

# NUEVO SIGLO, NUEVOS RIESGOS SANITARIOS Y AMBIENTALES EN EL AGUA

## NEW HEALTH AND ENVIRONMENTAL RISKS IN WATER FOR A NEW CENTURY

Rafael J. García-Villanova Ruiz \*

\* Catedrático de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca

### RESUMEN

Allá donde se ha impuesto una correcta gestión y control de las aguas han quedado minimizadas las amenazas que durante siglos pesaron sobre la humanidad. Sin embargo, nuevos riesgos emergen en la actualidad, unos inexistentes antes y otros desconocidos o considerados de escasa relevancia para las prioridades sanitarias del pasado.

Los llamados **subproductos de cloración** de las aguas son la cara menos amable de este hito que ha supuesto el empleo del cloro como desinfectante. Sus inconvenientes no son desde luego comparables a sus beneficios, pero en una población que aspira y ya posee mayor esperanza de vida y mejores estándares sanitarios, los estudios epidemiológicos han establecido con desigual certeza un mayor riesgo de cáncer. Por ello la Directiva Europea 98/83/CE limitó el contenido en el grupo de los **trihalometanos** a 100 µg/l, con abastecimientos de agua en su mayoría de origen superficial y, está planteando un verdadero problema el cumplimiento de este límite.

A pesar de las ingentes experiencias de **fluoración de aguas** en plantas potabilizadoras de Estados Unidos y Norte y Centroeuropa durante la segunda mitad del siglo xx, de resultados aparentemente positivos en la prevención de la caries dental, recientemente ha vuelto la controversia acerca de sus efectos nocivos no sólo sobre la dentadura y esqueleto (fluorosis) sino sobre diversos mecanismos metabólicos. Ya se afirma que puede ser nocivo incluso a la concentración en que se recomienda (1,0-1,5 µg/l), lo que en los últimos años ha producido una corriente partidaria de su supresión.

En las últimas décadas del pasado siglo, los planes de monitorización de aguas subterráneas han revelado que el **arsénico** está presente de forma más frecuente de lo que se pensó. El caso mejor estudiado es el de Taiwan, con unos diez mil casos de síndrome melanodérmico y cáncer cutáneo. La abundante documentación de este suceso y la aplicación de una metodología singular de estimación de riesgos (la toxicología del arsénico no ha encontrado un modelo experimental animal) impulsó recientemente el nuevo estándar de 10 µg/l por OMS y EPA reflejado en nuestra nueva legislación. Pero el caso más reciente y trágico es el de Bangla-Desh, con más de 40 millones de afectados de intoxicación crónica.

### ABSTRACT

In those where appropriate water management and control have been implanted, hazards that have endangered Humanity throughout time have been reduced. Today, however, new threats are emerging, threats previously unknown, inexistent or considered irrelevant in the past.

The so-called **chlorination by-products** of water are the other face of this landmark of the employ of chlorine as a disinfectant. Its drawbacks are by no means comparable to its benefits, but in a population with higher life expectancy and health standards, epidemiological studies have determined a higher cancer risk, to a variable certainty though. Consequently, European Directive 98/83/CE has established a limit of 100 µg/l for the group of trihalomethanes. Compliance with this limit it's been difficult for Spain as surface water is a main resource and, on the other hand, its warm climate favours its formation.

Extensive experiments on **water fluoridation** in United States and Central and Northern Europe showed, to a varying extent, a positive effect on dental caries. However, there is an increasing opinion on its side-effects with a result of both dentine and skeletal fluorosis. A number of authors state that even the current recommended dose in drinking water (1,0 to 1,5 g/l) could be deleterious. Controversy has raised throughout the last decade and has led to a tendency for suppression.

During the last quarter of the XXth century groundwater monitoring plans have revealed that **arsenic** is present more frequently than it was thought. The best known episode is that of Taiwan, with a result of some 10.000 cases of melanodermic syndrome and skin cancer. Since animal studies had failed in demonstrating a cancer induction or promotion with arsenic, the overwhelming records of that episode have permitted a risk estimation and, then, proposal for the new standard of 10 µg/l. A most tragic episode is that recent of Bangla-Desh, with more than 40 millions individuals affected of chronic intoxication, many of them with skin, lung and bladder cancers.

**Correspondencia:** Rafael J. García-Villanova, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca.

La eutrofización de las aguas continentales y costeras es un fenómeno muy generalizado, que alcanza también a nuestro país. Preocupa en la actualidad porque son cada vez más frecuentes las llamadas *floraciones* ("blooms") de **algas cianofíceas toxigénicas**. Se estima que más de la mitad de ellos han producido neuro o hepatoxinas en embalses y aguas remansadas. La acumulación superficial ("mantas") de algunas especies de cianofíceas o de costros y espumas en las orillas han sido causa de intoxicación letal del ganado. Más corriente es la irritación de ojos, erupciones cutáneas, vómitos, diarrea, fiebre y dolor en músculos y articulaciones en personas que han bebido o bañado en lugares con espumas procedentes de algas. Aunque no lo estipula la Directiva Europea, la nueva legislación española prescribe acertadamente el control de una de ellas: microcistina, 1ppb.

En las aguas residuales urbanas pueden estar presentes hasta 100 especies de **virus patógenos** para el hombre. Suelen pasar las plantas depuradoras de residuales sin verse afectados y sobrevivir en el medio acuático durante largos períodos, y así llegan a las plantas de potabilización convencionales, donde generalmente resisten la cloración. Sin embargo, sólo de unos pocos se ha demostrado su transmisión por el agua. Es el caso del de la Hepatitis A y, más recientemente, el de la Hepatitis E, endémicos en la región mediterránea. De otra parte, en la actualidad la gastroenteritis viral es la segunda causa de enfermedad infecciosa, después de las respiratorias, en países desarrollados y se atribuye fundamentalmente a Rotavirus y Normovirus (virus Norwalk like), con la vía hídrica como forma de transmisión.

*Cryptosporidium* siempre ha sido un parásito de animales, incluyendo los de compañía y granja. Sin embargo, en el año 1976 se reconoció como patógeno humano y la primera epidemia documentada que tuvo por origen el agua es aún más reciente, 1983. El brote epidémico más espectacular fue el de la primavera de 1993 en Milwaukee (Wisconsin), con 400.000 infectados por un agua municipal que cumplía todos los estándares legales. En pacientes inmunodeprimidos la infección es una amenaza de por vida, siendo la mayor causa de muerte entre los afectados de SIDA. La cloración convencional no le afecta, aunque los oocistos suelen ser retenidos en los filtros de las potabilizadoras, si bien no siempre de forma completa. La inseguridad es, pues, grande porque la dosis infectiva podría estar entre 1 y 100 oocistos.

**PALABRAS CLAVE:** Subproductos de desinfección, fluoración de aguas, floraciones toxigénicas de algas, virus acuáticos patógenos, criptosporidiosis.

## INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de agua apta para consumo humano, sea con o sin tratamiento de potabilización, alcanza en nuestro entorno geoeconómico a casi toda la población y es uno de los mayores hitos en Salud Pública, lentamente hecho realidad a lo largo del pasado siglo. Ello ha reducido a brotes esporádicos las enfermedades infecciosas transmitidas por este medio que, a la forma de epidemias durante siglos, asolaron a la humanidad.

Coastal and continental water eutrophication is a broadly generalized phenomenon, which affects Spain too. There is a recent concern about it because **toxigenic algal blooms** are more and more frequent. There is an estimation that half of them have produced neuro or hepatotoxins in dams and backwaters. The surface accumulation of some species of blue-green algae with crusts or foams by the shore is been known as a cause for lethal intoxication of cattle. More frequently can be found human episodes with eyes irritation, rashes, vomiting, diarrhea, fever and muscular and articulation pain in individuals after drinking or bathing in waters with foams from algae. The new spanish regulation establishes a control for microcystine, with a limit of 1 µg/l.

Waste waters may hold up to 100 especies of **human pathogenic viruses**. They usually cross through sewage treatment plants and survive in the water bodies for large periods, thus reaching the drinking water plants were they are not affected by the chlorine. However, only for a few there is evidence of transmission through water, as with the case of the Hepatitis A and E viruses. On the other hand, currently viral gastroenteritis is the second cause of infectious disease in developed countries. The agents are considered to be Rotavirus and Norovirus (Norwalk-like viruses) with a hydric transmission.

For years, *Cryptosporidium* has been considered an animal parasite, especially of cattle. In 1976 it was first recognized as a human pathogen, but not until 1983 it was documented the first epidemic transmitted by the water. In 1993 a big epidemic was declared at Milwaukee (Wisconsin) with some 400.000 affected, after ingestion of water from a distribution system which showed to comply with all the legal standards. In immunosuppressed patients, the infection is severe and with a high rate of death among those affected by SIDA. Conventional chlorination does not affect the oocyst, although much of them (but not always and not all) are retained by the filters. The risk and lack of safety is a fact, because the infective dose could be between 1 and 100 oocysts.

**KEY WORDS:** Disinfection by-products, water fluoridation, toxigenic algal blooms, pathogenic aquatic viruses, cryptosporidiosis.

Mucho menos complacientes podemos ser con la depuración de las aguas residuales. Resultado de la presión demográfica sobre los sistemas acuáticos continentales o costeros, la seguridad higiénica de las aguas de baño y, más allá de esto, el propio equilibrio de los ecosistemas acuáticos en la actualidad no alcanza a todos los lugares, si bien hay que reconocer los logros de las dos últimas décadas y, previsiblemente, el de final de 2005 cuando de-

berá ser una realidad en la Unión Europea la depuración integral de todas sus aguas continentales.

Para buscar una fecha histórica<sup>1</sup> en el tratamiento del agua para abastecimiento público, hay que remontarse al año 1804 en Paisley y tres años más tarde a la ciudad de Glasgow, también en Escocia, donde se instalan los primeros sistemas de filtración permanente a través de arena que consiguen retener buena parte de la carga bacteriana del agua. Hay que esperar un siglo para, en el año 1902, ver las primeras plantas municipales de cloración permanente en Middelkerke (Bélgica) y a 1912 en la pequeña y turística ciudad de Niagara Falls en Nueva York. De forma lenta continuó el cloro su implantación en el mundo desarrollado y, transcurridos cien años, en la actualidad pocas son las poblaciones de países con una mínima seguridad sanitaria que no lo empleen o hayan empleado en el pasado como desinfectante.

En contra de lo que se cree, no es tan reciente la tecnología de depuración de las aguas residuales<sup>2</sup>. Entre los años 1830 y 1870 se producen las últimas grandes epidemias de cólera y tifus en grandes ciudades Europeas (París, Londres, Hamburgo,...) y de Estados Unidos (en cuya Guerra de Secesión murieron más soldados de cólera y tifus que en combate). Sorprendentemente, el sistema de saneamiento individual que para entonces se ha prodigado, con canalización rápida de los efluentes fecales domésticos, acaba convirtiendo en cloacas las corrientes fluviales que sirven de abastecimiento a otras poblaciones, sin que el natural proceso de autodepuración pueda hacer mucho. Es decir, el problema se ha trasladado de lugar, pero persiste. Fue entonces, en 1871, cuando se produce el informe de la *Massachusetts State Board of Health*, que en 1887 pone a funcionar la *Lawrence Experiment Station*, verdadera pionera en la investigación de la tecnología de depuración de aguas, cuyas bases teóricas y técnicas sienta. En época tan temprana aparecen los primeros diseños de lechos de contacto (1890), fangos activados (1913) y filtros bacterianos (1920), hoy tan extendidos, que imitan el natural proceso de autodepuración a base de facilitar el asentamiento en ellos de la propia flora autóctona acuática, depredadora de la extraña flora fecal. Lentamente va incorporándose también toda esta tecnología a los grandes núcleos de población a lo largo del siglo XX, si bien en España la hemos conocido en época relativamente reciente.

Entretanto, la Unión Europea no ha permanecido ociosa. El último cuarto de siglo ha sido especialmente dinámico en la gestión, con la publicación de las Directivas relativas a:

1. Aguas Superficiales (1975)
2. Sustancias Peligrosas (1976)
3. Aguas de Baño (1976)
4. Aguas Pesqueras (1978)
5. Aguas para Cría de Moluscos (1979)
6. Aguas Subterráneas (1980)
7. Aguas para Consumo Humano (1980, 1998)
8. Tratamiento de Aguas Residuales Urbanas (1991)
9. Nitratos (1991)
- 10. Directiva Marco del Agua (2000)**

La paulatina adopción de esta última, la Directiva Marco, producirá la derogación de seis, manteniendo vigentes las de Aguas de Baño, Aguas para Consumo Humano (1998), Tratamiento de Aguas Residuales Urbanas y

la de Nitratos. Especial relevancia y esfuerzo inversor ha supuesto a los Estados Miembros el cumplimiento de la de Aguas Residuales Urbanas, por la que todo núcleo de población deberá poseer un colector y justificar un tratamiento de sus aguas residuales urbanas antes de final de los años 1998, 2000 o 2005, según su tamaño y ubicación.

Desde luego, la situación dista mucho de este idílico escenario en los llamados *Segundo y Tercer Mundo*. La OMS continúa afirmando que una mayoría de países, con unos 1.100 millones de habitantes, no tiene acceso a "agua limpia" y que, como consecuencia de ello, un 80% de las enfermedades padecidas por sus habitantes tiene todavía como causa última el agua y alimentos no higienizados. Y estima que unos 25.000 niños y adolescentes mueren cada día por infecciones gastrointestinales producidas por agua no desinfectada.

Junto a ello, nuevos riesgos emergen en la actualidad, unos inexistentes antes y otros desconocidos o considerados de escasa relevancia para las prioridades sanitarias del pasado.

### Subproductos de cloración

En el año 1974 J.J. Rook<sup>3</sup> describe la aparición en el agua de bebida, como consecuencia de su cloración, de un grupo de cuatro moléculas muy sencillas -un sólo átomo de carbono- fuertemente cloradas o halogenadas, a las que llama trihalometanos (THMs) o haloformos: cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ , mayoritario con diferencia), diclorobromometano ( $\text{CHCl}_2\text{Br}$ ) clorodibromometano ( $\text{CHClBr}_2$ ) y bromoformo ( $\text{CHBr}_3$ ), compuestos ya entonces conocidos con variable evidencia de carcinogenicidad. Sorprendidos por el hallazgo, el propio Rook se apresura a afirmar que su bajísima concentración "no constituye una inmediata amenaza para la salud pública y el bienestar", pero que "se hace necesaria más investigación sobre sus efectos a largo plazo". A partir de ese año y hasta la actualidad se ha producido un ingente número de publicaciones y reuniones científicas mostrando un verdadero elenco de compuestos químicos, que pasan a llamarse subproductos de cloración y, más tarde, subproductos de desinfección (*disinfection by-products*, *DBPs*) al comprobar que otros desinfectantes también los pueden producir.

Su formación se debe a la reacción de parte de la materia orgánica soluble y natural de las aguas (humina, ácidos húmicos y, sobre todo, fúlvicos) con el cloro. Este material llamado Sustancias Húmicas es, a su vez, la fracción más o menos soluble de un complejo conjunto de sustancias de alto peso molecular resultantes de la lixiviación de la capa orgánica del suelo, constituidas por los restos más inertes de la materia vegetal -hojas secas y fracción leñosa. La enorme variabilidad de su origen, dependiente de la flora y suelo de cada lugar, complica aún más el conocimiento de sus estructuras. Más recientemente se han añadido a ellas otros precursores: péptidos, aminoácidos, pigmentos vegetales y metabolitos de algas. Al ser degradados en el medio acuático con variable lentitud -las sustancias húmicas son especialmente resistentes- llegan, entretanto, a las plantas de cloración donde producen compuestos haloorgánicos, generalmente clorados -también bromados si las aguas contienen bromuro-, de uno o varios átomos de carbono.

De la complicada cinética de formación de estos compuestos, no obstante, se reconocen ya cuatro factores como determinantes:

- 1º. Alto contenido en precursores, es decir, de materia orgánica en el agua
- 2º. Altas dosis de cloro aplicadas
- 3º. Alta temperatura del agua y tiempo de contacto
- 4º. Desviaciones del pH de la neutralidad favorecen la formación de unos u otros.

### Toxicología y estudios epidemiológicos

La toxicología mejor conocida es la de trihalometanos y ácidos haloacéticos. El cloroformo no tiene evidencias significativas de teratogenicidad, pero sí de carcinogenicidad si bien su dudoso carácter mutagénico hace pensar en un mecanismo de inducción o incluso epigenético. Los otros tres presentan evidencias de actividad mutagénica y carcinogénica, más claramente descritas en caso del diclorobromometano. La *International Agency for Research on Cancer* (IARC) clasificó hace tiempo a cloroformo, diclorobromometano y, más recientemente, al ácido dicloroacético, en el grupo 2B ("posiblemente carcinogénicos en humanos").

Los estudios epidemiológicos se iniciaron hacia el final de los años 70 y ya entonces establecieron una muy variable correlación –desde muy estrecha a inexistente– entre consumo de agua clorada y cáncer de colon y vejiga urinaria. Hasta final de los 80 se obtienen altas correlaciones, aunque no en todos los casos, con cáncer de riñón, cerebro y linfoma no-hodgkin, corroborándose las de colon y vejiga. En este último, el de vejiga, algunos estudios relacionaron diferentes períodos de exposición (a partir de 40 años) y revelaron, además, el carácter potenciador del tabaco. Hacia mediados de la década de los 90 vuelve a confirmarse el de vejiga y aparece una nueva evidencia para el de recto. Y ya en los años próximos al 2000 aparecen estudios que relacionan con variable regresión la mayor prevalencia de abortos espontáneos en el primer trimestre, defectos en el tubo neural, bajo peso y muerte en neonatos. En el momento actual el registro mejor documentado es el de cáncer de vejiga y a él siguen los de colon y recto. Recientemente se han aplicado los valores de odds-ratio obtenidos de estudios norteamericanos a los niveles medios de exposición a THMs de la población española, atribuyendo sus autores<sup>4</sup> un riesgo aumentado de cáncer de vejiga de un 20% como media, con unos 600 fallecimientos anuales en la población española.

### Reglamentación

El hallazgo de Rook promovió en los años inmediatos la aparición de los primeros estándares: Estados Unidos, Canadá y Japón establecieron el límite en 100 µg/l. Los países europeos tuvieron una respuesta dispar. Holanda y Alemania fueron los primeros en establecerlos y los países meridionales los últimos, con la excepción de España, Portugal y Grecia que nunca lo hicieron. La Directiva 98/83/CE, transpuesta en el RD 140/2003, fijó por primera vez un límite para trihalometanos totales (TTHMs) en 100 µg/l, con una moratoria hasta el 2008 a petición del gobierno español, si bien a partir de Diciembre del 2003 no

podrá rebasarse el valor de 150 µg/l. En el momento actual los límites vigentes para TTHMs en cada país son distintos. Destacan siete países que ya los habían establecido por debajo de 100 µg/l antes de que lo hiciera la Directiva: Alemania (10), Holanda (20), y Francia, Italia, Austria, Luxemburgo y Suecia (30).

Estas diferencias no pueden ser sólo atribuibles a una diferente conciencia colectiva de la relación medio ambiente/salud, sino a algo mucho más difícil de salvar: el diferente origen (superficial o subterránea) y calidad del agua bruta y el diferente clima. El cumplimiento del límite que establece la nueva Directiva en muchos casos supondrá la introducción de cambios operacionales y de explotación importantes, cuando no de diseño, en las plantas de potabilización. Y todo ello habrá de hacerse sin menoscabo de la desinfección. Los costes derivados de ello pueden ser insignificantes para países como Austria o Dinamarca cuyo recurso procede en más del 95% de agua subterránea. En el otro extremo están países como España cuya agua potabilizada procede en un 75% de aguas superficiales. El cálido clima de los países meridionales y su recurso mayoritariamente superficial exige en las plantas convencionales, en general, dosis de cloración mayores y práctica de la cloración residual que garanticen la inocuidad del agua, favoreciendo consiguientemente la producción de subproductos de desinfección. Los altos valores medidos, especialmente en la estación cálida en que en ocasiones duplican y triplican lo permitido, son sin duda la causa de que hasta ahora no se hubieran impuesto límite alguno los tres países citados.

En Estados Unidos, la EPA estableció para todo abastecimiento un límite de 100 µg/l en el año 1998 para reducirlo a 80 µg/l a final de 2001, año en que además entró en vigor un nuevo estándar de 60 µg/l para la suma de cinco ácidos haloacéticos.

### Flúor y fluoración

El fluoruro suele acompañar a los fosfatos en sus yacimientos, con lo que podrá estar presente en algunas aguas subterráneas, o aparecer en las aguas superficiales por los vertidos de fábricas de fosfatos o de aluminio, pero no es algo frecuente. Es más frecuente su presencia por la práctica de la fluoración. Las ingentes experiencias de fluoración de aguas en plantas potabilizadoras de Estados Unidos y Norte-Centroeuropa durante los años 60 mostraron resultados aparentemente positivos en la prevención de la caries dental, especialmente en la primera dentición, pero no tanto en la definitiva. Como consecuencia de ello, cincuenta millones de habitantes de la UE beben agua fluorada en la actualidad –Alemania, Francia, Bélgica y Suiza mantienen muy extendida esta práctica. Cuarenta y dos de las cincuenta grandes ciudades de Estados Unidos practican la fluoración, lo que supone que un 60% de la población bebe agua fluorada<sup>5</sup>.

Y sin embargo recientemente ha vuelto la controversia<sup>6,7</sup> acerca de sus efectos nocivos a largo plazo sobre dentadura y esqueleto, y su responsabilidad en otras alteraciones metabólicas debidas a su fortísima capacidad complejante de oligoelementos. Ya se afirma que puede ser nocivo incluso a la concentración mantenida como máxima por la OMS<sup>8</sup> (1,5 mg/l), lo que en los últimos años

ha producido una corriente partidaria de la supresión de la fluoración sistemática. Así, Holanda y Finlandia la han suprimido hace varios años. La ciudad de Basilea, pionera en su aplicación desde hace cincuenta años, ha anunciado su supresión para este otoño. La *Canadian Dental Association*, la *Western Australian Health Authority* y la *German Scientific Dental Association* ya no recomiendan su suplementación, en tanto que Bélgica ha prohibido la venta de suplementos de flúor. Cabe preguntarse si el flúor, tal y como se suele estudiar, es un nutriente esencial. La mayoría de los manuales de Nutrición así lo consideran. Sin embargo, no se ha descrito otra misión fisiológica al fluoruro que la de introducirse en el hidroxapatito de la fracción mineral de hueso y dentina, reforzando su estructura. La *Food and Nutrition Board* recomienda un consumo de 3 a 4 mg F/día para hombre y mujer adultos, respectivamente, pero ingestas a partir de 6 mg F/día ya pueden producir fluorosis del tejido óseo<sup>8,9</sup>, y es en este escaso margen de seguridad donde radica la controversia entre los partidarios y detractores. Un estudio reciente<sup>10</sup> ha mostrado que la suplementación con fluoruro de liberación lenta en mujeres postmenopáusicas mejoró la densidad ósea y redujo las fracturas de cadera. Sí parece mantenerse que su eficacia contra la caries dental está en su acción tópica, como inhibidor del crecimiento de la placa bacteriana, pero en el momento actual resulta discutible el beneficio de su acción sistémica a la luz de los dispares resultados aportados por unos y otros autores. Finalmente, desde un punto de vista medioambiental resulta objetable el que para un aprovechamiento con estos fines de unos 2,5 l/habitante/día, se deba fluorar cantidades de casi 400 l/habitante/día como consumen algunas ciudades.

## Arsénico

*“Como saben, estamos estudiando los niveles aceptables de arsénico en el agua. Para basar nuestra decisión sobre datos sólidos, los científicos nos dijeron que había que realizar un experimento con los vasos de agua de unas 3.000 personas. Gracias por colaborar”*

George W. Bush  
Alocución a la Prensa durante una cena.  
Hotel Washington Hilton  
(*The New York Times*, 24-Abril-2001)

La broma puede o no agradar según el sentido del humor o, incluso, la simpatía personal que se profese por el conferenciante, pero da una idea de hasta donde alcanzó por esos días el debate público en Estados Unidos sobre el nuevo estándar de 10 µg/l para el arsénico en agua, una cuestión parece que más propia del ámbito científico y administrativo.

Aire, agua y alimentos son las tres fuentes de exposición humana al arsénico. Suelen ser los alimentos los que más contribuyen a la ingesta diaria de arsénico. En general, en casi todos los lugares del mundo el agua de abastecimiento no contribuye de forma importante. Las aguas superficiales lo contienen en cantidades enormemente pequeñas y las subterráneas aún menores. Pero no siempre es así. En algunas zonas el agua subterránea puede contener cantidades altas, en algunos casos cedidas por el terreno en tiempo reciente tras millones de años de permanecer retenidos por él en el propio acuífero.

Históricamente, el arsénico fue el primer compuesto químico al que se reconoció su carácter carcinogénico. Así fue hacia 1879, en que las altas tasas de cáncer de pulmón en los mineros de Sajonia fueron en parte atribuidas al arsénico inhalado. Unos años más tarde se conocía su responsabilidad en el cáncer de piel de pacientes tratados con medicamentos arsenicales, frecuentes en la época. Hubieron de pasar muchos años para que el IARC, basado en los datos de vigilancia farmacológica de arsenicales (piel) y en la exposición laboral (pulmón), lo clasificara en 1987 en el Grupo 1 (“carcinogénico en humanos”). Pero nada dijo en ese momento sobre el contenido en el agua de bebida.

La primera evidencia de que el arsénico presente en el agua de bebida podría producir cáncer de piel ocurre en la década de 1930 en Argentina<sup>11</sup>. Y ahí comienza la lenta cascada de áreas de población afectadas en las partes más distantes del Mundo, con los casos más dramáticos hacia final del pasado siglo xx, como veremos. En la década de 1960 de nuevo es en Argentina donde la evidencia del arsénico en el agua de bebida se extiende al cáncer interno, en particular de pulmón y tracto urinario<sup>11</sup>. Más tarde, en 1985, aparecieron los resultados de Taiwan que mostraban un aumento de mortandad por varios tipos de cáncer, especialmente de pulmón, vejiga y riñón. Se trataba de cantidades de más de 600 µg/litro en agua que, según se observó, elevaban en 30 a 60 veces las cifras de mortandad con respecto a la población no expuesta<sup>12</sup>.

Al contrario que otras sustancias clasificadas como cancerígenas, la carcinogenicidad del arsénico está basada en datos humanos y no en la extrapolación de datos de experimentación animal. Esta es la gran singularidad de la toxicología del arsénico. Los resultados obtenidos en animales de experimentación han sido hasta el momento inconcluyentes al no haber demostrado producir cáncer en ellos. No se ha encontrado un modelo animal adecuado y por el momento el mecanismo de carcinogénesis permanece desconocido, si bien una cierta evidencia apunta su carácter promotor más que iniciador<sup>9</sup>.

Ante esta dificultad, el cálculo del riesgo se ha debido basar exclusivamente en la extrapolación de datos epidemiológicos subsiguientes a episodios de intoxicación crónica suficientemente documentados. La OMS adoptó, entonces, el modelo obtenido por la USEPA a partir de los estudios epidemiológicos de cáncer de piel en Taiwan, que poseían excelentes registros, y comparados con los de Japón, Argentina y Chile durante los últimos 6 años. Así, pues, basado en el valor de 2 µg As/Kg de peso corporal para la Ingesta Diaria Provisional Tolerable (IDPT) propuesta por el JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*, 1988), y considerando que el agua contribuyera con un 20% al arsénico de la dieta, se obtenía el valor de 13 µg As/litro. El límite se estableció, finalmente, en 10 µg/litro, de lo que resultaba un riesgo añadido para cáncer de piel, en el período de vida, de  $6 \times 10^4$  (es decir, de 1 individuo entre 60.000, en 70 años de exposición)

## Resistencia a la adopción del nuevo límite

No ha resultado fácil a muchos países. Nada ha trascendido a la opinión pública en el caso de la Unión Europea. La Directiva que recoge este nuevo límite ha necesi-

tado, como es sabido, años de negociación pero en ningún documento hecho público se refleja controversia alguna sobre el arsénico. Para la Comisión Europea la autoridad de la OMS no es nunca discutida y sus dictámenes no precisan comprobación. Una recomendación hecha ya en 1993 no debía tener más trámite de espera.

Distinto es el caso de Estados Unidos, donde sus organismos de Salud funcionan con criterios propios, muchas veces incluso por delante de la OMS. Ya en 1962 el Servicio de Salud Pública (USPHS) recomendó no pasar de 10 µg/litro cuando existiera un suministro alternativo. En 1982, el Congreso encomendó a la EPA sustituir el valor de 50 µg/litro por un nuevo límite hacia 1989, pero no se hizo. Hasta Enero de 2001, en uno de los últimos actos de la administración Clinton, no se anunció el nuevo valor de 10 µg/litro. Dos meses más tarde, la nueva administración Bush retrasó su adopción, aduciendo un cuestionable rigor científico en la evaluación del riesgo y el considerable costo de las medidas. Finalmente, en Octubre del 2001, presionada por el Congreso y tras dos informes del *National Research Council* que denunciaban una infraestimación del riesgo de cáncer en el estándar de 50 µg/litro, la EPA adoptó el nuevo límite, estableciendo su obligación para todo abastecimiento en el año 2006.

Con un conocimiento tan antiguo y abundancia de datos sobre la carcinogenicidad del arsénico y con el rigor que se supone al método de estimación de riesgos, ¿por qué se produce esa resistencia a la adopción del nuevo límite tanto por OMS como por EPA?. La primera razón es una objeción metodológica a la estimación. Los estándares en aguas para consumo humano se han basado siempre en datos de experimentación animal, con poca o nula contribución de estudios en humanos. Pero, como ya se ha dicho, en el caso del arsénico no se ha encontrado un modelo animal. Para otros cancerígenos regulados en aguas se han admitido niveles de incertidumbre altos en la extrapolación de datos de roedores a humanos. Pero en el empleo de los estudios epidemiológicos se ha producido una resistencia a aceptar los niveles de incertidumbre -que toman en consideración la interferencia de alguna otra causa de enfermedad- a pesar de ser mucho más bajos<sup>11</sup>.

### Planes de monitorización

La geoquímica ha reconocido ya los materiales responsables de la cesión del arsénico a las aguas subterráneas, aunque aún no conoce todos los mecanismos que la desencadenan. Por ello, no se asegura en la práctica la predicción de los niveles de arsénico en un agua subterránea particular. Y lo que es peor, estos niveles pueden verse modificados en pocos años, lo que deberá tenerse en cuenta en zonas de riesgo elevado estableciendo una monitorización frecuente.

El más ambicioso conocido en aguas subterráneas fue el llevado a cabo por el *United States Geological Survey* (USGS) para el *National Water Information System*<sup>12</sup>. Los resultados comenzaron a ser publicados en el año 2000, mostrando que el 1% de estos abastecimientos excedían de 50 µg/litro y el 8% excedían de los 10 µg/litro. Esto se produce de forma más frecuente en los estados del Oeste (especialmente del Suroeste) y en partes del centro y Nueva Inglaterra.

El caso más dramático es el de Bangladesh<sup>14,15</sup>. El análisis se realizó en 1998 por el *British Geological Survey* sobre 2.022 muestras de agua subterránea usada para abastecimiento, de las que resultó un 35% con niveles superiores a 50 µg/litro, y un 8,4% con más de 300 µg/litro. El estudio no fue preventivo sino subsiguiente a los trágicos registros de cáncer de pulmón, vejiga y piel en la población, revelando que desde hace 30 años más de 21 millones de personas han estado expuestas a cantidades mayores de 50 µg/litro. Se trata de la mayor intoxicación colectiva de la historia reciente. Cuando se produce la descolonización de Bangladesh, un plan de protección de la salud decide promover la extracción de agua subterránea, microbiológicamente más segura, para acabar con los frecuentes brotes producidos por el consumo de aguas superficiales contaminadas por la carencia de saneamiento. Desgraciadamente, en aquel entonces los análisis realizados por el propio *British Geological Survey* no contemplaron el arsénico.

En lo que se refiere a España no tenemos más conocimiento que del plan de monitorización<sup>16</sup> llevado a cabo en la Comunidad de Madrid por el Gobierno Regional en los años 1999 y 2000. De 353 abastecimientos subterráneos analizados, un 22,6% poseían valores entre 10 y 50 µg/litro y localizados en una franja de noreste a suroeste; y un 3,7% (16 abastecimientos) poseían valores superiores a 50 µg/litro, situándose en la zona noreste de la provincia. Según un estudio geológico llevado a cabo más recientemente, corresponde esta zona al gran Acuífero Detrítico Terciario de Madrid, caracterizado por alto tiempo de residencia, con valores altos de pH y nivel freático fluctuante derivado de su alta explotación.

Finalmente, en el año 2000 se tuvo conocimiento de los altos niveles de arsénico en las aguas subterráneas del acuífero de Arenales situado entre las provincias de Valladolid, Segovia y Ávila, viéndose afectado el abastecimiento de unas 40 poblaciones. La Junta de Castilla y León constituyó con toda urgencia una mancomunidad para abastecimiento de agua superficial, con captación del río Eresma, y se encargó a nuestro equipo un plan regional de monitorización plurianual en los abastecimientos de agua subterránea, coordinado por la Consejería de Sanidad y Bienestar Social.

### Cianofíceas toxigénicas

Eutrofización se denomina al fenómeno de enriquecimiento en nutrientes (eu = rico; trofos = alimento) de un ecosistema acuático. En la práctica se refiere al aporte de nitrógeno y fósforo, los nutrientes limitantes de la producción primaria, es decir, de la biomasa constituida por algas y macrofitos acuáticos. Algas y macrofitos son deseables en el medio acuático, pero su sobreproducción en aguas continentales y costeras ya fue reconocida en los años 60 como un problema medioambiental, porque amenaza el equilibrio de los ecosistemas acuáticos; técnico, porque dificulta el aprovechamiento y tratamiento del agua, y finalmente sanitario. Nos ocuparemos sólo de este último.

Son cada vez más frecuentes las llamadas floraciones ("blooms") de algas cianofíceas. También llamadas cianobacterias o algas verde-azuladas, se encuentran de forma natural en toda masa de agua superficial y hoy se recono-

cen unas 2.000 especies. Pero sólo unas 40 de ellas son toxigénicas. Estas floraciones son frecuentes en embalses y aguas remansadas, con acumulación superficial ("mantas") o formación de costras y espumas en las orillas. Sin embargo, el misterio envuelve todavía su comportamiento<sup>18</sup>. Sus toxinas son metabolitos secundarios producidos en circunstancias que aún se desconocen. *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* y *Oscillatoria* son los géneros más frecuentemente identificados en floraciones tóxicas, pero no todas las especies las producen, ni todos los taxones de una misma especie. Tampoco el grado de eutrofización determina de forma clara su floración y el que ésta sea tóxica o no. Si bien son más frecuentes en primavera y final de verano, aún se desconocen las condiciones climáticas desencadenantes de la producción de toxinas y su conocimiento se ve dificultado por un comportamiento circadiano plurianual.

Las más frecuentemente formadas son hepatotoxinas, como la microcistina (de la que a su vez se conocen más de 60 estructuras), en climas templados a cálidos. Afortunadamente, las neurotoxinas son menos frecuentes, pero en cantidad suficiente pueden producir bloqueo de la neurotransmisión con parálisis respiratoria y muerte en varios minutos u horas. Se han identificado como causa de intoxicación letal del ganado. Otras más corrientemente producen irritación de ojos, erupciones cutáneas, vómitos, diarrea, fiebre y dolor en músculos y articulaciones en personas que han bebido o se han bañado en lugares con espumas procedentes de algas.

En España el fenómeno está poco estudiado, con la excepción del río Guadiana en su tramo extremeño<sup>19</sup>. Aunque no lo estipula la Directiva Europea, la nueva legislación española prescribe el control de una de ellas, microcistina, con el límite de 1ppb.

### Virus acuáticos

Como disciplina científica la virología acuática, hoy llamada ambiental, nació tras el gran brote epidémico de hepatitis, con 30.000 casos, ocurrido en Nueva Delhi en diciembre de 1955 y que tuvo su causa en la contaminación por aguas residuales del río Jumna, contaminación que no pudo eliminar la potabilización convencional. En esos años cincuenta ya se había iniciado la búsqueda del virus de la poliomielitis en el agua, uno de los más investigados y encontrados en ella, y que hoy la vacunación casi ha eliminado del Planeta.

Los virus entéricos humanos son eliminados por las heces y, por tanto, van a los efluentes residuales urbanos. En ellos van agregados o adheridos sobre las partículas sólidas, acumulándose en los sedimentos donde persisten y sobreviven más tiempo que en el propio agua. Los sedimentos acuáticos actúan, pues, como reservorio, desde donde se resuspenden a la columna de agua. En tanto no encuentran células humanas donde multiplicarse –son específicos de huésped y solo se multiplican en ellas– resisten en el agua o el sedimento, y lo hacen más que las bacterias. Ni el tratamiento convencional de potabilización ni el de depuración los eliminan.

Se conocen hasta 100 especies patógenas para el hombre, pero sólo de unos cuantos se ha demostrado que se

transmitan por el agua. Los virus entéricos ingresan en el organismo por la boca, a través del agua o los alimentos, infectando las células intestinales o las hepáticas.

### Hepatitis A

La forma más común de transmisión del virus es la ruta fecal-oral. De escasa gravedad<sup>20</sup>, su tasa de incidencia en España ha evolucionado favorablemente: en 1989 era de 56,28 casos/100.000 habitantes, mientras en 2000 se ha reducido a 2,48. Se trata de uno de los primeros resultados del aumento de calidad de los suministros de agua y de la eliminación y tratamiento de residuales.

### Hepatitis E

Es clínicamente indistinguible de la Hepatitis A, pero cursa de forma algo más virulenta, generalmente sin secuelas<sup>21</sup>. Más frecuente que la A, se estima que probablemente el 20% de la población mundial ha estado infectada por el virus. Las rutas de transmisión son la fecal-oral y de persona a persona. El mayor brote epidémico se produjo entre 1986-88 en Xinjing (China) con 119.000 casos documentados. Al igual que la hepatitis A, no tiene vacuna ni tratamiento, por lo que solo se combate con la prevención y la higiene. Ambos virus son endémicos de la región mediterránea, donde se sabe que ha sido el agua el transmisor, con importantes brotes epidémicos de hepatitis.

### Gastroenteritis viral

La gastroenteritis aguda no bacteriana causa casi el 40% de las infecciones diarreicas colectivas en países desarrollados. Es, pues, la segunda causa más común de enfermedad infecciosa, después de las respiratorias de vías superiores, en nuestro entorno. Los agentes más frecuentes son Rotavirus y Norovirus (un reciente nombre para los virus de Norwalk). Los Rotavirus<sup>22</sup> son la principal causa de gastroenteritis en niños, con muerte en los de menor edad –a partir de los 3 años ya adquieren el anticuerpo con el que quedan inmunizados. También es importante causa de mortandad en ancianos. El virus de Norwalk<sup>23</sup> produce el llamado "mal invernal del vómito", por aparecer más frecuentemente en esa época del año. Infecta entre las 4 y 48 horas de exposición al agua.

Los síntomas más frecuentes de la gastroenteritis viral son: dolor y calambre abdominales, diarrea, náuseas y vómitos. Tampoco tienen tratamiento alguno, salvo la necesaria rehidratación. Ni siquiera los medicamentos anti-diarréicos son aconsejables porque pueden prolongar el proceso infeccioso. Se calcula que entre 10 y 20 millones de personas mueren cada año de gastroenteritis viral y que los rotavirus son responsables de la muerte anual de 1 millón de niños.

### Necesidad de indicadores

A pesar de la dificultad del diagnóstico y reconocimiento de las infecciones virales, hoy se reconocen tres hechos en la epidemiología de las gastroenteritis virales:

1.º Como se ha dicho, los virus entéricos persisten más tiempo en el agua que las bacterias entéricas.

2.º Los virus entéricos se detectan en aguas donde los indicadores de bacterias fecales son negativos, como se ha demostrado en muchos casos de brotes epidémicos.

3.º El riesgo de infección es de 10 a 10.000 veces menor para bacterias que para virus y protozoos, y la dosis infectiva es mucho menor en los virus.

Estos tres hechos explican el error que ha supuesto el utilizar y seguir utilizando indicadores bacterianos para determinar la calidad o potabilidad del agua para consumo humano y muestran la necesidad de utilizar indicadores virales. Lo ideal sería su reconocimiento directo en agua, pero son muchos los virus patógenos entéricos y son muchas las dificultades técnicas para su análisis, lo que hace todo ello impracticable. Sin embargo, sí es posible usar como indicador de contaminación fecal viral alguno de estos tres bacteriófagos: colifagos somáticos, colifagos F-específicos y bacteriófagos de *Bacteroides fragilis*. Así fue demostrado en el estudio realizado para la Junta de Castilla y León en aguas de abastecimiento de siete poblaciones. La reciente Directiva Europea no contempla este parámetro, relativamente sencillo y que podría reconocer a tiempo la presencia de enterovirus. Quizá haya pesado en ello la propia dificultad de su eliminación mediante el tratamiento de potabilización convencional, si bien en nuestro estudio se demostró siempre su desaparición.

### Criptosporidiosis

Durante muchos años ha sido una enfermedad de animales de abasto, especialmente del vacuno. En 1976 se encontró en heces de humanos; y en 1982 ya se describe por primera vez como patógeno en el hombre. En 1987 se conoce en Carrollton (Georgia, EEUU) el primer brote producido por las aguas de una red de distribución que cumplía todos los estándares y controles legales, con 13.000 afectados. Pero es en la primavera de 1993, en Milwaukee (Wisconsin), donde se produce el caso más espectacular y mejor documentado, también en una red de distribución correctamente gestionada, con 400.000 afectados.

*Cryptosporidium parvum*<sup>24</sup> es por ahora la única especie patógena. Se trata de uno de los protozoos más pequeños, de unos 4 a 6 µm –es decir, unas diez veces el tamaño de una bacteria– que se excreta en heces y, por tanto, de transmisión fecal-oral. En las aguas superficiales resiste largo tiempo a la forma de ooquiste. La escorrentía de las aguas pluviales sobre el terreno donde se encuentran heces de animales contribuye de forma importante a su conducción a los cauces de agua que luego servirán para abastecimiento. La cloración no elimina los ooquistes; la filtración por los lechos de arena de las plantas convencionales pueden retenerlos, pero no siempre o no todos, lo que unido a su desconocida dosis infectiva (podría ser de incluso un solo ooquiste) supone incertidumbre y permanente riesgo. La turbidez debe hacer sospechar de su presencia, que habrá de comprobarse. Por ello, acertadamente, el nuevo RD 140/2003 estipula que cuando el recuento de *Clostridium perfringens* sea positivo y la turbidez exceda de 5 UNF se determine a la salida de la planta potabilizadora o depósito.

En aguas brutas destinadas a abastecimiento de varias poblaciones de Castilla y León ha sido encontrado, pero hasta ahora no en el agua potabilizada, según estudio realizado por el Departamento de Microbiología de nuestra Universidad. A pesar de su frecuente presencia en las aguas es poco reconocido aún como factor etiológico de cuadros gastrointestinales, por la dificultad de su diagnóstico. En individuos normales provoca gastroenteritis limitadas (diarrea líquida con deshidratación, dolor de estómago, náuseas y dolor de cabeza), que pueden perdurar hasta dos semanas, pero en pacientes inmunodeprimidos la infección es una amenaza continua, siendo la mayor causa de muerte entre los afectados de SIDA. Por el momento no posee tratamiento farmacológico alguno.

### CONCLUSIÓN

La potabilización de las aguas de abastecimiento para consumo humano alcanza en nuestro entorno a casi toda población. Desgraciadamente no podemos decir lo mismo para las aguas de baño: resultado de la presión demográfica sobre los sistemas acuáticos continentales o costeros, la seguridad higiénica en la actualidad no alcanza a todos los lugares, lo que obliga a su vigilancia periódica hasta tanto no se haya producido la depuración integral de todas las aguas continentales. Desde luego, nos estamos refiriendo a nuestro entorno geoeconómico, parte ya de ese llamado Primer Mundo. La situación dista mucho de este idílico escenario en los llamados Segundo y Tercer Mundo.

Aunque no se cumplan estrictamente los plazos, es previsible el éxito de los planes de saneamiento de aguas diseñados hace ya años en la UE. La protección de las aguas superficiales, tan invocada en todas sus directrices, tiene especial importancia en nuestro país donde constituyen más del 70% del recurso natural para abastecimiento. Aunque se ha avanzado mucho en el último decenio, todavía no es suficiente en nuestro país el cumplimiento de los controles analíticos de aguas para consumo humano. Entregada esta obligación a los municipios y la responsabilidad de hacerlo cumplir a la Administración Autonómica, todavía no alcanza a todo abastecimiento este cumplimiento ni en el número de parámetros controlados ni en su frecuencia. Por ello, son recomendables iniciativas de planes de monitorización regionales sobre parámetros químicos y biológicos, sean de obligado cumplimiento, o sean otros no prescritos por la legislación pero de especial interés –como los de virus acuáticos o protozoos–, que contribuyan al conocimiento de su epidemiología.

Finalmente, sería deseable extender a los sistemas de abastecimiento de agua la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC). Progresivamente introducido en nuestro país, aunque aún de forma incompleta, a todo el sector alimentario, y comprobados ya los logros de su aplicación, debiera extenderse a los sistemas de producción de agua potable, desde recurso natural hasta el grifo del consumidor. Nuestra experiencia nos muestra que especialmente los pequeños abastecimientos adolecen de medidas preventivas muy elementales que un plan de APPCC vería y resolvería de forma inmediata.



**BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Laughlin J. History of Water. World of Water 2000, Supplement to PennWell Magazines; 1999, 8-22.
- 2.- Wolfe P. History of Wastewater. World of Water 2000, Supplement to PennWell Magazines; 1999, p. 25-40.
- 3.- Rook JJ. Formation of haloforms during chlorination of natural waters. Water Treat. Exam 1974; 23: 234-43.
- 4.- Villanueva CM, Kogevinas M, Grimalt JO. Cloración del agua potable en España y cáncer de vejiga. Gac Sanit 2001; 15: 48-53.
- 5.- AQUA News. J Water SRT-Aqua 1999; 48: vi.
- 6.- <http://www.orgsites.com/ny/nyscof/>.
- 7.- <http://www.fluoridealert.org/fluoridation.htm>.
- 8.- [http://www.who.int/docstore/water\\_sanitation\\_health/GDWQ/draftchemicals/list.htm](http://www.who.int/docstore/water_sanitation_health/GDWQ/draftchemicals/list.htm).
- 9.- [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/oldcomm7/out09\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/oldcomm7/out09_en.html).
- 10.- Pak CYC. Treatment of postmenopausal osteoporosis with slow release of sodium fluoride: Final report of a randomized controlled trial. Ann Internal Med 1995; 123: 401-6.
- 11.- Smith HA, Lopipero PA, Bates MN, Steinmaus CM. Arsenic Epidemiology and Drinking Water Standards. Science 2002; 296: 2145-6.
- 12.- Chen CJ, Kuo TL, Mu MM, Arsenic and cancer, Lancet 1988, 1:414-5.
- 13.- [http://co.water.usgs.gov/trace/pubs/arsenic\\_fig1.html](http://co.water.usgs.gov/trace/pubs/arsenic_fig1.html).
- 14.- Smith HA, Lingas EO, Rahman M. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. Bulletin of the World Health Organization 2000, 78:1093-103.
- 15.- <http://www.rnw.nl/development/html/030506arsenic.html>.
- 16.- Aragonés Sanz, N, Palacios Diez M, Avello de Miguel A, Gómez Rodríguez P, Martínez Cortés M, Rodríguez Bernabeu MJ. Nivel de arsénico en abastecimientos de agua de consumo de origen subterráneo en la Comunidad de Madrid. Rev Esp Salud Pública 2001, 75: 421-32.
- 17.- Hernández García ME. Naturally occurring arsenic in groundwater of the Madrid tertiary detrital aquifer (Spain) 2002. [http://gsa.confex.com/gsa/2002AM/finalprogram/abstract\\_40496.htm](http://gsa.confex.com/gsa/2002AM/finalprogram/abstract_40496.htm).
- 18.- <http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/ciano/ciano-bacterias.htm>.
- 19.- Cameán AM, Moreno I, Floraciones tóxicas de cianobacterias detectadas en el suroeste de la península ibérica. Rev Toxicol 2002. 19:97-9.
- 20.- <http://www.cfsan.fda.gov/-mow/chap31.html>.
- 21.- <http://www.cfsan.fda.gov/-mow/chap32.html>.
- 22.- <http://www.cfsan.fda.gov/-mow/chap33.html>.
- 23.- <http://www.cfsan.fda.gov/-mow/chap34.html>.
- 24.- <http://www.cfsan.fda.gov/-mow/chap24.html>.