas a amplitude dos intervalos aumentou, o que é justificado pela acentuada assimetria indicada na Tabela 2 (2,002168).

TABELA 13 – Intervalos de credibilidade para a concentração de AH obtidos das inferências bayesiana segundo os respectivos procedimentos baseados nos quantis, na média, na mediana, na moda, no erro de Monte Carlo e na HPD, pelo BOA.

Procedimento	Intervalo de credibilidade
Priori não informativa	(0,21; 0,29) g/g de creatinina
Priori não informativa com gama truncada	(0,19; 0,33) g/g de creatinina
Priori informativa com gama (b = 3; a = 2)	(0,20; 0,35) g/g de creatinina

O fato da concentração média de AH (≅ 0,25 g/g de creatinina) ser discretamente inferior ao da região metropolitana de Belo Horizonte (0,42 g/g de creatinina, segundo Alvarez-Leite, 1998), e dos trabalhos realizados em outros países (0,5 g/g de creatinina, segundo Apostoli, 1994) é satisfatoriamente justificado pelas condições ambientais da região de Alfenas, descritas no Anexo 1.

Considerando que os fatores de estratificação (sexo, faixa etária, hábito de fumar e uso de bebida alcoólica) não tiveram efeitos significativos sobre a concentração do AH urinário, os valores (L.S.R.) e intervalos de referência para a população da região de Alfenas, não exposta ocupacionalmente ao tolueno, segundo o método de obtenção, são os da Tabela 14.

TABELA 14 – Estimativas do intervalo e do limite superior de referência para a população da região de Alfenas, não exposta ocupacionalmente ao tolueno, segundo o método de obtenção, em g/g de creatinina.

Método	Intervalo de referência	L.S.R.
Não paramétrico	[0,00; 0,51)	0,76
Exponencial	(0,21; 0,29)	0,76
Com inferência bayesiana	(0,19; 0,33)	0,76

Como os valores e os intervalos obtidos pela inferência bayesiana foram afetados pela assimetria, os resultados da distribuição exponencial são mais representativos, devendo ser assumidos para essa população de referência.

5 CONCLUSÕES

A contribuição deste trabalho foi mostrar que procedimentos diferentes para determinar valores de referência podem conduzir a resultados significativamente diferentes, o que, aliás, não se restringe ao objetivo específico desse trabalho.

Mesmo com o respeito devido aos pesquisadores expertos, no que se refere ao direito de escolher o procedimento que julguem mais conveniente, é indiscutível o asserto de que, para cada situação, existe sempre um procedimento mais indicado, mormente quando a distribuição dos dados amostrados se ajusta adequadamente a uma distribuição clássica.

Podem ser encontradas na literatura determinações confiáveis de valores de referência, criteriosamente feitas, sem o uso de uma análise estatística acurada. Isso pode ser aceito, mas não pode endossar o procedimento como uma norma.

Assim, o método não paramétrico só deve ser usado se os dados da amostra não se ajustam a nenhuma distribuição clássica. O paramétrico é, quase sempre, o mais indicado. A inferência bayesiana conduz a resultados mais confiáveis desde que, satisfeitas as pressuposições, encontre-se uma priori significativa.

Os valores da concentração do ácido hipúrico para a região de Alfenas, MG, variam de 0,01 a 1,45 em pessoas sadias e não expostas ocupacionalmente ao tolueno.

Os valores da concentração do ácido hipúrico, em g/g de creatinina, ajustam-se a uma distribuição exponencial.

O valor médio é de 0,25 g/g de creatinina. O limite inferior do intervalo de confiança para os valores de referência do AH é 0,21 g/g de creatinina e o limite superior é de 0,29g/g de creatinina.

O limite superior de referência é 0,76 g/g de creatinina. Indivíduos com valores acima de 0,76g/g de creatinina são considerados suspeitos de exposição.

Os fatores de estratificação: sexo, idade, tabagismo e uso de bebida alcoólica não afetam significativamente as concentrações do ácido hipúrico para essa população.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITIO, A. Biological monitoring today and tomorrow. **Scandinavian Journal Work Environmental & Health,** Helsinki, v. 20, p.46-58, 1994.

ALESSIO, L. Reference values for the study of low doses of metals. **Internatuional Archives Occupational and Environmental Health,** Lodz, v. 65, p. S23-S27, 1993.

ALESSIO, L.; APOSTOLI, P.; MINOIA, C.; SABBIONI, E. Proceedings of the workshop "From macro to microdoses: reference values for toxic metals". Monticelli Brusati, Brescia. **Science of the Total Environmental,** Amsterdam, v. 120, p. 13-15, June 1990.

ALVAREZ-LEITE, E. M. et al. Determination of urinary hippuric acid by gas-chromatography after derivatization with trimethylphenylamonium hydroxide. **Toxirama,** v. 6, p.3-6, 1994.

ALVAREZ-LEITE, E. M. et al. Valores de referência do ácido hipúrico na região metropolitana de Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Analises Clínicas,** Rio de Janeiro, v. 30, p. 188-190, 1998.

APOSTOLI, P. Reference values for xenobiotics in biological matrixes: the state of the art. G Italia. **Medicina del Lavoro,** Milano, v. 16, n. 1, p. 19-24, 1994.

BERLIN, A.; SCHALLER, K. H. European standardized method for the determination of (5-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. **Zeistschrift fur Klinnische Chemmie und Klininsch Biochemie,** Berlin, v. 12, n. 8, p. 389-390, 1974.

BEZENER, P. D. et al. Determining reference "normal" limits in medicine: na application. **Statistics in Medicine,** Amsterdan, v. 2, n. 2, p. 191-198, Feb. 1983.

BOX, G. E. P.; TIAO, G. C. **Bayesian influence in statistical analysis.** New York: John Wiley & Sons, 1992. 588 p.

BRASIL. Ministério do Trabalho. Portaria no. 24, Norma Regulamentadora nº 7. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 21278-9, 1994.

BURATTI, M. Problemi di interpretazione degli esami biologici. **Italia Medicine Del Lavoro,** Milano, v. 69, n. 1, p. 91-93, 1978.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística.** São Paulo: Edgard Blücher, 1977.

DYBAER, R. The theory of reference values, part.6. **Clinical Chimsts Acta,** Amsterdan, v. 127, p. 441F-448F, 1983.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows® versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programas e Resumos . . .** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FERREIRA, D. F. **Análise multivariada.** Lavras: UFLA, 2003. Apostila.

GERGES, S. N. Y. **Os efeitos nocivos da combinação "Ruído + Tolueno",** Florianópolis: Revista Acústica & Vibrações, Sociedade Brasileira de Acústica/UFSC, 1993.

HARRIS, E. K. et al. **Statistical bases of reference values in laboratory medicine.** Virginia: Marcel Dekker, 1995.

INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHIMISTS - IFCC. The theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the procedure of reference values. **Clinical Chimists Acta,** Amsterdam, v. 139, p. 205F-213F, 1984.

KIRA, S. Measurement by gas-chromatography of urinary hippuric acid and methyl hippuric acid as indices of toluene and xylene exposures. **British Journal Industrial Medicine,** London, v. 34, n. 4, p. 305-309, 1977.

KUCERA, J.; BENCKO, V.; SABBIONI, E.; VANDERVENNE, M. T. Review of trace element in blood, serum and urine in Czech and Slovak population and critical evaluation of their possible use as reference values. **Science Total Environmental,** Amsterdam, v. 66, n. 1/3, p. 211-234, Apr. 1995.

MOOD, A.M. et al. **Introduction to the theory of statistic**. Irvine, Califórnia: McGraw-Hill Kogakusha, 1974.

MORETTIN, P. A. et al. **Estatística básica**. São Paulo: Saraiva, 2003.

MORRISON, D. F. **Multivariate statistical methods.** 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1976. 307 p.

NATIONAL INSTITUTE OF OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. **Criteria for a recommended standard-occupational exposure to toluene.** Rockville: National Institute of Occupational Safety and Health, 1978. (TRO4073. HSM 9972118).

ODONE, P. et al. **Limiti di referimento:** presupposto indispensabile al monitogaggio biológico. Milão: Franco Angeli, 1988. p.163-173.

OLIVEIRA, M. S. et al. **Estatística básica**. Lavras: UFLA, 2003. 300 p.

ONG, C. N. Reference values and action levels of biological monitoring in occupational exposure. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 108, n. 2/3, p.127-135, Sept. 1999.

PETITCLEAR, C.; WILDING, P. The theory of reference values. **Clinical Chimists Acta**, Amsterdam, v. 139, p. 205f - 213f, 1984.

SAS®INSTITUTE. **SAS Procedures guide for computers**. 6. ed. Cary, NC, 1999. v. 3, 373 p.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (Complete sample). **Biometrika**, London, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, Dec. 1965

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica** para as ciências do comportamento. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1995.

ANEXOS

Anexo — Página

Anexo 1: A região de Alfenas 44

Anexo 2: Protocolo toxicológico 46

Anexo 3: Resultados laboratoriais 50

Anexo 4: O método analítico 56

Anexo 5: Normalidade, ajustamento 58

Anexo 6: Teste de Wilcoxon-Mann-Witney para os subgrupos 60

Anexo 7: Análise bayesiana 64

Anexo 1

ALFENAS

Alfenas é uma das dez maiores cidades da Região III – Sul – estado de Minas Gerais. Situa-se nos limites meridionais da zona intertropical, com latitude 21°25'45" S e longitude 45°56'50" W, sob influência da elevada altitude da região, com clima úmido, do tipo tropical mesotérmico. A sua temperatura média anual é de 20,8ºC, com média máxima anual de 26,5ºC e média mínima anual de 14,1ºC. Nos períodos de ação de intensas massas de ar de origem polar, a temperatura chega a um mínimo de 9ºC. A precipitação média anual é de, aproximadamente, 1500 milímetros. Tem altitude média de 849,2m.

O seu relevo, modelado em rochas cristalinas, constitui superfície elevada, caracterizada por sucessão de morros e garupas que descem da alta superfície de Poços de Caldas na direção das calhas do Rio Grande e do Rio Sapucaí, em níveis que variam de 800 a 1000 metros. O Vale do Rio Sapucaí (da Bacia do Rio Paraná) e de alguns de seus afluentes foram inundados pelo Reservatório de Furnas, que circunda a município, exceto pelo limite Sul.

Assentada numa planície, sem elevações significativas nos seus arredores, Alfenas é varrida constantemente por uma brisa suave (Vento do Sul), que despolui a sua atmosfera. Tem um tráfego de veículos moderado e o seu Distrito Industrial é situado fora do perímetro urbano, próximo à bacia de Furnas, para onde o vento conduz toda possível poluição oriunda das fábricas.

A cidade é bastante arborizada, com predominância da sibipiruna (Caesalpinia peltophoroides) e outras espécies frondosas que lhe garantem ser encimada por ar puro, inalterável sob a ação de poluentes de intensidade pequena ou média.

Dados do IBGE relativos ao município levantados pelo último recenceamento:

População

urbana: 72 700 rural: 8 300 total: 81 000

Estabelecimentos

Comerciais	Número
Lojas	80
Materiais de construção	43
Agropecuário	8
Feiras livres	2
Mercado municipal	1
Supermercados	29
Sacolões	2
Ambulantes registrados	18
Feiras pequenas	1
Mercearias	258
Revendoras de veículos	7
Total	449

Industriais	Número
Couro/artefatos	5
Metalúrgico	21
Química	3
Mineração	1
Louças/vidros	6
Embalagens	6
Gráficas	9
Madeiras/artefatos	18
Agropecuária	8
Têxtil	16
Outras	80
Total	157

Atividade agrícola

Produto	Área/Rebanho	Produtividade	Produção
Milho	5 500 ha	4 500 kg/ha	24 750 t
Arroz	110 ha	2 000 kg/ha	220 t
Feijão águas	1 000 ha	600 kg/ha	600 t
Feijão seca	2 000 ha	900 kg/ha	1 800 t
Café	7 700 ha	15 sc/ha	115 500 sc
Cana	2 160 ha	76 t/ha	164 160 t
Laranja	2 224 ha	600 cx/ha	1 334 400 cx.
Batata	700 ha	35 000 kg/ha	490 000 sc.
Mandioquinha	57 ha	12 000 kg/ha	684 t
Oleicultura	192 ha	20 000 kg/ha	3840 t
Bovinocultura	8 500 vacas/lactação	1 200 l/lac/ano	10 200 000 l
Psicultura	277 000 alevinos	6 000 kg/ha.	114 t

Anexo 2

PROTOCOLO TOXICOLÓGICO

A) DADOS SOBRE AMOSTRAGEM

Data da Coleta:___/___/_____ Hora da Coleta: _____

Volume de urina coletado: _____ Densidade da urina: _____

B) INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome: _____

Data de nascimento:___/___/_____ Peso: _____ kg Altura: _____ m

Endereço: _____

Local de trabalho: _____

Profissão: _____

Até que série você estudou? _____

C) SOBRE O TRABALHO

1) Quantas horas trabalha por dia? _____

2) Quantas vezes por semana você usa solventes? _____

3) Quantas latas de tinta usa por semana? _____

4) Quantos galões de tíner usa por semana? _____

5) Há quanto tempo trabalha nesta atividade? _____

6) Tem algum outro emprego ou bico? ( ) sim ( ) não

O que faz? _____

7) Qual era sua profissão anterior? _____

8) Usa equipamento de proteção? ( ) sim ( ) não

Qual(is)? _____

D) HÁBITOS PESSOAIS E DIETA

1) Você é fumante? ( ) sim ( ) não

2) Quantos cigarros fuma por dia? _____.

3) Há quantos anos fuma? _____.

4) Fuma no local de trabalho? ( ) sim ( ) não

5) Há quanto tempo fumou seu último cigarro?_____.

6) Você costuma beber:

Refrigerante: ( ) sim ( ) não Quanto por dia? _____ copos.

Café: ( ) sim ( ) não Quanto por dia? _____ xícaras.

Chá: ( ) sim ( ) não Quanto por dia? _____ xícaras.

Cerveja: ( ) sim ( ) não Quanto por dia? _____ garrafas.

Pinga: ( ) sim ( ) não Quanto por dia? _____ doses.

7) Qual o tempo decorrido entre a última ingestão de refrigerante, bebida alcoólica e/ou café e a hora de coleta? _____.

8) Qual sua dieta normal? _____

_____

_____

9) Você costuma comer:

Conserva em lata ou vidro: ( ) sim ( ) não O que? _____.

Suco concentrado: ( ) sim ( ) não Qual? _____.

Algum molho (tomate, pimenta): ( ) sim ( ) não Qual? _____.

Queijo: ( ) sim ( ) não Qual? _____.

Frutas: ( ) sim ( ) não Quais? _____.

Mostarda e/ou Ketchup: ( ) sim ( ) não

10) Você usa produtos dietéticos (adoçante, refrigerante light)?

( ) sim ( ) não

11) Qual o tempo decorrido entre sua última refeição e a hora da coleta?

_____.

Você poderia citar quais são os alimentos e bebidas ingeridos na sua última refeição? _____

_____.

E) SOBRE A SAÚDE

1) Você tem dificuldades para se lembrar das coisas? ( ) sim ( ) não

2) Alguém já disse que você tem memória curta? ( ) sim ( ) não

3) Você costuma escrever as coisas que deve lembrar de fazer?

( ) sim ( ) não

4) Você costuma voltar para conferir coisas que fez, como trancar portas, desligar fogão? ( ) sim ( ) não

5) Você tem dificuldades para entender o que está lendo? ( ) sim ( ) não

6) Você tem dificuldade para se concentrar em algo que está fazendo?

( ) sim ( ) não

7) Você fica nervoso e irritado com muita facilidade? ( ) sim ( ) não

8) Você fica triste ou deprimido com certa freqüência? ( ) sim ( ) não

9) Você se cansa muito fácil, mesmo com pouco esforço físico?

( ) sim ( ) não

10) Você está menos interessado em sexo do que acha normal?

( ) sim ( ) não

11) Você tem batedeira do coração sem fazer esforço? ( ) sim ( ) não

12) Você, às vezes, sente o peito sufocado? ( ) sim ( ) não

13) Você transpira mesmo quando não está calor? ( ) sim ( ) não

14) Você tem dor de cabeça ao menos uma vez por semana?

( ) sim ( ) não

15) Você costuma ter formigamento em alguma parte do corpo?

( ) sim ( ) não

16) Você tem dificuldade para abotoar e desabotoar a roupa?

( ) sim ( ) não

17) Você já desmaiou? ( ) sim ( ) não

18) Já tomou remédio para desmaio? ( ) sim ( ) não

19) Alguém da família tem doença nervosa, ou desmaio? ( ) sim ( ) não

20) Você já sofreu algum acidente com pancada na cabeça? ( ) sim ( ) não

21) Você está tomando algum remédio? ( ) sim ( ) não

Qual? _____. Quantas vezes por dia?_____.

22) Você se machuca no serviço (cortes, martelada no dedo, deixar cair ferramentas)? ( ) raramente ( ) às vezes ( ) sempre se machuca

23) Você dorme bem, acorda descansado? ( ) sim ( ) não

24) A que horas você vai dormir? _____.

25) A que horas você acorda? _____.

26) Você acorda durante a noite? ( ) sim ( ) não

27) Você já notou alguma dificuldade para distinguir entre as cores?

amarelo e azul ( ) sim ( ) não

verde e vermelho ( ) sim ( ) não

28) Você sente algum incômodo quando está pintando? Marque com um (X) as respostas positivas: ( )tontura, ( )dor de cabeça, ( )a vista escurece, ( )gosto ruim na boca, ( )arde o nariz, ( )arde a garganta, ( )arde os olhos, ( )tosse. Alguma outra coisa? _____.

29) Você tem algum problema de saúde? Por exemplo: pressão alta, diabete, etc...Se sim, qual é? _____

_____.

30) Você já teve hepatite, cirrose ou alguma doença do fígado? ( ) sim ( ) não

Qual? _____.

Anexo 3

TABELA 1 – Características individuais, valores do ácido hipúrico e da creatinina urinários da amostra selecionada

Voluntário	Idade	Sexo	Hábito fumar	Uso bebida	AH (g/L)	Creatinina(g/L)	AH (g/g)
001	25	F	Não	Não	0,02	1,20	0,01
002	30	F	Sim	Sim	0,02	1,30	0,01
003	20	F	Não	Não	0,02	1,00	0,02
004	25	M	Não	Não	0,02	1,00	0,02
005	21	F	Não	Sim	0,02	1,00	0,02
006	47	F	Não	Não	0,02	0,90	0,02
007	36	F	Não	Sim	0,10	0,90	0,11
008	27	F	Sim	Sim	0,04	1,00	0,04
009	37	F	Sim	Não	0,14	1,00	0,14
010	65	F	Não	Sim	0,08	1,00	0,08
011	26	M	Não	Sim	0,32	1,20	0,27
012	60	F	Sim	Não	0,48	1,00	0,48
013	38	F	Não	Não	0,35	0,90	0,39
014	77	F	Sim	Não	0,10	1,10	0,09
015	80	M	Não	Não	0,24	1,20	0,20
016	20	F	Sim	Não	0,23	0,90	0,26
017	23	M	Não	Não	0,11	1,10	0,10
018	20	M	Não	Não	0,16	1,00	0,16
019	46	F	Não	Não	0,33	1,00	0,33
020	24	M	Não	Não	0,15	1,20	0,13
021	22	M	Não	Não	0,14	1,10	0,13
022	40	F	Não	Não	0,12	1,10	0,11
023	18	F	Não	Não	0,41	1,00	0,41
024	23	M	Não	Não	0,02	1,30	0,01
025	42	F	Não	Não	0,35	0,90	0,39
026	44	F	Não	Não	0,22	1,10	0,20
027	19	F	Não	Não	0,15	1,10	0,14
028	21	F	Não	Não	0,10	1,10	0,09
029	18	F	Não	Não	0,09	1,00	0,09
030	46	M	Não	Sim	0,28	1,10	0,25

...continua

TABELA 1 – continuação

Voluntário	Idade	Sexo	Hábito fumar	Uso bebida	AH (g/L)	Creatinina(g/L)	AH (g/g)
031	35	F	Não	Não	0,02	1,00	0,02
032	40	F	Não	Não	0,13	1,10	0,12
033	41	F	Não	Não	0,25	1,00	0,25
034	38	F	Não	Não	0,16	1,20	0,13
035	23	F	Não	Não	0,03	0,90	0,03
036	29	F	Não	Não	0,02	1,10	0,01
037	33	M	Não	Sim	0,07	0,90	0,08
038	23	F	Sim	Sim	0,16	1,00	0,16
039	32	M	Sim	Sim	0,61	1,00	0,61
040	30	M	Não	Sim	1,20	1,00	1,20
041	67	F	Não	Não	0,45	0,90	0,50
042	43	F	Sim	Sim	0,02	0,80	0,02
043	20	F	Não	Não	0,12	0,80	0,15
044	37	F	Não	Não	0,15	1,00	0,15
045	24	F	Não	Não	0,64	1,00	0,64
046	40	M	Não	Sim	0,23	1,00	0,23
047	42	F	Não	Sim	0,11	0,90	0,12
048	36	F	Não	Sim	0,18	0,90	0,20
049	44	M	Sim	Não	0,02	1,10	0,01
050	37	F	Sim	Sim	0,02	1,00	0,02
051	47	F	Não	Não	0,18	0,90	0,20
052	56	M	Não	Não	0,02	1,00	0,02
053	35	F	Sim	Sim	0,27	0,80	0,34
054	24	M	Não	Não	0,73	1,10	0,66
055	35	F	Não	Não	0,09	1,30	0,07
056	35	F	Não	Não	0,17	1,20	0,14
057	32	F	Não	Não	0,02	1,00	0,02
058	27	F	Não	Não	0,23	1,00	0,23
059	48	M	Não	Sim	0,02	1,40	0,01
060	45	F	Sim	Sim	0,20	1,10	0,18
061	45	F	Não	Não	0,33	1,30	0,25
062	24	F	Sim	Não	0,37	1,10	0,34
063	25	F	Não	Não	0,05	1,20	0,04
064	62	F	Sim	Sim	0,17	1,20	0,14
065	28	M	Não	Não	0,02	1,40	0,01
066	36	M	Não	Sim	0,02	0,90	0,02

...continua

TABELA 1 – continuação

Voluntário	Idade	Sexo	Hábito fumar	Uso bebida	AH (g/L)	Creatinina(g/L)	AH (g/g)
067	47	M	Não	Sim	0,02	0,90	0,02
068	48	M	Não	Sim	0,31	1,00	0,31
069	62	F	Não	Não	0,02	0,90	0,02
070	48	M	Sim	Sim	0,23	1,10	0,21
071	29	F	Não	Sim	0,19	0,80	0,24
072	40	F	Sim	Não	0,13	0,80	0,16
073	42	F	Não	Não	0,26	0,90	0,29
074	51	F	Não	Não	0,24	1,00	0,24
075	32	F	Não	Não	0,65	0,90	0,72
076	29	F	Não	Sim	0,51	0,90	0,57
077	23	F	Não	Não	1,14	0,90	1,27
078	51	M	Não	Sim	0,97	1,20	0,81
079	36	M	Não	Sim	0,43	1,00	0,43
080	27	F	Sim	Sim	0,31	0,90	0,34
081	61	F	Não	Não	0,02	1,10	0,01
082	33	F	Não	Não	0,37	1,00	0,37
083	46	F	Não	Não	0,02	0,80	0,02
084	36	M	Não	Sim	0,36	1,20	0,30
085	21	M	Não	Sim	0,14	1,10	0,13
086	39	F	Não	Não	0,25	1,00	0,25
087	24	F	Não	Não	0,06	0,90	0,07
088	74	F	Sim	Sim	0,16	0,80	0,20
089	36	F	Não	Não	0,33	0,80	0,41
090	34	M	Não	Não	0,21	1,10	0,19
091	54	M	Sim	Sim	0,45	1,10	0,41
092	54	F	Não	Não	0,26	0,80	0,33
093	60	M	Sim	Sim	0,07	1,00	0,07
094	58	F	Não	Não	0,11	0,90	0,12
095	67	F	Não	Não	0,15	0,90	0,17
096	50	F	Sim	Não	0,16	0,80	0,20
097	56	F	Não	Não	0,54	0,80	0,68
098	20	F	Não	Não	0,02	0,80	0,02
099	21	F	Não	Não	0,23	0,90	0,26
100	37	F	Não	Não	0,13	0,80	0,16
101	48	F	Não	Não	0,08	0,80	0,10
102	22	F	Não	Não	0,14	1,00	0,14

...continua

TABELA 1 – continuação

Voluntário	Idade	Sexo	Hábito fumar	Uso bebida	AH (g/L)	Creatinina(g/L)	AH (g/g)
103	23	F	Não	Não	0,02	0,90	0,02
104	36	M	Não	Sim	0,18	1,20	0,15
105	61	F	Não	Não	0,78	0,90	0,87
106	45	M	Sim	Não	0,39	1,00	0,39
107	50	F	Não	Não	0,54	1,00	0,54
108	46	F	Sim	Sim	0,85	0,70	1,21
109	68	F	Não	Sim	0,19	0,80	0,24
110	35	M	Não	Sim	0,38	1,00	0,38
111	55	M	Não	Não	0,05	1,00	0,05
112	39	F	Não	Não	0,02	0,90	0,02
113	55	F	Não	Não	0,14	0,90	0,16
114	65	F	Não	Não	0,10	1,00	0,10
115	22	F	Não	Não	0,02	1,00	0,02
116	23	F	Não	Não	0,02	1,10	0,01
117	24	M	Não	Sim	0,02	1,10	0,01
118	42	F	Não	Não	0,09	1,00	0,09
119	53	M	Não	Não	0,06	1,00	0,06
120	18	M	Não	Não	0,02	1,10	0,01
121	57	M	Não	Sim	0,21	1,20	0,18
122	23	M	Não	Sim	0,08	1,00	0,08
123	23	F	Não	Sim	0,02	1,20	0,01
124	25	F	Não	Sim	0,02	1,00	0,02
125	20	M	Sim	Não	0,12	1,00	0,12
126	57	M	Não	Sim	0,30	1,10	0,27
127	47	M	Sim	Sim	0,47	1,10	0,43
128	46	F	Não	Não	0,22	0,94	0,23
129	47	M	Sim	Sim	0,11	1,10	0,10
130	46	F	Sim	Não	0,14	0,94	0,15
131	23	F	Não	Sim	0,08	0,90	0,09
132	21	F	Não	Sim	0,63	0,80	0,79
133	29	F	Não	Sim	0,02	1,00	0,02
134	40	M	Sim	Sim	1,16	0,80	1,45
135	34	M	Não	Sim	0,07	1,20	0,06
136	30	M	Não	Sim	0,44	1,00	0,44
137	39	F	Não	Não	0,02	1,00	0,02
138	24	F	Não	Sim	0,04	1,00	0,04

...continua

TABELA 1 – continuação

Voluntário	Idade	Sexo	Hábito fumar	Uso bebida	AH (g/L)	Creatinina(g/L)	AH (g/g)
139	60	F	Não	Sim	0,09	0,94	0,10
140	40	M	Não	Sim	0,44	1,00	0,44
141	58	M	Sim	Sim	0,44	1,40	0,31
142	70	F	Não	Não	0,06	1,00	0,06
143	46	M	Não	Sim	0,69	1,40	0,49
144	61	M	Sim	Sim	0,05	1,40	0,04
145	40	F	Não	Não	0,58	1,00	0,58
146	19	M	Sim	Sim	0,69	1,00	0,69
147	47	M	Sim	Não	0,16	0,90	0,18
148	26	M	Não	Não	0,16	1,00	0,16
149	32	M	Sim	Sim	0,37	1,10	0,34
150	40	M	Sim	Sim	0,13	1,00	0,13
151	46	M	Sim	Sim	0,09	0,70	0,13
152	68	F	Não	Não	0,31	0,90	0,34
153	24	M	Não	Sim	0,46	1,00	0,46
154	24	F	Não	Sim	0,48	0,90	0,53
155	46	F	Não	Não	0,43	0,90	0,48
156	52	F	Não	Não	0,02	0,80	0,02
157	25	M	Não	Sim	0,86	0,80	1,08
158	54	M	Sim	Sim	0,63	1,00	0,63
159	26	F	Não	Não	0,16	0,70	0,23
160	48	F	Não	Não	0,69	0,90	0,77
161	39	M	Não	Não	0,04	0,90	0,04
162	51	M	Não	Não	0,17	0,82	0,21
163	37	M	Sim	Não	0,28	1,10	0,25
164	55	F	Não	Não	0,69	1,00	0,69
165	25	F	Não	Não	0,06	0,94	0,06
166	58	M	Não	Não	0,16	1,00	0,16
167	23	F	Não	Sim	0,16	0,94	0,17
168	53	F	Não	Sim	0,33	0,94	0,35
169	52	M	Não	Sim	0,50	1,00	0,50
170	58	M	Sim	Sim	0,08	1,00	0,08
171	66	M	Sim	Sim	0,46	0,80	0,58
172	37	M	Sim	Sim	0,22	0,80	0,28
173	39	M	Não	Não	0,33	1,20	0,28
174	61	F	Não	Não	0,25	0,80	0,31

...continua

TABELA 1 – continuação

Voluntário	Idade	Sexo	Hábito fumar	Uso bebida	AH (g/L)	Creatinina(g/L)	AH (g/g)
175	74	M	Não	Não	0,10	0,80	0,13
176	41	F	Sim	Não	0,03	0,60	0,05
177	38	M	Sim	Sim	0,02	0,90	0,02
178	46	M	Sim	Sim	0,21	0,90	0,23
179	40	F	Não	Não	0,08	0,80	0,10
180	52	F	Não	Não	0,18	0,60	0,30
181	26	F	Sim	Sim	0,30	0,90	0,33

Anexo 4

MÉTODO ANALÍTICO

– Transferir 0,5mL de urina para um tubo de vidro. Adicionar gotas de ácido clorídrico 6ml/L e 4 mL de acetato de etila;

– agitar por 1 minuto em agitador mecânico e transferir 3,5 mL da fase orgânica para um tubo de vidro;

– adicionar 200 mg de sulfato de sódio anidro, agitar e transferir 3 mL para um tubo de centrífuga;

– adicionar 0,5 mL de .solução metanólica de ácido heptadecanico e evaporar até resíduo em banho de água a 70°C, sob fluxo de nitrogênio;

– resfriar os tubos e adicionar 120 µL de agente metilante (hidróxido de trimetilfenilamôneo);

– agitar vigorosamente por 1 minuto (3000 rpm) e injetar 3 µL no aparelho CG;

– as curvas de calibração foram preparadas adicionando quantidades escaladas de ácido hipúrico na urina para obter 0,1, 0,2, 0,5, 0,8, 1,0, 1,2 e 1,5 concentrações de g/L (r = 0,9934);

– três calibradores foram utilizados diariamente (0,1, 0,5 e 1,0 g/L) junto com o conjunto das amostras a serem avaliadas;

– o limite da quantificação (LQ) para o ácido hipúrico na urina foi de 0,05 g/L;

– a precisão do conjunto foi determinada analisando as amostras que contêm 0,2, 1,0 e 1,5 g de ácido hipúrico por litro;

– o coeficiente de variação intraconjunto foi de 8,2% (10 amostras para cada concentração);

– o coeficiente de variação interconjunto foi de 10,2% (para a análise diária das amostras durante 10 dias);

– os resultados foram expressos em g de ácido hipúrico por g de creatinina urinária (kit da Merk);

– os dados referentes à validação analítica mostraram ser o método padronizado, adequado aos objetivos do presente trabalho, pois a grande maioria das amostras de urina analisadas apresentaram níveis de ácido hipúrico detectáveis por essa metodologia.

Anexo 5

Teste de normalidade feito por meio do SAS

Comandos:

```
data normal;input ah;
cards;
0.0125
0.0115
.....
.....
0.3000
0.3333
;
*proc print;run;quit;
proc univariate data=normal normal plot;
  var ah;
run;
```

Teste do χ^2 para aderência (ajustamento) pelo Excel (4.4.1)

a) Teste dos intervalos de referência ($\overline{X} \pm \sigma$), ou seja, simplesmente, teste das médias dos limites dos intervalos dos subgrupos:

H_0: $\overline{X}_T = \overline{X}_M = \overline{X}_H = \overline{X}_{<39} = \overline{X}_{\geq 39} = \overline{X}_{nF} = \overline{X}_F = \overline{X}_{nB} = \overline{X}_B$ contra

H_1: pelo menos duas médias são estatisticamente diferentes entre si.

x_o	x_e	Parcelas
0,25	0,25666667	0,00017316
0,26	0,25666667	4,329E-05
0,28	0,25666667	0,00212121
0,25	0,25666667	0,00017316
0,24	0,25666667	0,00108225
0,24	0,25666667	0,00108225
0,28	0,25666667	0,00212121
0,21	0,25666667	0,00848485
0,30	0,25666667	0,00731602

$$\chi_e^2 = \Sigma \frac{(x_o - x_e)^2}{x_e}$$

$\alpha \downarrow$	nº parc.	Parâmetros calculados	g.l.
5%	9	0	8
$\chi_e^2 = \downarrow$		$\chi_{5\%}^2 = \downarrow$	
0,023	<	15,507	

Conclusão: Aceita-se H_0:

Os intervalos não são diferentes.

Com igual procedimento tem-se:

b) Teste das medianas:

H_0: $Med_T = Med_M = Med_H = Med_{<39} = Med_{\geq 39} = Med_{nF} = Med_F = Med_{nB} = Med_B$

contra H_1: pelo menos duas medianas são estatisticamente diferentes entre si.

$\chi_e^2 = 0,039 < 15,507 = \chi_{5\%}^2$ ∴ Aceita-se H_0: As medianas não são diferentes.

c) Teste dos intervalos de confiança pelas respectivas médias.

H_0: $IC_T = IC_M = IC_H = IC_{<39} = IC_{\geq 39} = IC_{nF} = IC_F = IC_{nB} = IC_B$ contra

H_1: pelo menos dois IC são estatisticamente diferentes entre si.

$\chi_e^2 = 0,026 < 15,507 = \chi_{5\%}^2$ ∴ Aceita-se H_0: Os ICs não são diferentes.

d) Teste dos limites superiores de referência (L.S.R.).

H_0: $LSR_T = LSR_M = LSR_H = LSR_{<39} = LSR_{\geq 39} = LSR_{nF} = LSR_F = LSR_{nB} = LSR_B$

contra H_1: pelo menos dois LSR são estatisticamente diferentes entre si.

$\chi_e^2 = 0,060 < 15,507 = \chi_{5\%}^2$ ∴ Aceita-se H_0: Os L.S.R.s não são diferentes.

e) Teste dos 95^{os} percentis (P95).

H_0: $P95_T = P95_M = P95_H = P95_{<39} = P95_{\geq 39} = P95_{nF} = P95_F = P95_{nB} = P95_B$ contra

H_1: pelo menos dois percentis são estatisticamente diferentes entre si.

$\chi_e^2 = 0,235 < 15,507 = \chi_{5\%}^2$ ∴ Aceita-se H_0: Os P95s não são diferentes.

Anexo 6

Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney

I) Teste para as faixas etárias:

	< 39	≥ 39				Postos:	< 39	≥ 39	α =
01	0,011	0,012	0,0107	02	002	001,5	001,5	003,5	0,05
02	0,011	0,013	0,0115	02	004	003,5	001,5	005,5	T < 39 =
03	0,012	0,014	0,0125	02	006	005,5	003,5	009,5	7794,5
04	0,013	0,014	0,0136	06	012	009,5	005,5	009,5	T ≥ 39=
05	0,014	0,014	0,0150	11	023	018,0	009,5	009,5	8676,5
06	0,014	0,014	0,0167	06	029	026,5	009,5	009,5	μ(u<39)= μ(u≥39)=
07	0,015	0,015	0,0188	04	033	031,5	018,0	018,0	4094
08	0,015	0,015	0,0333	01	034	034,0	018,0	018,0	σ(u<39)= σ(u≥39)=
09	0,015	0,017	0,0357	01	035	035,0	018,0	026,5	352,398449
10	0,015	0,017	0,0400	02	037	036,5	018,0	026,5	μ < 39 =
11	0,015	0,017	0,0417	01	038	038,0	018,0	026,5	4398,5
12	0,015	0,036	0,0444	01	039	039,0	018,0	035,0	μ ≥ 39=
13	0,015	0,040	0,0500	02	041	040,5	018,0	036,5	3789,5
14	0,015	0,042	0,0583	01	042	042,0	018,0	038,0	Ze =
15	0,015	0,044	0,0600	02	044	043,5	018,0	039,0	0,86
16	0,017	0,050	0,0638	01	045	045,0	026,5	040,5	zc =
17	0,017	0,058	0,0667	01	046	046,0	026,5	042,0	1,96
18	0,017	0,060	0,0692	01	047	047,0	026,5	043,5	
19	0,019	0,067	0,0700	01	048	048,0	031,5	046,0	Aceita-se Ho
20	0,019	0,069	0,0778	01	049	049,0	031,5	047,0	
21	0,019	0,070	0,0800	03	052	051,0	031,5	048,0	< 39 e ≥ 39 vêm de
22	0,019	0,080	0,0889	01	053	053,0	031,5	051,0	Populações:
23	0,033	0,090	0,0900	02	055	054,5	034,0	054,5	Idênticas
24	0,040	0,091	0,0909	02	057	056,5	036,5	056,5	
25	0,050	0,091	0,0957	01	058	058,0	040,5	056,5	Teste de
26	0,060	0,096	0,1000	05	063	061,0	043,5	058,0	Wilcoxon
27	0,064	0,100	0,1091	01	064	064,0	045,0	061,0	Mann-Whitney

28	0,078	0,100	0,1111	01	065	065,0	049,0	061,0	
29	0,080	0,100	0,1182	01	066	066,0	051,0	061,0	
30	0,080	0,120	0,1200	01	067	067,0	051,0	067,0	
31	0,089	0,122	0,1222	02	069	068,5	053,0	068,5	
32	0,090	0,129	0,1250	02	071	070,5	054,5	074,0	
33	0,100	0,130	0,1273	02	073	072,5	061,0	075,0	
34	0,100	0,140	0,1286	01	074	074,0	061,0	078,5	
35	0,109	0,142	0,1300	01	075	075,0	064,0	080,5	
36	0,111	0,150	0,1333	01	076	076,0	065,0	084,0	
37	0,118	0,150	0,1364	01	077	077,0	066,0	084,0	
38	0,122	0,150	0,1400	02	079	078,5	068,5	084,0	
39	0,125	0,156	0,1417	02	081	080,5	070,5	086,0	
40	0,125	0,160	0,1489	01	082	082,0	070,5	088,5	
41	0,127	0,160	0,1500	03	085	084,0	072,5	088,5	
42	0,127	0,160	0,1556	01	086	086,0	072,5	088,5	
43	0,133	0,163	0,1600	04	090	088,5	076,0	091,5	
44	0,136	0,170	0,1625	02	092	091,5	077,0	094,0	
45	0,140	0,175	0,1667	01	093	093,0	078,5	095,0	
46	0,142	0,178	0,1702	01	094	094,0	080,5	096,0	
47	0,149	0,182	0,1750	01	095	095,0	082,0	097,0	
48	0,160	0,191	0,1778	01	096	096,0	088,5	098,0	
49	0,163	0,200	0,1818	01	097	097,0	091,5	101,5	
50	0,167	0,200	0,1909	01	098	098,0	093,0	101,5	
51	0,200	0,200	0,2000	06	104	101,5	101,5	101,5	
52	0,230	0,200	0,2073	01	105	105,0	108,5	101,5	
53	0,233	0,200	0,2091	01	106	106,0	110,0	101,5	
54	0,238	0,207	0,2286	01	107	107,0	112,5	105,0	
55	0,250	0,209	0,2300	02	109	108,5	115,5	106,0	
56	0,250	0,229	0,2333	01	110	110,0	115,5	107,0	
57	0,254	0,230	0,2340	01	111	111,0	117,0	108,5	
58	0,255	0,234	0,2375	02	113	112,5	118,5	111,0	
59	0,256	0,238	0,2400	01	114	114,0	120,5	112,5	
60	0,267	0,240	0,2500	02	116	115,5	123,0	114,0	
61	0,289	0,255	0,2538	01	117	117,0	127,0	118,5	

62	0,300	0,256	0,2545	02	119	118,5	128,5	120,5	
63	0,313	0,260	0,2556	02	121	120,5	131,0	122,0	
64	0,314	0,273	0,2600	01	122	122,0	132,0	124,0	
65	0,325	0,275	0,2667	01	123	123,0	133,0	125,5	
66	0,330	0,275	0,2727	01	124	124,0	134,0	125,5	
67	0,333	0,300	0,2750	02	126	125,5	135,0	128,5	
68	0,336	0,310	0,2889	01	127	127,0	136,5	130,0	
69	0,338	0,336	0,3000	02	129	128,5	138,0	136,5	
70	0,389	0,344	0,3100	01	130	130,0	144,5	139,5	
71	0,410	0,344	0,3125	01	131	131,0	148,0	139,5	
72	0,413	0,351	0,3143	01	132	132,0	149,0	141,0	
73	0,427	0,370	0,3250	01	133	133,0	150,0	142,0	
74	0,430	0,380	0,3300	01	134	134,0	151,0	143,0	
75	0,478	0,389	0,3333	01	135	135,0	155,0	144,5	
76	0,480	0,390	0,3364	02	137	136,5	156,0	146,0	
77	0,493	0,409	0,3375	01	138	138,0	157,0	147,0	
78	0,533	0,440	0,3444	02	140	139,5	160,0	152,5	
79	0,567	0,440	0,3511	01	141	141,0	162,0	152,5	
80	0,630	0,460	0,3700	01	142	142,0	166,0	154,0	
81	0,664	0,500	0,3800	01	143	143,0	168,0	158,5	
82	0,675	0,500	0,3889	02	145	144,5	169,0	158,5	
83	0,690	0,540	0,3900	01	146	146,0	170,5	161,0	
84	0,767	0,575	0,4091	01	147	147,0	173,0	163,0	
85	0,788	0,580	0,4100	01	148	148,0	174,0	164,0	
86	0,808	0,610	0,4125	01	149	149,0	175,0	165,0	
87	1,075	0,640	0,4273	01	150	150,0	177,0	167,0	
88	1,200	0,690	0,4300	01	151	151,0	178,0	170,5	
89	1,214	0,722	0,4400	02	153	152,5	179,0	172,0	
90		0,867	0,4600	01	154	154,0		176,0	
91		1,267	0,4778	01	155	155,0		180,0	
92		1,450	0,4800	01	156	156,0		181,0	
93			0,4929	01	157	157,0			
94			0,5000	02	159	158,5			
95			0,5333	01	160	160,0			

96			0,5400	01	161	161,0			
97			0,5667	01	162	162,0			
98			0,5750	01	163	163,0			
99			0,5800	01	164	164,0			
100			0,6100	01	165	165,0			
101			0,6300	01	166	166,0			
102			0,6400	01	167	167,0			
103			0,6636	01	168	168,0			
104			0,6750	01	169	169,0			
105			0,6900	02	171	170,5			
106			0,7222	01	172	172,0			
107			0,7667	01	173	173,0			
108			0,7875	01	174	174,0			
109			0,8083	01	175	175,0			
110			0,8667	01	176	176,0			
111			1,0750	01	177	177,0			
112			1,2000	01	178	178,0			
113			1,2143	01	179	179,0			
114			1,2667	01	180	180,0			
115			1,4500	01	181	181,0			

II) Teste para os sexos:

Com igual procedimento tem-se $z_e = 1,04 < 1,96 = z_c$. Logo, homens e mulheres não vêm de populações distintas quanto à concentração urinária de AH, isto é, não constituem estratos distintos.

III) Teste para fumantes e não fumantes:

Do mesmo modo se obtém $z_e = 1,24 < 1,96 = z_c$, não constituindo, fumantes e não fumantes, estratos distintos.

IV) Testes para usuários e não usuários de bebidas alcoólicas:

Ainda aqui tem-se $z_e = 1,96 = 1,96 = z_c$, não podendo, assim, rejeitar H_o e não tendo, conseqüentemente, justificativa para estratificar a população.

Anexo 7

Análise bayesiana

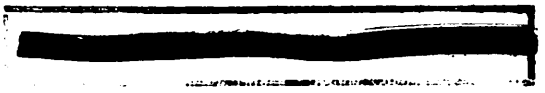
Comandos:

```
/* para dados exponenciais com priori constante */
proc iml;
inter=10000;
y={0.0125, 0.011538462, 0.015,.....0.1, 0.3, 0.333333333};

x=j(inter,3,0);
soma=sum(y);
n=nrow(y);
b=3;
a=2;

do i=1 to inter;
 beta1=soma;
 alpha1=n+1;

 /**** bayes 1 *****/
 x[i,1]=rangam(0,beta1)/alpha1;

 /**** bayes 2 *****/
 j=1;
  do while(j < 2);
   z=rangam(0,beta1)/alpha1;
```

```
  if (z>=0.01) & (z<=2.5) then do;
    x[i,2]=z;
    j=2;
  end;
   else j=1;
 end;

/**** bayes 3 *****/
 beta2=soma+b;
 alpha2=n+a;
 x[i,3]=rangam(0,beta2)/alpha2;
end;

create dados var {x1 x2 x3};
append from x;
quit;

proc print data=dados;
 var x1 x2 x3;
run;quir;

proc univariate data=dados plot;
 var x1 x2 x3;
run;quit;
```

Resultados:

Univariate Procedure

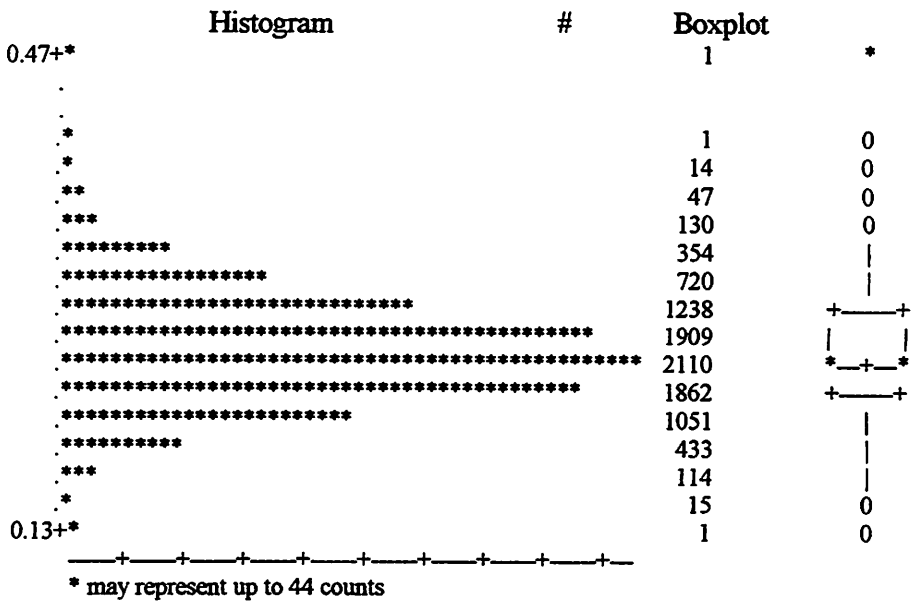


Variable = X1

Moments				Quantiles (Def = 5)	
N	10000	Sum Wgts	10000	100% Max 0.46171	99% 0.351185
Mean	0.256381	Sum	2563.81	75% Q3 . 0.280036	95% 0.321682
Std Dev	0.037541	Variance	0.001409	50% Med 0.254269	90% 0.306464
Skewness	0.311818	Kurtosis	0.177703	25% Q1 . 0.230263	10% 0.210054
USS	671.4039	CSS	14.09181	0% Min .. 0.132839	5% .. 0.197727
CV	14.64264	Std Mean	0.000375		1% .. 0.176624
T:Mean=0	682.9371	Pr>|T|	0.0001	Range 0.328872	
Num ^= 0	10000	Num > 0	10000	Q3-Q1 ... 0.049772	
M(Sign)	5000	Pr>=|M|	0.0001	Mode 0.132839	
Sgn Rank	25002500	Pr>=|S|	0.0001		

Extremes

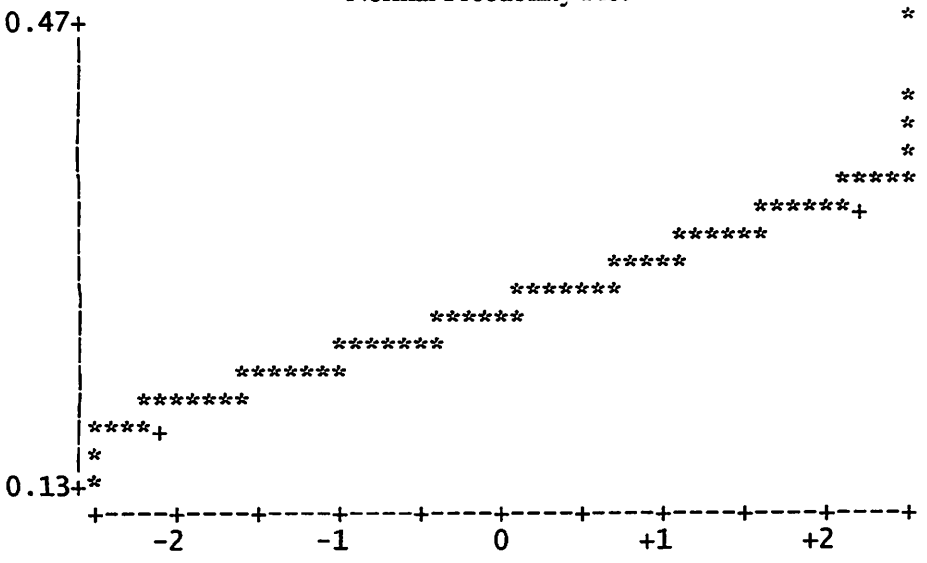
Lowest	Obs	Highest	Obs
0.132839	(9842)	0.392103	(2069)
0.14442	(2050)	0.393473	(1918)
0.146669	(3945)	0.398628	(6639)
0.147511	(5576)	0.414846	(560)
0.149102	(3299)	0.461712	(5831)



Univariate Procedure

Variable = X1

Normal Probability Plot



Univariate Procedure

Variable = X2

Moments

N	10000	Sum Wgts	10000
Mean	0.256303	Sum	2563.03
Std Dev	0.037324	Variance	0.001393
Skewness	0.337257	Kurtosis	0.182176
USS	670.8421	CSS	13.9296
CV	14.56255	Std Mean	0.000373
T:Mean=0	686.6931	Pr>|T|	0.0001
Num ^= 0	10000	Num > 0	10000
M(Sign)	5000	Pr>=|M|	0.0001
Sgn Rank	25002500	Pr>=|S|	0.0001

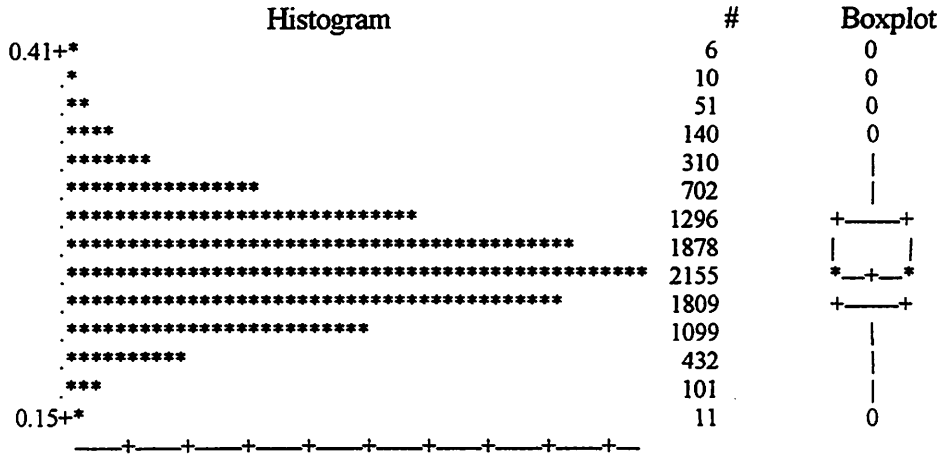
Quantiles (Def = 5)

100% Max	0.41990	99%	0.352355
75% Q3	0.280182	95%	0.320773
50% Med	0.254219	90%	0.304849
25% Q1	0.230322	10%	0.209649
0% Min	0.150048	5%	0.19886
		1%	0.178656
Range	0.269856		
Q3-Q1	0.04986		
Mode	0.150048		

Extremes

Lowest	Obs	Highest	Obs
0.150048	(6869)	0.40264	(1013)
0.151021	(6952)	0.415038	(848)
0.153484	(9981)	0.415082	(6560)
0.153629	(481)	0.415977	(2451)

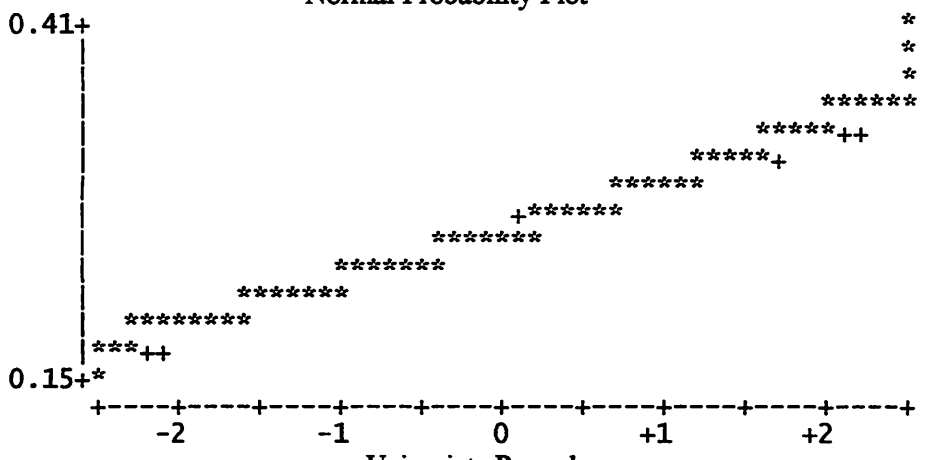
0.154271 (437) 0.419904 (3100)



Univariate Procedure

Variable = X2

Normal Probability Plot



Univariate Procedure

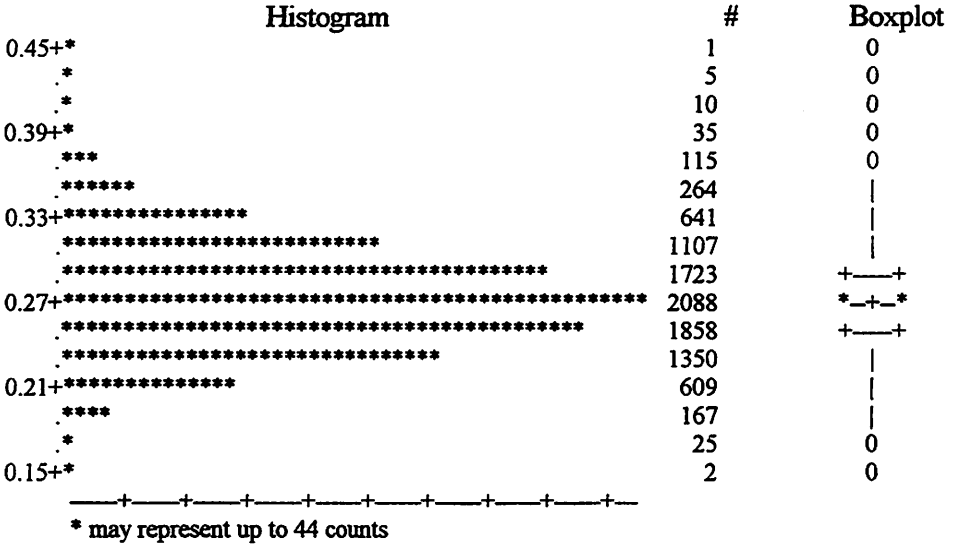
Variable = X3

Moments		Quantiles(Def=5)	
N 10000	Sum Wgts ... 10000	100% Max 0.44386	99% 0.368821
Mean 0.271248	Sum 2712.478	75% Q3 . 0.295373	95% 0.336877
Std Dev 0.038093	Variance 0.001451	50% Med 0.269472	90% 0.321556
Skewness ... 0.33908	Kurtosis . 0.170374	25% Q1 . 0.244445	10% 0.223618
USS 750.2627	CSS 14.5092	0% Min .. 0.154747	5% 0.2128

CV 14.04356	Std Mean 0.000381		1% 0.19256
T:Mean=0 .... 712.07	Pr>|T| 0.0001	Range 0.289114	
Num ^= 0 10000	Num > 0 10000	Q3-Q1 ... 0.050928	
M(Sign) 5000	Pr>=|M| 0.0001	Mode 0.154747	
Sgn Rank 25002500	Pr>=|S| 0.0001		

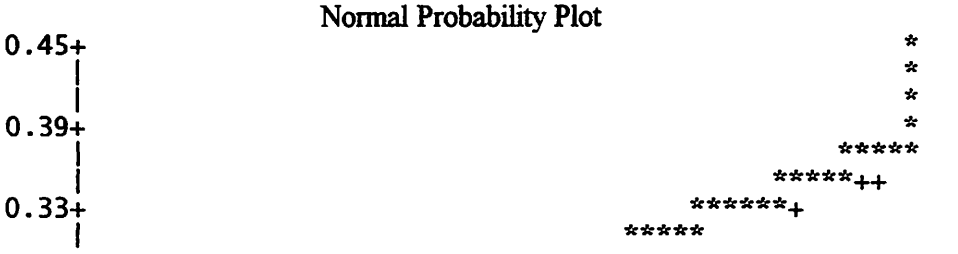
Extremes

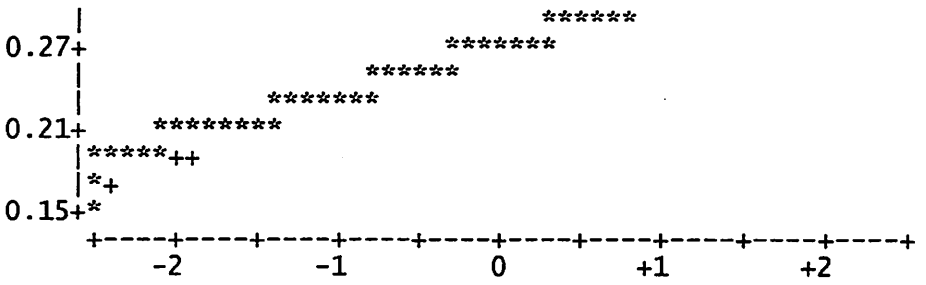
Lowest	Obs	Highest	Obs
0.154747	(4500)	0.433279	(9817)
0.159043	(1285)	0.434209	(9684)
0.161238	(602)	0.4357	(8809)
0.161944	(7242)	0.437498	(7794)
0.165376	(3936)	0.443861	(7067)



Univariate Procedure

Variable = X3





BAYESIANA OUTPUT ANALISE: Chain: resultbays

	Mean	SD	Naïve SE	MC error	Batch SE	B. ACF	P0,025	P0,975
X1	0,25653	0,03739	0,00039	0,00036	0,00038	-0,06321	0,18815	0,33428
X2	0,25692	0,03714	0,00037	0,00034	0,00037	-0,00128	0,18971	0,33433
X3	0,27130	0,03824	0,00038	0,00035	0,00039	0,01036	0,20188	0,35047

HIGHEST PROBABILITY DENSITY INTERVALS:

	Lower Bound	Upper Bound
X1	0,1865876	0,3303872
X2	0,1876855	0,3303922
X3	0,2006789	0,3483796