

Biomonitorización de la exposición ocupacional a hidrocarburos

UN TEST REVELADOR

EL ESTUDIO EVALÚA LOS EFECTOS DEL BENCENO,
TOLUENO Y XILENO SOBRE LOS TRABAJADORES

Este artículo presenta un estudio cuyo objetivo es determinar cómo afecta la exposición de los trabajadores de una refinería a los hidrocarburos aromáticos presentes en el ambiente de esa instalación, entre ellos el benceno, el tolueno y el xileno, potencialmente tóxicos. En concreto, se pretendía averiguar los valores de exposición ambiental a los que se exponen esos trabajadores y determinar los efectos genotóxicos resultantes de la exposición a los hidrocarburos.

Por B. PÉREZ CADAHÍA, B. LAFFON LAGE y J. MÉNDEZ FELPETO. DPTO. BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR, ÁREA DE GENÉTICA. FACULTAD DE CIENCIAS. UNIVERSIDADE DA CORUÑA. CAMPUS A ZAPATEIRA.

aromáticos presentes en el ambiente de refinерías



Age Fotostock

Los hidrocarburos son compuestos cuyas moléculas están constituidas por átomos de carbono e hidrógeno. Existe una gran variedad que difiere en sus propiedades físicas y químicas, y por lo tanto en su forma de interactuar con otras moléculas. La clasificación principal los agrupa en dos clases fundamentales: hidrocarburos alifáticos (de estructura lineal simple o ramificada) e hidrocarburos aromáticos (de estructura cíclica).

Entre las principales fuentes de hidrocarburos existentes destacan en especial el petróleo, el gas natural y el carbón. En lo que se refiere a los hidrocarburos aromáticos, destacan su carácter liposoluble y sus características nocivas, ya que muchos de ellos poseen propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas.

Con respecto a la exposición a estos compuestos en la industria petrolífera, en las refinerías se procede a la separación en fracciones volátiles y pesadas o

de punto de ebullición más elevado, así como a la conversión de hidrocarburos de bajo interés comercial en otros más ventajosos como solventes, combustibles, aceites lubricantes, ceras de petróleo, parafinas y materias primas para la industria petroquímica (Parmeggiani, 1983). Por lo tanto, la exposición a estos compuestos en refinerías de petróleo incluye la inhalación de vapores y el contacto dérmico con el fuel, con los productos intermedios (durante su refinado) y con los productos finales como la gasolina. La más grave de ellas y con mayores consecuencias es la que se produce por inhalación de los denominados compuestos orgánicos volátiles. Entre ellos existen tres considerados más peligrosos y significativos: benceno, tolueno y xileno (BTX), ya que son agentes de carácter lipofílico y presentan propiedades nocivas.

Con respecto al primero de ellos, requiere una atención especial dadas sus propiedades mutagénicas y carcinogénicas bien establecidas (Raabe y Wong, 1996; Andreoli et al., 1997). El benceno (C_6H_6) es el compuesto aromático con menor número de átomos de carbono y más estable, tiene un punto de ebullición relativamente bajo ($80.1^\circ C$) y una elevada presión de vapor, lo que hace que se evapore rápidamente a temperatura ambiente y que sea altamente inflamable. Además de su presencia en el petróleo bruto a niveles próximos a $4 g/l$, se encuentra presente en las gasolinas al 1-5% (Schnatter, 2000; WHO, 2000), siendo adicionado a las gasolinas sin plomo para aumentar su octanaje (ATSDR, 2000). La exposición a este compuesto en las refinerías es particularmente relevante, ya que se producen grandes cantidades a través de la conversión catalítica de nafta (WHO, 1982; Parmeggiani, 1983). El establecimiento de valores límite de exposición (VLE) a benceno empezó a surgir en 1946 con la imposición



Age Fotostock

de 100 ppb como concentración media ponderada para 8 horas de trabajo (VLE-MP). A medida que se fueron haciendo conocidos los efectos de este compuesto [sustancia clasificada como carcinógeno humano (Grupo 1) por la IARC (*International Agency for Research on Cancer*, 1994)], se fue reduciendo el VLE para este compuesto. Actualmente la *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) recomienda un límite de exposición medio de 0.5 ppm (VLE-MP) (ACGIH, 2003).

Con respecto al tolueno (metilbenceno, $C_6H_5CH_3$), posee también una elevada volatilidad, siendo sus vapores más densos que el aire, de manera que permanecen a una altura baja, favoreciéndose así su inhalación. Está presente de manera natural en el petróleo crudo y es ampliamente utilizado como solvente y en la fabricación de tintas, celulosas, neumáticos, resinas, etc. Los efectos predominantes para la salud humana del tolueno son fundamentalmente de carácter neurotóxico; por otra parte, no existen



ción disponible acerca de la carcinogenicidad de esta última sustancia, aunque estudios en animales han proporcionado resultados negativos (*U.S. Department of Health and Human Services*, 1993).

Con respecto a la exposición ocupacional a este tipo de compuestos, existe una legislación vigente encargada de regular los niveles presentes, ya sea mediante medidas ambientales o índices

tos compuestos son de 500 μ g de ácido t,t-mucónico /g de creatinina, de 1,6 g de ácido hipúrico /g de creatinina y de 1.5 g de ácido metilhipúrico /g de creatinina en las orinas de final de jornada laboral.

Dadas las conocidas propiedades mutagénicas y/o carcinogénicas de algunos de los hidrocarburos, se hace necesario el empleo de ensayos de genotoxicidad para la evaluación del posible daño que esos

Los compuestos orgánicos volátiles, benceno, tolueno y xileno (BTX) son agentes de carácter lipofílico y presentan propiedades nocivas para el ser humano

estudios en humanos que sugieran que el tolueno tenga potencial carcinogénico, así que la IARC lo ha incluido en el grupo 3: no clasificable como carcinógeno humano.

El xileno (dimetilbenceno $C_6H_4(CH_3)_2$) es un hidrocarburo aromático que existe en tres formas isoméricas: orto, meta y para. El xileno de uso comercial está constituido por una mezcla de los tres isómeros en la que predomina el m-xileno. A temperatura ambiente es líquido. Cerca del 92% de su producción se dedica a mezclas en gasolinas. La exposición de manera crónica a xileno causa irritaciones diversas y efectos neurofisiológicos y nefrológicos. Tampoco existe informa-

biológicos. Estos últimos presentan un interés especial, ya que ponen de manifiesto la dosis real a la que se han visto expuestos los trabajadores. La valoración más empleada hoy en día para determinar estos parámetros de exposición biológica se basa en la detección de los metabolitos urinarios para cada compuesto con los que han estado en contacto. En concreto, para la exposición a la mezcla de benceno, tolueno y xileno que se produce en el ambiente de las refinerías se evalúan los niveles de los ácidos t,t-mucónico, hipúrico y metil-hipúrico como metabolitos resultantes de ellos respectivamente. Los valores de los límites biológicos de exposición permitidos para es-

agentes pueden estar causando a los trabajadores expuestos a ellos. De este modo, la toxicología genética tiene por finalidad estudiar los agentes ambientales que conducen a alterar las características de un genoma concreto (agentes genotóxicos), así como la determinación de todos aquellos factores, ya sean endógenos o exógenos, que modulan dichos cambios. La vinculación detectada entre los efectos genotóxicos de diferentes compuestos y los diversos tipos de alteraciones en el estado de salud, ha permitido un gran desarrollo de la toxicología genética a fin de prevenir o ralentizar la carcinogénesis, el desarrollo de enfermedades hereditarias o el envejecimiento (Kramer, 1998). →



Age Fotostock

Actualmente se estima que entre el 60% y el 90% de los cánceres humanos pueden ser originados por factores ambientales, fundamentalmente debidos a carcinógenos químicos (Lauwerys, 1990).

Uno de los tests más ampliamente empleados hoy en día para la detección de este tipo de daño es el ensayo del cometa. Esto es debido a que posee la ventaja de ser una técnica rápida, sencilla y sensible para evaluar el daño sobre el ADN en células individuales.

Otro de los ensayos más utilizados es el de aberraciones cromosómicas. Se engloban bajo este término las alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas. Las primeras derivan de la rotura de los cromosomas y su reordenación en formas aberrantes.

Por todo lo expuesto, en este trabajo se pretendió, por un lado, evaluar los valores de exposición ambiental a los que se hallaban sometidos los trabajadores de

la unidad de aromáticos en una refinería de petróleo al norte de Portugal. Por otro lado, determinar los efectos genotóxicos resultantes de la exposición ocupacional a BTX, evaluar su relación con los niveles de exposición experimentados, así como con otros factores potencialmente influyentes como son la edad o los hábitos de consumo de tabaco de los individuos incluidos en el estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Población estudiada

El grupo ocupacionalmente expuesto consistió en 50 trabajadores de la refinería, comprendiendo el grupo control una muestra del mismo tamaño y similar en términos de sexo, edad, consumo de tabaco, etc. al grupo de expuestos.

2. Toma de muestras

La recogida de muestras constó de dos partes. Por un lado, la obtención de ori-

na para la determinación de los índices de exposición biológicos, y por otro, la extracción de sangre periférica para su empleo en los tests de genotoxicidad.

De cada individuo fueron recolectados un total de 50 ml de orina de fin de turno en un frasco de polipropileno, para la determinación de los niveles de los principales metabolitos urinarios que se generan tras la exposición a la mezcla benceno-tolueno-xileno, como son el ácido t,t-mucónico, ácido hipúrico y ácido metilhipúrico, respectivamente. Para la corrección de los posibles efectos de dilución de la orina se determinaron también los niveles de creatinina (Faulkner y King, 1976), ya que esta sustancia se filtra a nivel del glomérulo y no se secreta ni se reabsorbe en los túbulos renales, y por ello su utilización como factor de corrección posibilita la eliminación de la variabilidad interindividual en la velocidad de producción de orina. Todas las muestras fueron codificadas (para facilitar un estudio «ciego» y evitar posibles sesgos) y mantenidas a una temperatura de 4° C hasta llegar al laboratorio, donde fueron almacenadas a -20° C hasta su análisis.

Por otro lado, a cada uno de los donantes se le extrajeron un total de 15 ml de sangre: 5 ml en un tubo con heparina de litio, para el establecimiento de los cultivos para el ensayo de aberraciones cromosómicas, y 10 ml en un tubo Vacutainer BD-CPT®, especial para la extracción de leucocitos mononucleares. Todas las muestras fueron mantenidas a 4° C y transportadas inmediatamente al laboratorio, donde se procesaron a la máxima brevedad posible.

3. Determinación de los metabolitos urinarios

Los métodos empleados para la detección de los tres metabolitos relacionados con la exposición a la mezcla benceno, tolueno y xileno se basan en las técnicas

El test se realizó sobre 50 trabajadores de la refinería, que se sometieron a distintas pruebas para evaluar cómo les afectaba la exposición al ambiente del lugar de trabajo

de Ducos (1990) para el ácido t,t-mucónico y en el método nº 83001 del *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH, 1994) para el ácido hipúrico y metilhipúrico.

4. Ensayo del cometa

La extracción de leucocitos mononucleares se realizó a partir de los 15 ml de sangre periférica que fueron recogidos de cada donante en tubos Vacutainer BD-CPT®, especiales para la extracción de esta población celular.

Los tubos fueron centrifugados 30 min a 2.100 rpm. A continuación se recogió la fracción que contiene los leucocitos y se lavó dos veces con tampón fosfato pH 7.4, centrifugándolos 10 min a 1.500 rpm y a 4° C. A continuación, el sedimento se resuspendió en medio de congelación (50% suero bovino fetal, 40% RPMI, 10% dimetil sulfóxido).

Las muestras fueron congeladas a -80°C hasta el momento de su análisis. Con objeto de minimizar en lo posible el daño celular sufrido durante este proceso, la criopreservación fue llevada a cabo en un recipiente que garantiza el descenso gradual de la temperatura a razón de 1°C/min (NALGENE® Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene Nunc International).

El ensayo del cometa se realizó siguiendo lo descrito por Sing et al. (1988) con pequeñas modificaciones (Laffon et al. 2003).

Todos los análisis fueron realizados por duplicado. De cada individuo se analizaron un total de 100 células a través del programa QWIN Comet (Leica Imaging Systems).

5. Aberraciones cromosómicas

Los cultivos se establecieron por duplicado añadiendo 0.5 ml de sangre a 4.5 ml de medio de cultivo estéril. La composición del medio es la siguiente: 85%

RPMI 1640, 15% suero bovino fetal inactivado por calor, 1% fitohemaglutinina, 1% L-glutamina (200 mM) y 1% solución de penicilina (5.000 U/ml)/estreptomina (5.000 µg/ml). Los cultivos se mantuvieron a 37° C. Pasadas 66 horas se añadieron 33.3 µl de colchicina 0.3 mg/mL (en Hanks). Finalmente, tras 72 horas desde el inicio de los cultivos, éstos fueron fijados en Carnoy (metanol-acético 3:1) y extendidos en portaobjetos.

La tinción de las muestras fue realizada con el colorante fluorescente 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 5 µg/ml. Todos los portaobjetos fueron codificados antes del análisis para evitar sesgos en los resultados provocados por la posible sub-

jetividad del observador. El análisis microscópico ha sido realizado en un microscopio Nikon Eclipse E 400. Se contaron un total de 100 metafases por individuo (50 de cada réplica).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Determinación de metabolitos urinarios

La determinación de los valores para los ácidos hipúrico y metil-hipúricos resultó en 0.52 g/g de creatinina, tanto en el grupo control como en el de expuestos para el primero de los metabolitos. Con respecto al ácido metil-hipúrico, se obtuvieron valores de entre 0.02 y 0.06 g/g de creatinina para el grupo expuesto →



Como conclusión principal del estudio, se constató que la exposición a BTX, incluso a bajos niveles, ocasiona efectos genotóxicos

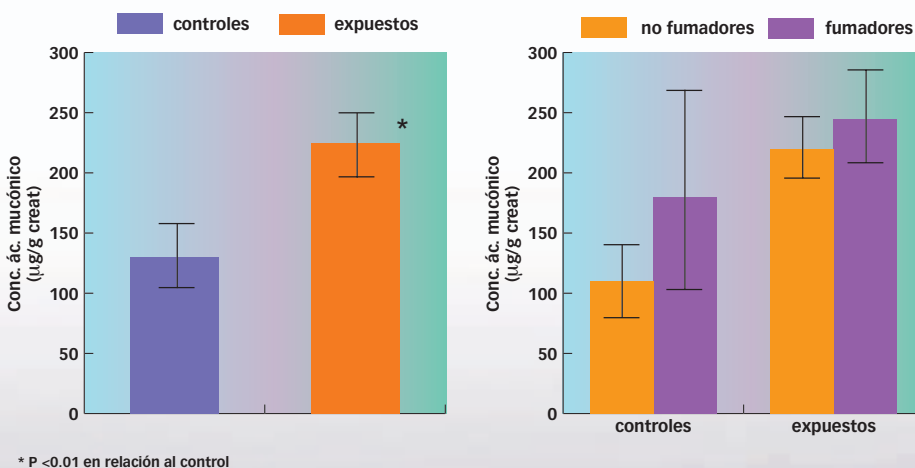
frente a 0.044 g/g de creatinina para el grupo control. Del análisis de las concentraciones obtenidas se puede extraer que los niveles excretados de ácido metil-hipúrico por el grupo de individuos expuestos se encuentran por debajo del límite biológico (VLB) recomendado por la ACGIH para este indicador biológico (1.5 g/g creatinina).

Con respecto al ácido hipúrico, los valores obtenidos fueron similares entre los dos grupos de exposición. Esto puede ser debido a que este compuesto se encuentra de manera habitual en orina (proveniente del metabolismo del ácido benzoico).

Visto esto, se puede concluir que las condiciones de trabajo, en lo referente a la exposición a tolueno y a xileno, de la unidad de aromáticos de la presente refinería se encuentran dentro de lo estipulado para la salud pública.

En lo referente al ácido t,t-mucónico, se han determinado concentraciones de 133±23 µg/g de creatinina para el grupo

Figura 1. Efecto de la exposición (a) y de los hábitos de consumo de tabaco (b) en la excreción de ácido t,t-mucónico.



* P <0.01 en relación al control

control frente a 228±22 µg/g de creatinina para el grupo expuesto. Dado que ambos valores son estadísticamente significativos con un P valor de 0.01, y ya que el tabaco constituye una clara fuente de agentes genotóxicos entre los que se hayan los que valoramos en este estudio,

hemos realizado un desglose de los grupos en función de si los individuos son o no fumadores. Tras el nuevo análisis de los resultados se han obtenido los valores que se muestran en la Tabla I.

Al comparar las concentraciones medias de ácido t,t-mucónico entre el grupo de individuos fumadores y el de no fumadores se observa un incremento en los valores de excreción de este metabolito en los individuos fumadores con respecto a los no fumadores, tanto en el grupo de individuos expuestos como en el de individuos controles. Esto puede verse reflejado gráficamente en los histogramas de la Figura 1.

Por tanto, los niveles de ácido t,t-mucónico en el grupo expuesto ponen de manifiesto un aumento estadísticamente significativo (P<0.05) en relación al grupo control. Sin embargo, si tenemos en cuenta los valores de VLB establecidos por la ACGIH (500 µg/g creatinina), observamos que dicho valor sólo es superado por cuatro de los individuos expuestos.

Tabla 1. Concentraciones de ácido t,t-mucónico obtenidas para los dos grupos de exposición, tomando como factor de agrupación los hábitos de consumo de tabaco de los individuos.

	N	Concentración ác.t,t-mucónico (µg/g creatinina)
Controles ^a	30	133 ± 23
Rango		25 – 523
No fumadores ^a	20	105 ± 30
Fumadores ^a	10	184 ± 87
Expuestos ^a	48	228 ± 22 *
Rango		47 – 702
No fumadores ^a	27	217 ± 27
Fumadores ^a	21	243 ± 38

^a media ± error estándar. * P <0,01 en relación al grupo control.

Tabla 2. Valores medios obtenidos para los biomarcadores de efecto analizados en ambos grupos de exposición.

	N	AC (%) ± SE	Aneupl. (%)± SE	N	TL (µm) ± SE
Controles	22	1.36 ± 0.28	3.68±0.39	30	48.09 ± 0.74
Rango		(0-7)	(1-7)		(42.33-56.81)
Expuestos	41	2.46 ± 0.29 *	5.07±0.33*	48	52.90 ± 0.85 **
Rango		(0-14)	(1-10)		(40.94-64.99)

SE: Error estándar. * P <0.02 en relación al grupo control. ** P <0.01 en relación al grupo control.

Tabla 3. Efecto del tiempo de exposición en los valores de AC, aneuploidías y TL.

Tiempo de exposición	N	AC (%) ± SE	Aneupl. (%)± SE	N	TL (µm) ± SE
Controles	22	1,36 ± 0,28	3,68 ± 0,39	30	48,09 ± 0,74
≤ 4 años	12	2,17 ± 0,44	5,25 ± 0,57*	14	52,58 ± 1,78*
≥ 20 años	27	2,70 ± 0,39*	4,85 ± 0,41	32	52,60 ± 0,98*

SE: Error estándar. * P <0.05 en relación al grupo control.

2. Tests de genotoxicidad

En el ensayo del cometa, el parámetro seleccionado como representativo del daño sufrido por las células es la longitud de la cola del cometa (TL). Éste es calculado por el sistema de análisis como la medida en micras desde el centro del núcleo celular hasta el extremo que alcanza el ADN migrado.

Con respecto a las aberraciones cromosómicas, se han reflejado por separado las de tipo numérico (aneuploidías) y las de tipo estructural (AC). En este ensayo ha habido muestras en las que no se han podido localizar las 100 metafases completas requeridas, por lo que se han desestimado dichos individuos.

Los resultados obtenidos tras la realización de los dos tests de genotoxicidad se hallan recogidos en la Tabla II.

A la vista de los resultados obtenidos, es destacable el incremento significativo de los tres parámetros analizados para el grupo de individuos expuestos en rela-

ción a los pertenecientes al grupo control. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en otros estudios que detectan un incremento en la tasa de MN (Andreoli et al., 1997) y en el nivel de daño en el ADN (ensayo del cometa) en trabajadores expuestos a niveles bajos de benceno. Además, Carere et al. (1998) detectan un aumento en las frecuencias de

MN en trabajadores de gasolineras, aunque en este caso el incremento no alcanza la significación estadística.

2.1 Efecto del tiempo de exposición

Analizando la influencia del tiempo de exposición (años que cada individuo del grupo «expuestos» lleva trabajando en la unidad), se verificó que dicho tiempo era principalmente inferior a 4 años o superior a 20. Únicamente dos individuos se salen de esta agrupación, habiendo estado expuestos 10 y 12 años respectivamente. Por el hecho de ser únicamente dos, han sido excluidos de este análisis. Los resultados extraídos se hallan recogidos en la Tabla III.

Los resultados indican que existe un incremento estadísticamente significativo (P<0.05) en las frecuencias de AC y en los valores de TL para el grupo de exposición de más de 20 años en relación a los controles. Con respecto al otro grupo de exposición, se ha detectado un incremento significativo en los valores de aneuploidías y de TL, en relación a los controles.

2.2 Efecto del tabaco

Con objeto de tener en cuenta la posible influencia del tabaco, hemos realizado un nuevo análisis de los resultados obtenidos en los tests, tomando como factor de agrupación los hábitos de →

Tabla 4. Efecto del consumo de tabaco sobre los biomarcadores de efecto determinado.

	N	AC (%) ± SE	Aneupl. (%)± SE	N	TL (µm) ± SE
Controles					
No fumadores	15	1.67 ± 0.37	3.67 ± 0.51	10	48.33 ± 0.87
Fumadores	7	0.71±0.29	3.71 ± 0.57	10	47.62 ± 1.43
Expuestos					
No fumadores	22	2.05 ± 0.31	4.86 ± 0.48	27	53.97 ± 1.25
Fumadores	19	2.95 ± 0.51	5.32 ± 0.45	21	51.54 ± 1.08

SE: Error estándar.

Tabla 5. Efecto de la edad sobre los valores de aberraciones cromosómicas, aneuploidías y TL.

	Edad (años)	N	AC (%) ± SE	Aneupl. (%) ± SE	N	TL (µm) ± SE
Controles	<30	8	0.38 ± 0.18	4.38 ± 0.73	11	47.22 ± 1.06
	30-50	6	1.67 ± 0.21	3.33 ± 0.67	11	47.45 ± 1.27
	>50	8	2.13 ± 0.61*	3.25 ± 0.59	8	50.18 ± 1.49
Expuestos	<30	8	2.25 ± 0.45	5.00 ± 0.82	10	51.91 ± 2.00
	30-50	29	2.45 ± 0.39	5.14 ± 0.39	31	53.03 ± 1.09
	>50	4	3.00 ± 0.71	4.75 ± 1.11	7	53.80 ± 2.05

SE : Error estándar. * P <0,05 en relación al grupo de menor edad de la misma exposición.

consumo de los donantes. Los resultados se encuentran recogidos en la Tabla IV.

Los resultados no ponen de manifiesto una asociación entre los hábitos de consumo de tabaco sobre los biomarcadores empleados. Esta observación resulta concordante con varios estudios que tampoco detectan efecto directo del consumo de tabaco y los valores de genotoxicidad obtenidos mediante estos tests (Andreoli et al., 1997; Surrallés et al., 1997).

2.3 Efecto de la edad

Se sabe que el factor edad puede tener cierta influencia sobre la integridad genómica de los individuos, debido fundamentalmente a que con el transcurso del tiempo se suelen ir acumulando lesiones en nuestro ADN como consecuencia de fallos en los sistemas de reparación. En la Tabla V se evalúa el efecto de este factor sobre los parámetros de daño genético determinados en ambos grupos de exposición. Los individuos se han agrupado en tres categorías de edad, de acuerdo con su distribución de frecuencias.

El análisis pone de manifiesto una influencia de la edad sobre el parámetro AC estadísticamente significativo en la población control. En cuanto a los individuos expuestos, no se ha detectado influencia de este factor sobre ninguno de los tres parámetros estudiados.

Los resultados obtenidos en este estudio apuntan a que la exposición a BTX, incluso a bajos niveles, ocasiona efectos

genotóxicos. Como ya fue referido a lo largo de este estudio, los biomarcadores analizados están relacionados con el daño sufrido por el ADN y posiblemente con

el riesgo incrementado de incidencia de cáncer. Visto lo cual, se acentúa la importancia de reducir al mínimo la exposición a benceno. ♦

PARA SABER MÁS

[1] ACGIH (2003). Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati, American Conference of Governmental Industrial Hygienists.

[2] Andreoli, C., Leopardi, P. y Crebelli, R. (1997). Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutation Research* 377: 95-104.

[3] ATSDR (2000). Case studies in environmental medicine: Benzene toxicity. Atlanta, US Department of Health and Human Services.

[4] Carere, A., Antoccia, A., Cimini, D., Crebelli, R., Degrassi, F., Leopardi, P., Marcon, F., Sgura, A., Tanzarella, C. y Zijno, A. (1998). Genetic effects of petroleum fuels: II. Analysis of chromosome loss and hyperploidy in peripheral lymphocytes of gasoline station attendants. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (32): 130-138.

[5] Ducos, P., Gaudin, R., Robert, A., Francin, J.M. y Maire, C. (1990). Improvement in HPLC analysis of urinary trans, trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 62: 529-534.

[6] Faulkner, W.R. e King, J.W. (1976). Renal Function. *Fundamentals of clinical chemistry*. N. W. Tietz. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 994-998.

[7] IARC (1994) Some industrial chemicals. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 60. International Agency for Research on Cancer. Lyon.

[8] Kramer, P.J. (1998) Genetic Toxicology. *J. Pharm. Pharmacol.* 50: 395-405.

[9] Laffon, B.; Pérez-Cadahía, B.; Pásaro, E.; Méndez, J. (2003) Effect of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase genotypes on the induction of micronuclei and DNA damage by styrene-7,8-oxide. *Mutation Research*. 536 49-59.

[10] Lauwerys, R.R. (1990) Les cancers d'origine professionnelle. En: *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. Ed. Masson. Pp: 678-665.

[11] NIOSH (1994a). Special considerations for biological samples - appendix F. Manual of analytical methods. Ohio, U.S. Department of Health and Human Services; National Institute for Occupational Safety and Health.

[12] Parmeggiani, L. (1983). *Encyclopaedia of Occupational Health and Safety*. Geneva, International Labour Office.

[13] Raabe, G.K. e Wong, O. (1996). Leukemia mortality by cell type in petroleum workers with potential exposure to benzene. *Environmental Health Perspectives* 104(sup. 6): 1381-1392.

[14] Schnatter, R. (2000). Petroleum worker studies and benzene risk assessment. *Journal of Toxicology and Environ Health, Part A* (61): 433-437.

[15] Surrallés, J., Autio, K., Nylund, L., Järventaus, H., Norppa, H., Veidebaum, T., Sorsa, M. y Peltonen, K. (1997). Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene-exposed workers. *Carcinogenesis* 18(4): 817-823.

[16] WHO (1982). *Environmental Health Criteria 20: Selected petroleum products*. Geneva, World Health Organization.

[17] WHO (2000). *Benzene. Air quality guidelines*. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe.