

Evaluación de la exposición a benceno en trabajadores de diferentes áreas laborales

Assessment of benzene's exposure at different work areas

Gabriela Romero Bracconi^{1,2}, Aura Palencia Medina^{1,3},
Sharim Marrero Blanco^{1,2}, Alisson Moran Winder⁴,
Omairi Montoya Porras⁴, Jessica Torrealba Espinoza⁴

Resumen

Objetivo: Evaluar niveles de ácido trans, transmucónico (AttM) y su relación con parámetros hematimétricos y hepáticos en trabajadores expuestos a benceno en Valencia (Venezuela).

Sujetos y métodos: Se desarrolló una investigación descriptiva, correlacional, con diseño no experimental, de campo y transversal. Se analizaron muestras de 2 grupos de trabajadores expuestos a benceno: 30 trabajadores de una planta de empaques (TPE), 18 trabajadores de estaciones de servicio (TES) y un grupo control (GC) de 22 individuos. La medición del AttM se realizó en muestras de orina recolectadas al final de la jornada laboral, y fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV). Se determinó la biometría hemática y transaminasas (TGO y TGP). Se utilizó estadística no paramétrica para analizar los resultados.

Resultados: Al comparar los valores de AttM se observaron diferencias significativas entre los grupos (TPE: 2,47; TES: 0,94; GC: 0,34 mg.g⁻¹creat); el hábito tabáquico no representó un factor influyente para los resultados. Los parámetros hematológicos y transaminasas para todos los grupos se observaron dentro de los valores de referencia; el conteo de plaquetas mostró correlación significativa ($p=0,033$) con el biomarcador en los grupos expuestos.

Conclusión: el AttM permitió evaluar la exposición ocupacional al benceno en los grupos estudiados, y presentó correlación significativa con el conteo de plaquetas, sin que este parámetro hematológico se observe alterado en comparación con los valores de referencia.

Palabras clave: benceno, ácido trans, transmucónico, exposición ocupacional, transaminasas, biomarcador.

Fecha de recepción: 10 de julio de 2017
Fecha de aceptación: 2 de octubre de 2017

¹Unidad de Investigación en Toxicología Molecular. Módulo 5. Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Bárbula, Naguanagua, Estado Carabobo, Venezuela. ZP 2005.

²Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

³Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo

⁴Escuela de Bioanálisis, Universidad de Carabobo.

Correspondencia: Gabriela V. Romero Bracconi. Unidad de Investigación en Toxicología Molecular, Escuela de Bioanálisis, Universidad de Carabobo. gvromero@uc.edu.ve gaby32004@gmail.com

Abstract

Objective: to evaluate trans, trans - muconic acid levels (ttMA) and its relationship with hematimetric and liver parameters in workers exposed to benzene in Valencia (Venezuela).

Subjects and methods: A descriptive and correlational research, no experimental design, field and cross, was developed. Samples of 2 groups of workers exposed to benzene were analyzed: 30 workers at a packaging plant (PPW) and 18 employees, gas stations attendants (GSA), besides, 22 individuals in a control group. ttMA measurement was performed on urines samples collected at the end of the workday and were analyzed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV). Hematological and hepatics parameters (GOT and GPT) were determined in blood samples blood. Non parametric statistics were used to analyze the results

Results: When comparing ttMA values, significant differences between groups were observed (PPW: 2,47; GSA 0,94; CG: 0,34 mg.g⁻¹creat); Smoking status not represent influential factor for the results. Hematological parameters and transaminases for all groups were inside reference values; platelet count showed significant correlation ($p=0,033$) with biomarker in exposed groups.

Conclusion: ttMA allowed to evaluate occupational exposure to benzene in the groups studied. It was observed significant correlation with platelet count, without alteration in the hematological parameter when compared with the reference value.

Keywords: benzene, trans,trans-muconic acid, occupational exposure, transaminases, biomarker.

INTRODUCCIÓN

El benceno es un hidrocarburo monoaromático cuyas características físico químicas le confieren la capacidad de disolver y dispersar con facilidad gran cantidad de compuestos, por lo que es utilizado ampliamente en la industria petroquímica, como aditivo de combustibles y en procesos como la litografía y la impresión, para la dilución de tintas y limpieza de rodillos (1,2). La volatilidad y liposolubilidad de este compuesto lo hacen responsable de sus efectos sobre la salud y el medio ambiente, pues tiende a evaporarse rápidamente en la atmósfera, presenta gran afinidad por los tejidos ricos en grasas, por su rápida absorción puede causar, a corto plazo, reacciones alérgicas y en exposiciones más prolongadas, lesiones neurológicas, hepáticas y en médula ósea (3,4).

En el ámbito laboral, la exposición a benceno generalmente ocurre por inhalación directa; estudios indican que la absorción en humanos en exposición por vía respiratoria es aproximadamente el 50% de

la cantidad inhalada, aunque esta disminuye al incrementar los niveles de exposición, debido probablemente a la saturación del metabolismo (2). Los efectos nocivos se producen una vez que el solvente ha ingresado al organismo bien sea mediante inhalación, ingestión o contacto con la piel y mucosas.

El metabolismo del xenobiótico comienza en hígado con la oxidación vía citocromo P450E1, con un rearrreglo a fenol, que puede ser convertido enzimáticamente a catecol, el cual finalmente sufre una apertura del anillo, se transforma en trans, transmuconaldehído y luego en ácido trans, trans mucónico (AttM); asimismo, el fenol puede ser hidroxilado a benzoquinonas (5). Son estos dos metabolitos, AttM y 1,4-benzoquinona, los que se han relacionado con la inhibición de la eritropoyesis a través de procesos vinculados a interacciones con especies reactivas de oxígeno (3). En trabajadores expuestos se han evidenciado alteraciones caracterizadas por

cambios en el número de células producidas en la médula ósea (3, 6), cambios en parámetros hematológicos (7-9), alteraciones genéticas (10-13) y daños a nivel hepático y renal que se reflejan en las variaciones de los valores de transaminasas y creatinina urinaria (14,15).

El riesgo que representa la exposición ocupacional al benceno obliga al monitoreo través de la determinación de biomarcadores. El AttM ha sido propuesto y empleado por la Conferencia Americana de Higienistas Industriales (AGCIH) (16), debido a numerosas investigaciones que comprueban la utilidad del mismo por su sensibilidad, especificidad y fácil determinación (6, 8, 12, 17-21), sin embargo, deben tomarse en cuenta algunos factores que pueden afectar la determinación, como el hábito tabáquico, la ingesta de alcohol y bebidas con aditivos preservantes (22, 23).

La industria venezolana aplica las regulaciones pertinentes a través de la Norma COVENIN N° 2253:2001, la cual establece la evaluación de la exposición ocupacional al benceno a través de la determinación de AttM (24), cuya cuantificación es escasamente utilizada a nivel nacional, por lo que el objetivo de este estudio fue la medición de los niveles de AttM en trabajadores de ambientes laborales relacionados con la manipulación o exposición a benceno, como estaciones de servicio expendedoras de gasolina y una empresa dedicada a la manufactura e impresión de empaques y tapas, ubicadas en Valencia (Venezuela), y su relación con parámetros bioquímicos y hematimétricos.

SUJETOS Y MÉTODOS

Población de estudio

Se desarrolló una investigación de tipo descriptivo, correlacional, con diseño no experimental, de campo y transversal. La población estuvo

representada por trabajadores expuestos a benceno en el municipio Valencia, Estado Carabobo (Venezuela). L

a muestra fue seleccionada según los siguientes criterios: para grupo expuesto: antigüedad laboral mayor a 3 meses, estar de acuerdo y participar por su propia voluntad en el estudio, ser mayor de edad, sin antecedentes clínicos de enfermedades hepáticas (hepatitis viral A, B, C, cirrosis hepática, otras virosis), patologías autoinmunes, ni enfermedades de base (diabetes mellitus); las tres últimas condiciones fueron también aplicadas para la participación en el grupo control (GC). De esta forma, la muestra quedó conformada por 48 participantes, quienes fueron agrupados según el ambiente laboral de procedencia en dos grupos: expuestos directamente a solventes orgánicos (TPE), integrado por 30 trabajadores de una empresa dedicada a la fabricación e impresión de empaques, y un grupo correspondiente a 18 trabajadores de estaciones de servicio (TES).

Además se contó con un grupo control conformado por 22 trabajadores de una institución educativa, quienes desempeñaban labores administrativas (GC). Todos los participantes fueron informados de los objetivos y alcances de la investigación y manifestaron por escrito su voluntad de participar en el estudio, firmando un consentimiento informado. Cada participante fue entrevistado a fin de obtener datos socio-epidemiológicos de interés para el estudio.

Determinación de parámetros hematimétricos y hepáticos

Se obtuvo una muestra de sangre por venopunción, que fue dividida en dos alícuotas, una para la determinación de la biometría hemática y la otra para la cuantificación de

transaminasas. Los parámetros hematimétricos, como hemoglobina, hematocrito, conteo de plaquetas, se realizaron en analizador hematológico automatizado Mindray Bc 2300; mientras que la cuantificación de transaminasas (TGO y TGP) se llevó a cabo en el equipo automatizado Analizador Vitros (química seca). Los intervalos de referencia típicos para los parámetros hematológicos y transaminasas fueron tomados de la bibliografía consultada (25).

Determinación de ácido trans, transmucónico

Para la separación del AttM por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC-UV), una alícuota de la muestra de orina puntual recolectada al final de la jornada laboral y al final de la semana fue sometida a extracción en fase sólida con cartuchos de intercambio aniónico SAX (UCT®), acondicionando los mismos con metanol (J. T Baker®), agua ultrapura (Purificador ELGA®) y ácido acético (Riedel-de Haën®) al 99.8 % grado reactivo; posteriormente se eluyó la muestra con ácido acético al 10 %, para su inyección en el sistema cromatográfico Perkin Elmer, con bomba binaria y detector UV de la serie 200. Las condiciones de la corrida fueron: Fase móvil: metanol: ácido acético 30:70; Columna: Nucleosil 100-5 C18 AB; flujo: 0,7 ml/min; longitud de onda: 259 nm y temperatura: 25 °C.

La concentración del metabolito fue determinada por interpolación en una curva de calibración (R^2 0.987) [concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ AttM) en función del área ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)], preparada en un pool de orinas de personas no expuestas, al que se agregó AttM, 99 % (Sigma-Aldrich®) en concentraciones del rango de interés (0,05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ – 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

La creatinina urinaria se determinó por el método de Jaffé modificado; la cuantificación de

este parámetro permitió la corrección de los niveles de excreción de AttM en cada individuo. Se consideró como valor de referencia para el biomarcador $\leq 0,5$ mg/g de creatinina (16).

Análisis estadístico

Se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión para la caracterización de la muestra. Se aplicaron también estadísticos no paramétricos: Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney para diferencias entre grupos y Spearman para correlacionar las variables en estudio. Las pruebas se realizaron utilizando el programa SPSS 17.0

RESULTADOS

Todos los participantes fueron hombres. Los promedios de las edades en los grupos oscilaron entre 33 y 37 años; se observa homogeneidad entre los grupos en referencia a esta variable (Kruskal Wallis $p > 0,05$) y mayor porcentaje de personas no fumadoras en los tres grupos (tabla 1).

Factores como la ingesta de jugos preempacados y/o alcohol, considerados interferentes en el metabolismo del biomarcador, no presentaron variación, pues todos los participantes en el estudio declararon consumir “ocasionalmente” este tipo de bebidas.

Tabla 1. Edad y tabaquismo en los grupos en estudio

		TES (18)	TPE(30)	GC(22)
Edad (años)		33 \pm 6,8	37 \pm 8	37 \pm 9
Tabaquismo	SI	4 (22,2)	2(6,66)	6(27,3)
	NO	14(77,7)	28(93,3)	18(81,8)

Edad expresada como media \pm desviación estándar. TES: Trabajadores estaciones de servicio; TPE: trabajadores planta de empaques; GC: grupo control.

En la tabla 2 se muestran valores de mediana del biomarcador en los diferentes grupos en estudio (n total: 70); los valores en TES y TEP (Mediana 1,165) sobrepasan los límites propuestos por organismos internacionales para trabajadores expuestos a benceno. La comparación entre los grupos resulta con diferencias significativas entre TES y GC; TPE

y GC (p= 0,000); entre TES y TEP no se observan diferencias estadísticas (p=0,210). Estos resultados se representan en el gráfico 1.

En la tabla 3 se muestran los valores de AttM según tabaquismo; al aplicar la prueba de la mediana no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 2. Ácido t,t-mucónico en los grupos en estudio

	TES (18)	TPE(30)	GC (22)
AttM (mg.g ⁻¹ creat)	0,94 (00,1-15,28)	2,67 (0,03-7,64)	0,34 (0,03-2,75)

Valores expresados como mediana (mínimo – máximo).

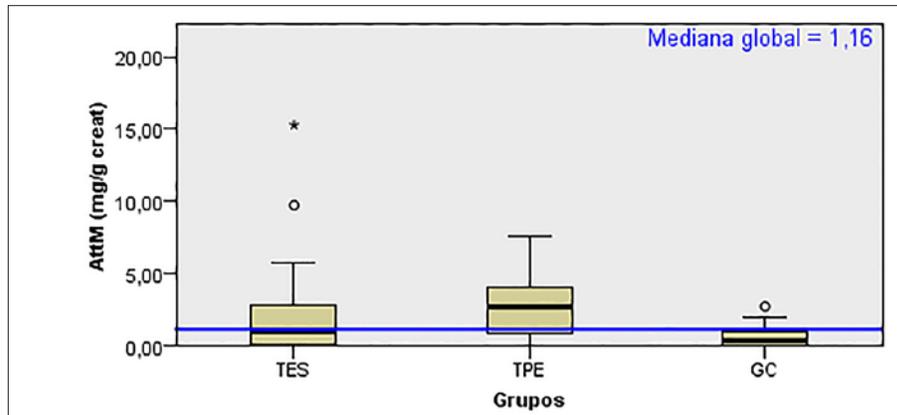


Tabla 3. Valores de ttMA según tabaquismo

	Fumadores (12)	No fumadores (58)	p
ttMA (mg.g ⁻¹ creat)	1,73 (0,01-3,12)	1,045 (0,03-15,28)	0,751

Valores expresados como mediana (mínimo-máximo). Prueba de la Mediana. Valor del estadístico 0,401

Cuando se comparan no fumadores de los grupos (n total: 58) se observa la misma relación, sin embargo, disminuye el valor de la mediana general (Mediana:1,045) y aumenta la correlación (Estadístico de prueba: 23,286, GL:2, significación asintótica: 0,000). Los resultados se presentan en el gráfico 2.

En la tabla 4 se muestran los valores de la biometría hemática y transaminasas de los grupos en estudio, los cuales se encuentran en todos los casos dentro de los valores de referencia. Además no existen diferencias significativas al comparar entre grupos.

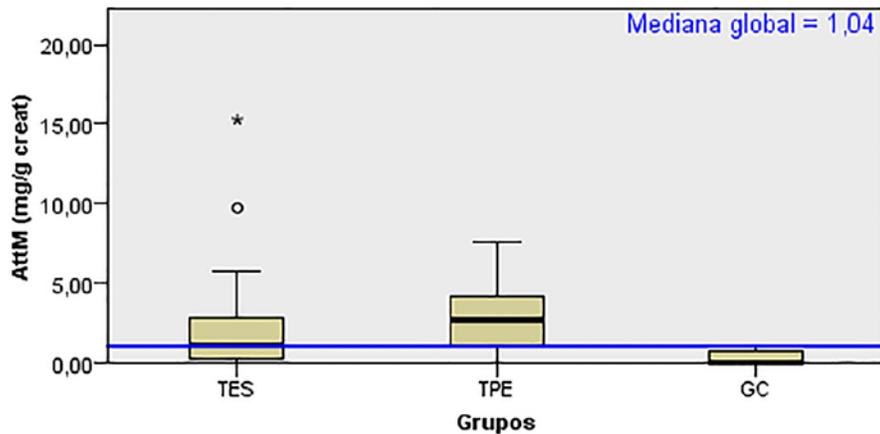


Tabla 4. Parámetros hematimétricos y bioquímicos de los grupos en estudio

	TES (18)	TPE(30)	GC (22)	p
Hemoglobina (g.dL-1)	15,4(12,7-16,9)	15,2 (12,1-17,3)	14,9 (12,1-17,3)	0,262
Hematocrito (%)	46,5 (41-3-49,5)	46,1 (39,5-52,7)	44,9 (37,1-52,7)	0,088
Leucocitos (10 ³ /mm ³)	8,60 (5,9-14,8)	8,00 (6,0-9,0)	7,95 (4,7-9,3)	0,351
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	289 (172-381)	292 (195-413)	295 (194-413)	0,963
TGP (U.L-1)	29 (19-63)	30 (7,0-99,7)	26 (12-64)	0,217
TGO (U.L-1)	30 (18-54)	25 (12-69)	22 (15-38)	0,04

Valores expresados como mediana (mínimo-máximo). TES: Trabajadores estaciones de servicio; TPE: trabajadores planta de empaques; GC: grupo control. Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes. Intervalo de confianza 95%

El análisis de Spearman mostró débil correlación entre el recuento de plaquetas y la concentración del biomarcador de exposición en los grupos expuestos (Coeficiente de Correlación -0,308; p=0,033). Para las otras variables no se observó correlación estadísticamente significativa.

DISCUSIÓN

Algunos microambientes laborales presentan concentraciones de compuestos orgánicos volátiles, que en ocasiones pueden sobrepasar los límites permisibles. Tal es el caso de estaciones de servicio y plantas dedicadas a la litografía, en los que se utiliza el benceno como

materia prima o solvente, reconocido por su comprobada toxicidad, aun a niveles bajos. En este estudio se observan diferencias entre los grupos expuestos (TES y TPE) y no expuesto (GC), lo cual concuerda con el biomonitorio de AttM en similares puestos de trabajo (17, 26-28), con valores de medianas por encima del valor límite sugerido por la ACGIH en TPE y TES, y que han sido relacionados con microambientes de 1 ppm de benceno (29). Esto coincide con lo propuesto por diversos autores, quienes afirman que la determinación de AttM permite establecer diferencias entre expuestos y no expuestos (17-21), sustentando así su utilidad como biomarcador de exposición.

La diferencia de los valores del biomarcador entre TES y TPE puede explicarse por el mismo entorno laboral al aire libre de los primeros y asociarse, además, con el barrido ambiental propio de los meses en los que se realizó el muestreo, período lluvioso de mayo a septiembre. El microambiente laboral de la planta de impresión de empaques es un entorno cerrado en el que existe mayor probabilidad de que se acumulen vapores de solventes.

Al desglosar los grupos en fumadores y no fumadores no se observó diferencia estadística entre las medianas del biomarcador. Esto concuerda con lo referido por investigadores, quienes reportaron que el número de fumadores en cada grupo era muy pequeño para considerar las diferencias entre ellos, sin embargo, se observaron valores superiores de AttM en los grupos expuestos, entre no fumadores (28).

La influencia del tabaquismo es soportada por numerosas investigaciones en las que se concluye que el número de cigarrillos fumados diariamente, así como el humo de segunda mano, representan una fuente importante de exposición no ocupacional al benceno (22, 28-30).

Otro factor que se debe considerar en la interpretación de los valores del biomarcador es la ingesta de jugos pre-empacados; se reconoce que el uso de ácido sórbico como preservante, cuyo metabolismo origina muconaldehído, finalmente se transforma en AttM (31). Sin embargo, esto no representó alguna variable, pues todos los participantes declararon consumirlos con la misma frecuencia ocasional. Cabe resaltar que algunos autores refieren que no tiene valor estadístico para el análisis de los resultados cuando existe exposición laboral (28, 32). Es debido a estas interferencias que la búsqueda de un biomarcador de exposición

de mayor especificidad ha estado orientada en los últimos tiempos hacia la genómica (23, 33).

En este sentido, algunos autores explican la dificultad de la evaluación a xenobióticos, debido a que son innumerables los factores intervinientes que pueden afectar la relación causal. Surge entonces el concepto de exposoma, que considera cada exposición a las que se somete un individuo desde la concepción hasta la muerte, abarcando desde factores no genéticos hasta aspectos del estilo de vida, como el tabaquismo, dieta, entre otros (34,35), lo cual definiría la susceptibilidad individual a la exposición.

Diversos estudios relacionan las alteraciones hematológicas con la cronicidad de la exposición, en la que se observan casos de anemia con macrocitosis y en exposiciones severas (altos niveles de benceno), en las que los cambios son más bruscos, con disminuciones en varios componentes de la sangre, siendo el conteo de plaquetas y leucocitos los parámetros más sensibles (11). Recientemente se reportó un estudio que sugiere que la toxicodinamia del benceno estaría relacionada con alteración en el metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos esenciales (lisina, fenilalanina y tirosina) en las células de la médula ósea (6, 36).

En este estudio se analizaron algunos parámetros hematológicos que pudieran correlacionarse con alteraciones vinculadas a la exposición a benceno. El análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre los grupos, ni variaciones significativas respecto a los valores referenciales, pero sí una correlación negativa estadísticamente significativa entre el conteo de plaquetas y la mediana del biomarcador, lo cual coincide con lo observado por otros investigadores que, mencionan esta relación sin alteraciones aparentes (6,37).

Una limitación de este estudio es su carácter transversal, no se plantea evaluar la evolución en el tiempo de la exposición o los cambios en los parámetros evaluados, ni medir los niveles ambientales de benceno, factores importantes a la hora de asociar los efectos sobre los parámetros hematológicos o hepáticos.

Es importante aclarar que los biomarcadores de exposición son indicadores de la dosis interna y no cuantifican la exposición crónica ni la acumulación del xenobiótico. De allí su utilidad en exposiciones recientes, y la importancia de conocer la toxicocinética del compuesto contaminante, pues algunos metabolitos tienen vida media muy corta y su utilidad se restringe a verificar si existió o no biotransformación en el momento de la observación (38).

La actividad de las transaminasas es interpretada como una medida de lesión en el tejido hepático. En este estudio la actividad enzimática de TGO y TGP se encontró dentro de intervalos referenciales, contrastando con lo reportado por autores que observan alteración de la función hepática en grupos expuestos a solventes orgánicos. Aun cuando no hay diferencias significativas entre los grupos, los valores estuvieron más elevados en TES y TPE que en GC, lo cual coincide con los resultados reportados por otros autores (15); lo que se explica por la toxicocinética del benceno que involucra en gran medida al hígado para la producción de sus metabolitos (18).

La ingesta de fármacos que pudieran afectar negativamente el funcionalismo hepático fue considerada un criterio de exclusión para este estudio; sin embargo, algunos investigadores reseñan que la ingesta de vitaminas y antioxidantes ejerce un efecto protector contra los mecanismos de estrés oxidativo

por la exposición (15); aspecto no estimado para este trabajo y que debe ser tomado en cuenta en futuras investigaciones para poder definir realmente una relación causal entre la exposición al xenobiótico y el efecto causado.

CONCLUSIÓN

Los trabajadores de los grupos expuestos presentan valores del biomarcador superiores a los sugeridos como referencia en la regulación laboral vigente, que han sido relacionados con rangos de exposición mayores a 1ppm. Asimismo, se observa una correlación negativa con el recuento de plaquetas, sin que se encuentren alterados los valores referenciales; por lo que el monitoreo biológico debe ser complementado con distintas pruebas que permitan la vigilancia epidemiológica del estado de salud a fin de detectar lesiones precoces y reversibles, que contribuyan a las acciones destinadas a la higiene laboral.

Conflicto de intereses: ninguno.

Financiación: recursos propios.

REFERENCIAS

1. Burns A, Shin J, Unice K, Gaffney S, Kreider M, Gelatt R, Panko J. Combined analysis of job and task benzene air exposures among workers at four US refinery operations. *Toxicol Ind Health*. 2016; doi: 10.1177/0748233715619072
2. Weisel CP. Benzene exposure: an overview of monitoring methods and their findings. *Chem Biol Interact*. 2010; 19:184(1-2):58-66. doi: 10.1016/j.cbi.2009.12.030. Epub 2010 Jan 6.
3. Snyder R. Leukemia and Benzene. *Int J Environ Res Public Health*. 2012; 9: 2875-2893. doi:10.3390/ijerph9082875
4. Vlaanderen J, Lan Q, Kromhout H, Rothman N, Vermeulen R. Occupational benzene exposure and the risk of chronic myeloid

- leukemia: a meta-analysis of cohort studies incorporating study quality dimensions. *Am J Ind Med.* 2012; 55(9):779-85. doi: 10.1002/ajim.22087. Epub 2012 Jun 21.
5. Snyder R, Hedli C. An overview of benzene metabolism. *Environ Health Perspect.* 1996; 104(6): 1165-71.
 6. Bassig BA, Zhang L, Vermeulen R, Tang X, Li G, Hu W, Guo W et al. Comparison of hematological alterations and markers of B-cell activation in workers exposed to benzene, formaldehyde and trichloroethylene. *Carcinogenesis.* 2016; 37(7):692-700. doi: 10.1093/carcin/bgw053. Epub 2016 May 2.
 7. Kobt MA, Ramadan HS, Shams El Din R, Motaweh HA, Shehata RR, El-Bassiouni EA. Changes in some biophysical and biochemical parameters in blood and urine of workers chronically exposed to benzene. *Eur Sci J.* 2013; 9(24):411-422.
 8. Tunsaringkarn T, Soogarun S, Palasuwan A. Occupational exposure to benzene and changes in hematological parameters and urinary trans, trans-muconic acid. *Int J Occup Environ Med.* 2013; 4(1):45-9.
 9. Lan Q, Luoping Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg R, Dosemeci M, et al. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science.* 2004; 306(5702): 1774-1776.
 10. Göethel G, Brucker N, Moro AM, Charão MF, Fracasso R, Barth A et al. Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants. *Mutat Res-Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014; 770:61-5. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.05.008. Epub 2014 Jun 4.
 11. Gadhia P, Thumbar R, Kevadiya B. Cytome assay of buccal epithelium for bio-monitoring genotoxic assessment of benzene exposure among petrol pump attendants. *Int J Hum Genet.* 2010; 10(4): 239-245.
 12. Tunsaringkarn T, Suwansaksri J, Soogarun S, Siriwong W, Rungsiyothin A, Zupuang K et al. Genotoxic monitoring and benzene exposure assessment of gasoline station workers in metropolitan Bangkok: sister chromatid exchange (SCE) and urinary trans, trans-muconic acid (t,t-MA). *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011; 12(1):223-7.
 13. Mitri S, Fonseca AS, Otero UB, Tabalipa M, Moreira J, Sarcinelli P. Metabolic polymorphisms and clinical findings related to benzene poisoning detected in exposed brazilian gas-station workers. *Int J Environ Res Public Health.* 2015; 12(7):8434-47. doi: 10.3390/ijerph120708434.
 14. Pérez C, Bosia J, Cantore M. Daño hepático en trabajadores expuestos a hidrocarburos. *Gastroenterol Hepatol.* 2006; 29(6): 334-7.
 15. Hegazy R, Kamel H. Oxidants hepatic and /or haematological injury on fuel-station workers exposed to benzene vapor, possible protection of antioxidants. *Am J Med Med Sci.* 2014; 4(2):35-46. doi:10.5923/j.ajmms.20140402.01
 16. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). TLVs and BEIs. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH; 1999. p. 19: 67-72.
 17. Negrin J, Aular Y, Fernández Y, Piñero S, Romero G. Ácido trans, trans mucónico y perfil hepático, hematológico y renal en trabajadores expuestos a benceno. *Salud Trab.* 2014; 22(2): 121-128.
 18. Garte S, Popov T, Georgieva T, Bolognesi C, Taioli E, Bertazzi P et al. Biomarkers of exposure and effect in Bulgarian petrochemical workers exposed to benzene. *Chem Biol Interact.* 2005. doi: 10.1016/j.cbi.2005.03.030
 19. Wiwanitkit V, Soogarun S, Suwansaksri J. A correlative study on red blood cell parameters and urine Trans, trans-muconic acid in subject whit occupational benzene exposure. *Toxicol Path.* 2007; 35:268-9.
 20. Paula F, Silveira J, Goncalves R, Alvarez M. Avaliacao do acido trans, trans-muconico urinario como biomarcador de exposicao ao benzene. *Rev Saude Pública.* 2003; 37(6): 780-5.
 21. Qu Q, Melikian A, Li G, Shore R, Cohen B et al. Validation of biomarkers in humans exposed to benzene: urine metabolites. *A J Ind Med.* 2000; (37): 522-31.

22. Malafatti L, Martins M, Vieira A, Zampieri R, Gomes L, Martins I. Influence of tobacco smoke on urinary trans, trans-muconic acid levels evaluated by cotinine analysis in a population from southern of Minas Gerais, Brazil. *Interciencia*. 2011; 36(3): 234-39.
23. Tranfo G, Pignini D, Paci E, Marini F, Bonann R. Association of exposure to benzene and smoking with oxidative damage to nucleic acids by means of biological monitoring of general population volunteers. *Environ Sci Pollut Res*. 2016; doi: 10.1007/s11356-016-6366-1
24. FONDONORMA. Norma COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). N° 2253: Concentraciones ambientales permisibles de sustancias químicas en lugares de trabajo e índices biológicos de exposición 3ª revisión, Caracas 31 octubre, 2001.
25. Henry JB, editor. El laboratorio en el diagnóstico clínico. Madrid: Marban Libros; 2007.
26. Wiwanitkit V, Suwansaksri J, Nasuan P. Urine trans, trans - muconic acid as a biomarker for benzene exposure in gas station attendants in Bangkok, Thailand. *Ann Clin Lab Sci*. 2001; 31 (4): 399-401.
27. Kongtip P, Leelapaiboon S, Yoosook W, Chantanakul S. Determination of urinary trans, trans - muconic acid by gas chromatography in gasoline service attendants. *J Health Res*. 2009; 23 (3): 117-124.
28. Bahrami R, Jafari A, Ahmadi H, Mahjub H. Comparison of benzene exposure in drivers and petrol stations workers by urinary trans, trans - muconic acid in west of Iran. *Ind health*. 2007; 45: 396-401.
29. Martins I, Pereira M. Trans,trans-muconic acid in urine samples collected in three periods from benzene handling workers in a Brazilian refinery. *Rev Bras Cienc Farm*. 2004; 40(2):197-202.
30. Menezes M, Salviato M, Pereira M, Martins I. Influência do hábito de fumar na excreção urinaria do ácido transtrasmucônico. *Rev Bras Cienc Farm*. 2008; 44 (3): 460-464.
31. Suwansaksri J, Wiwanitkit V. Urine trans, trans - Muconic Acid determination for monitoring of benzene exposure in mechanics. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2000; 31 (3):587-9.
32. Negri S, Bono R, Maestri L, Ghittori S, Imbriani M. High-pressure liquid chromatographic-mass spectrometric determination of sorbic acid in urine: verification of formation of trans, trans-muconic acid. *Chem Biol Interact*. 2005; 153-154:243-246. doi: 10.1016/j.cbi.2005.03.029
33. Li K, Jing Y, Yang C, Liu S, Zhao Y, He X et al. Increased leukemia-associated gene expression in benzene-exposed workers. *Sci Rep*. 2014; 5369: doi:10.1038/srep05369
34. Betts K. Caracterización de los exposomas. Herramientas para medir las exposiciones ambientales personales. *Salud Pública Mex*. 2012; 54(6): 644-662.
35. Wild PC. The exposome: from concept to utility. *Int. J. Epidemiol*. 2012; 41 (1): 24-32. doi: 10.1093/ije/dyr236
36. Sun R, Zhang J, Yin, L, Pu Y. Investigation into variation of endogenous metabolites in bone marrow cells and plasma in C3H/He mice exposed to benzene. *Int J Mol Sci*. 2014; 15: 4994-5010. doi:10.3390/ijms15034994
37. Wiwanitkit V, Suwansaksri J, Soogarun S. The Urine Trans, Trans Muconic Acid Biomarker and Platelet Count in a Sample of Subjects with Benzene Exposure. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2004; 10 (1): 73-76. doi: 10.1177/107602960401000113
38. Palma M, Briceño L, Idrovo A, Verona M. Evaluación de la exposición a solventes orgánicos en pintores de carros de la ciudad de Bogotá. *Biomédica*. 2015; 35(Supl. 2):66-76. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i0.2268>