

El efecto hormético en sustancias biocidas de interés sanitario

THE HORMETIC EFFECTS OF BIOCIDES OF SANITARY INTEREST

Luis MORALES FERNÁNDEZ, Elena MORENO ROLDÁN, Elena ESPIGARES RODRÍGUEZ

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, Campus Universitario de Cartuja, 18071 Granada, España.

Correspondencia: Elena Espigares. Correo-e: elespi@ugr.es

RESUMEN

Se realiza una revisión sobre el efecto hormético de diversos grupos de sustancias. Se puede afirmar, en concordancia con lo señalado en los trabajos publicados, que la hormesis es más frecuente de lo que habitualmente se piensa, y también coinciden en que el efecto hormético no suele ser muy elevado, aunque sí significativo en cuanto a los efectos positivos que puede producir, con una gran trascendencia en el campo de la salud pública.

Palabras clave: Hormesis, efecto hormético, toxicidad, evaluación de la toxicidad.

INTRODUCCIÓN

La palabra biocida proviene del griego "*bios*" que significa vida, y "*cida*" que se puede traducir como "el que mata". Se considera sustancia biocida aquella que mata organismos vivos.

Los biocidas pueden ser sustancias químicas, de origen natural, sintéticas o también microorganismos. El objetivo de estos elementos es destruir, inhibir, contrarrestar, eliminar o hacer desaparecer aquellos organismos que para el ser humano sean nocivos o causen algún tipo de problema que pueda ser resuelto con la desaparición del organismo perjudicial (RODRÍGUEZ y GOMARIZ, 2002).

Ninguna clasificación individual es aplicable a todo el espectro de agentes tóxicos, por lo que pueden ser necesarias combinaciones de sistemas de clasificación o una clasificación basada en otros factores para proporcionar el mejor sistema para un propósito especial. No obstante, es muy probable que los sistemas de clasificación que tengan en cuenta las propiedades químicas y biológicas de un agente y las características de exposición, sean útiles para fines legislativos o de control y para la toxicología en general (EATON y KLAASSEN, 1975).

Como se indica en la normativa española (REAL DECRETO 1054/2002), los biocidas se clasifican en 4 grupos y cada uno con sus subgrupos para diferenciarlos en función de las características

peculiares de cada uno; así pues tenemos Grupo principal 1 (desinfectantes y biocidas generales), Grupo principal 2 (conservantes), Grupo principal 3 (plaguicidas), y Grupo principal 4 (otros biocidas).

A nivel de Europa (REGLAMENTO (UE) 528/2012) se establecen distintas familias según los grupos de biocidas que tengan usos similares, las mismas sustancias activas, una composición similar con variaciones especificadas, y unos niveles similares de riesgo y eficacia.

Teniendo en cuenta toda la reglamentación que rodea a los biocidas, nos da indicios de la importancia para la salud que estas sustancias acarrearán, como bien se indica en el citado reglamento, se considera que los biocidas son necesarios con fines de control de los organismos nocivos para la salud humana o animal y de control de los organismos dañinos para los materiales naturales o manufacturados; sin embargo, pueden implicar riesgos para las personas, los animales y el medio ambiente, debido a sus propiedades intrínsecas y a las pautas de uso correspondientes. Son sustancias que no se deben comercializar ni usar si no han sido autorizadas de conformidad con los citados reglamentos. No deben introducirse en el mercado composiciones de diversos biocidas salvo en caso de que todas las sustancias activas con las que hayan sido tratados o que lleven incorporadas los biocidas, hayan sido aprobadas.

Uno de los objetivos de estos reglamentos por los

que se establece la comercialización y uso de los biocidas es asegurar un elevado nivel de protección de la salud humana, animal y del medio ambiente, prestando especial atención a la protección de grupos vulnerables de la población como las mujeres embarazadas y los niños.

Desde muy antiguo se han utilizado procedimientos de destrucción de microorganismos de forma empírica, sin base científica; así pues se usaban sustancias biocidas sin ser muy conscientes del porqué de esa acción. Ya en 1850 el permanganato de potasio se comenzó a usar como desinfectante.

Un avance importante en este aspecto, es debido a Oliver Wendell Holmes, médico y escritor de novela y poesía, que nació y vivió en el estado americano de Massachusetts. Las ideas deterministas de Holmes le llevaban a la creencia de que el hombre era el producto de su herencia genética y el medioambiente. Desde el punto de vista de la desinfección, en 1843 fue la primera persona que dilucidó el carácter infeccioso de la fiebre puerperal y su transmisión entre médicos y enfermeras (GUILLERMO, 1999).

Ignacio Felipe Semmelweis fue un médico húngaro que consiguió disminuir drásticamente la tasa de mortalidad por sepsis puerperal entre las mujeres que daban a luz en su hospital mediante la recomendación a los obstetras de que se lavaran las manos con una solución de cal clorurada antes de atender los partos. La comunidad científica de su época lo denostó y acabó falleciendo víctima de septicemia a los 47 años en un asilo (GUILLERMO, 1999).

Más tarde, en 1867, Joseph Lister desarrolla el principio de la asepsia en la práctica quirúrgica. Relaciona la inflamación con la infección en las heridas, y escoge el fenol como desinfectante, conocido desde 1834 y utilizado previamente en 1860 por Kuchenmeister en Alemania y Lemaire en Francia. Lister pensaba que la mayor fuente de microorganismos infecciosos en cirugía eran las manos e instrumentos sucios del cirujano. Aunque el fenol concentrado era tóxico para los tejidos, observa que diluido 1:20 e incluso 1:40 era efectivo, aplicándose su método en diversos hospitales con una disminución de la tasa de infección quirúrgica desde el 90 al 15%. (JOSEPH, 1867).

Durante el siglo XIX, algunos científicos notaron que la generación de un arco eléctrico desprendía un olor muy particular. Dichas descargas transforman el oxígeno del aire, formado por dos átomos de oxígeno, en otra molécula de tres átomos. De esta manera se descubrió el ozono. Poco tiempo después se encontró que el ozono era uno de los desinfectantes más poderosos de la naturaleza, y que podía ser utilizado para desinfectar agua, aire y alimentos. Se empezó a emplear para esterilizar el agua en la ciudad de Oudhoorn (Holanda) en 1893, y después en París (Francia) en 1898, Wiesbaden (Alemania) en 1901, Niágara Falls (U.S.) en 1903, y Madrid (España) en 1910. En Niza (Francia) se ha utilizado ininterrumpidamente desde 1906.

En 1905 Kinnaman publica un resumen del trabajo de varios investigadores sobre el valor desinfectante de varias sustancias químicas, entre las que incluye bicloruro de mercurio, fenol, etanol, peróxido de hidrógeno, yodo, yodoformo, formaldehído, ácido benzoico, ácido salicílico y permanganato potásico entre otros (KINNAMAN, 1905).

A partir de Flemming se puede considerar un cambio muy importante en la disponibilidad de agentes antimicrobianos. En 1928 interpretó acertadamente la interacción entre *Penicillium notatum* y *Staphylococcus*, descubriendo la penicilina. Pero la industria química en la Segunda Guerra Mundial realiza un avance muy importante con la síntesis de muchas sustancias orgánicas de aplicación bélica, que luego derivarían hacia usos sanitarios como biocidas (insecticidas, fitosanitarios, desinfectantes, etc.). Desde el final de la guerra se ha producido un profundo cambio en las enfermedades infecciosas, enfermedades que entonces tenían altas tasas de incidencia y mortalidad han pasado a ser menos frecuentes y menos graves, mientras que otras enfermedades emergentes y reemergentes han cobrado una gran importancia.

Actualmente la desinfección está muy extendida como técnica general de saneamiento en la prevención primaria y secundaria de enfermedades infecciosas, tratamiento sanitario de residuos, industria alimentaria, depuración de las aguas de consumo público, etc.

Desde la primera referencia a la desinfección de las aguas en 1827, cuando Alcock recomienda el uso del cloro para la purificación del agua de bebida, se puede decir que la cloración ha aportado un mayor beneficio que cualquier otra acción sanitaria. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80 % de las enfermedades infecciosas se transmiten mediante el agua y 1800 millones de personas en todo el mundo utilizan fuentes de agua con contaminación fecal. Según dicho organismo más de 1.7 millones de niños menores de 5 años mueren cada año por causa de enteritis imputables a la no-desinfección del agua (OMS, 2017).

La cloración del agua es el principal sistema de desinfección que garantiza que ésta llegue a nuestros hogares con las debidas condiciones sanitarias. El cloro y sus derivados tienen una importante aplicación en el área de la desinfección. El uso del hipoclorito (lejía doméstica) garantiza una total protección contra microorganismos, por lo que se utiliza también en la desinfección de material quirúrgico e instalaciones sanitarias y hospitalarias. En 1991 la supresión del uso del cloro en la potabilización del agua provocó una epidemia de cólera en Perú que produjo más de 3000 muertes (más de 19000 personas murieron por dicha causa en todo el mundo). Las epidemias surgidas en Ruanda como consecuencia de la guerra civil han sido controladas gracias al cloro y sus derivados. La epidemia de peste neumónica aparecida en la India en 1994 ha sido controlada mediante el antibiótico tetraciclina, en cuya obtención interviene el cloro (JIMÉNEZ BUILES y cols., 2004).

Esterilización y desinfección siguen siendo técnicas generales de saneamiento que seguirán teniendo una gran relevancia en la prevención de las enfermedades infecciosas, siendo necesarias continuas investigaciones que den lugar al desarrollo de nuevos productos y procedimientos más eficaces (SÁNCHEZ y SAENZ, 2005).

Todas estas sustancias se deben tener en cuenta por la contaminación que producen en el medio ambiente, en los alimentos y los problemas de salud que conlleva. Existen artículos e informes de la OMS en los que se hace constar de la incidencia e importancia que tiene la contaminación ambiental. Por ejemplo la que se destaca con diferentes tipos de metales, como sucede con el informe de la OMS (2017), en el que se dice que se está produciendo una mortalidad infantil consecuencia de esta contaminación ambiental. Niños están siendo expuestos a productos químicos nocivos contenidos en los alimentos, el agua, el aire y otros productos de su entorno. Los productos químicos, como los fluoruros, los plaguicidas que contienen plomo y mercurio, los contaminantes orgánicos persistentes y otras sustancias presentes en productos manufacturados pueden acabar entrando en la cadena alimentaria. Asimismo, aunque la gasolina con plomo se ha eliminado casi por completo en todos los países, muchas pinturas contienen este metal y pueden afectar al desarrollo del cerebro.

Como se comentó en la Reunión Conjunta FAO/OMS (2011), de expertos acerca de la aplicación de la nanotecnología en los sectores alimentario y agropecuario: existen posibles consecuencias para la inocuidad de los alimentos, y es conveniente señalar que los biocidas de las superficies, como la nanoplata, en los materiales de envasado no están destinados a tener un efecto conservante de los alimentos. En cambio, el agente biocida está pensado para que ayude a mantener la condición higiénica de la superficie evitando o mitigando el crecimiento microbiano. Basándose en la acción antimicrobiana de la nanoplata, se han obtenido varios nanomateriales artificiales *activos* a los que se atribuye conservar los materiales en contacto con los alimentos gracias a la inhibición del crecimiento de microorganismos. Ejemplos son los contenedores para almacenar los alimentos y las bolsas de plástico. La nanoplata se ha incorporado también en la superficie interna de algunos refrigeradores domésticos para prevenir el crecimiento microbiano y mantener un entorno limpio e higiénico en el frigorífico. El descubrimiento de las propiedades antimicrobianas del óxido de nano-zinc y del óxido de nano-magnesio en la Universidad de Leeds puede proporcionar materiales asequibles para tales aplicaciones en el envasado de alimentos (ZHANG y cols., 2007).

El impacto negativo de determinadas sustancias químicas sobre el sistema endocrino en humanos y animales se expone en la publicación de la OMS, *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals* (BERGMAN y cols., 2013).

En aguas de consumo público se consideran de importancia los metales pesados como son el bario, cadmio, mercurio y plomo, con los que la OMS establece acciones a tener en cuenta y llevar a cabo (OMS, 2006).

La presencia de compuestos halogenados (especialmente cloroformo y otros trihalometanos) en el agua de consumo público, suscita un interés creciente desde la perspectiva de salud pública. La desinfección del agua mediante cloración es una práctica habitual, ahora bien, en presencia de materia orgánica se producen trihalometanos clorados, y en los últimos años se ha producido una acumulación de datos que evidencian que la exposición a trihalometanos se asocia con un mayor riesgo de cáncer, sobre todo de vejiga y trastornos de la reproducción. De los cuatro trihalometanos (cloroformo, bromodichlorometano, bromoformo y dibromoclorometano), la agencia internacional de investigación sobre el cáncer ha clasificado a los dos primeros como cancerígenos potenciales (CALDERÓN y cols., 2002).

Además existen los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) que son contaminantes que se encuentran dispersos en el ambiente y provienen tanto de fuentes naturales como de diversas actividades humanas, en particular aquellas que involucran procesos de combustión incompletos donde las temperaturas sobrepasan los 700 °C. Algunas fuentes de contaminación típicas son las centrales térmicas, los humos de combustión de los automóviles, los procesos de refinado del aluminio y los derrames de combustibles fósiles; son potencialmente mutagénicos y carcinogénicos. A pesar de la baja solubilidad en agua de los HAP, su presencia en este medio está fuertemente regulada en la mayoría de los países, debido a los riesgos potenciales para la salud humana (VERA-ÁVILA y cols., 2002).

En los últimos 15 años, diferentes artículos demuestran que los fármacos representan una nueva clase de contaminantes del medio ambiente (figura 1). Estos productos incluyen antibióticos, hormonas, analgésicos, tranquilizantes y los productos de la quimioterapia. Los fármacos han sido encontrados en aguas superficiales y subterráneas e incluso en el agua potable. La contaminación proviene no solo de las excreciones, con las que una parte importante del fármaco es eliminado del cuerpo sin metabolizarse, sino que proviene también de la fabricación y disposición inadecuada de los desechos de estos productos. Los medicamentos llegan al medio ambiente a través de un conjunto de rutas principales como se representa en la figura 2. Científicos alemanes publicaron que sea cual sea la muestra de agua escogida pueden encontrarse entre 30 y 60 productos farmacéuticos. La concentración de estos productos en el agua es del orden de partes por billón, comparable a la que se encuentran en los pesticidas (PEÑATE y cols., 2009).

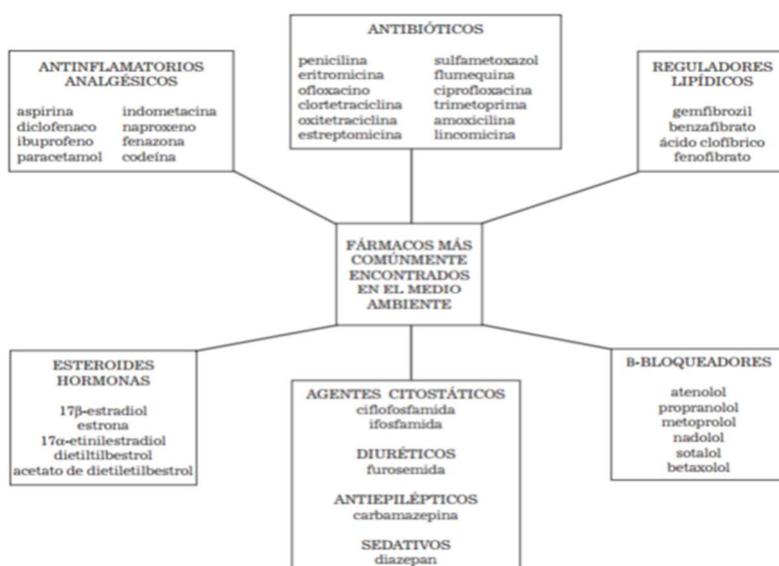


Figura 1. Fármacos presentes en contaminación ambiental (Fuente: PEÑATE y cols., 2009).

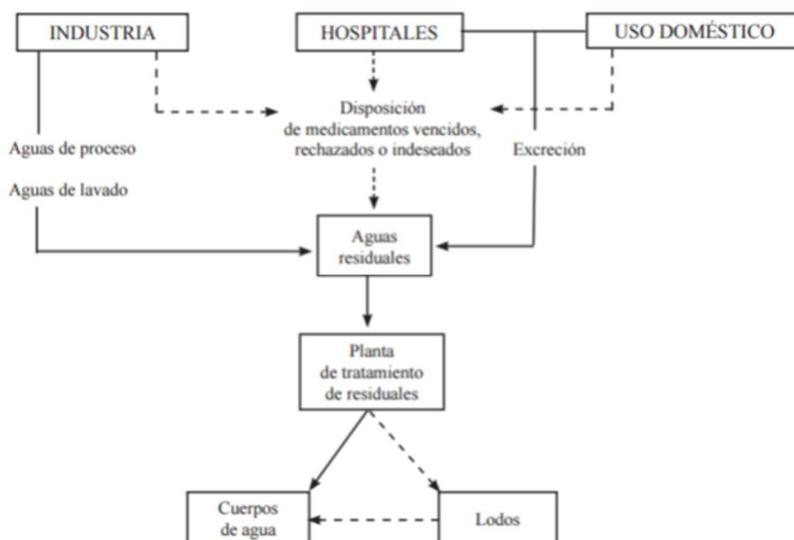


Figura 2. Diagrama de flujo de la llegada de medicamentos al medio ambiente (Fuente: PEÑATE y cols., 2009).

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD

Hace más de 2000 años, Aristóteles colocó animales de agua dulce en agua de mar y observó su respuesta, presumiblemente para responder a la pregunta: ¿Cómo afecta este medio a este organismo?. Al hacerlo, realizó una prueba de toxicidad acuática. Esta cuestión del efecto de un material sobre un organismo fue relegada a la curiosidad de los fisiólogos hasta que una disciplina formal conocida como toxicología surgió a principios del siglo XIX en respuesta al desarrollo de la química orgánica (BUKEMA y cols., 1982).

Uno de los aspectos importantes en toxicología es

la relación entre la concentración de un compuesto químico a la cual se expone un organismo y el consecuente efecto nocivo que le produce. Esta relación, conocida como la relación dosis-respuesta, constituye la base para la evaluación del peligro y el riesgo generado por las sustancias químicas en el medio ambiente.

Una prueba de toxicidad típica involucra un agente o estímulo (por ejemplo, un pesticida, un metal pesado o una muestra ambiental con contaminantes químicos), el cual se aplica a un organismo o grupo de organismos (por ejemplo, un cultivo de bacterias, algas, animales, o plantas) al que denominaremos genéricamente sujeto, sobre el que se evalúa una cierta respuesta preseleccionada.

La magnitud o la frecuencia de la respuesta dependerá de la dosis aplicada, las pruebas de toxicidad suelen diseñarse utilizando distintas dosis. La información obtenida de este tipo de ensayos permite la cuantificación de la relación entre las dos variables (dosis y respuesta), caracterizando toxicológicamente al compuesto. Normalmente, las pruebas de toxicidad se diseñan para comparar o estimar la potencia de un agente con relación a una preparación estándar o control.

Nos encontramos con diferentes tipos de pruebas o bioensayos, desde el punto de vista estadístico, el tipo de variable generada por la respuesta influencia, en gran medida, el tipo de análisis a aplicar sobre los datos. En este sentido, se pueden encontrar variables cualitativas (muerto-vivo, ausente-presente), cuantitativas discretas (número

de muertos, % de muertos) y cuantitativas continuas (reducción del crecimiento en longitud o peso). Para el análisis de las relaciones cuantitativas entre la dosis y la respuesta, es necesario recurrir a modelos matemáticos que describan dicha relación. En el caso particular de las pruebas de toxicidad, los modelos más utilizados son los de tipo empírico o descriptivo de forma rectilínea, a los cuales se llega muchas veces después de haber transformado una o las dos variables estudiadas. Para la elaboración de una prueba de toxicidad se deben seguir los principios básicos planteados para el diseño de experimentos. Esto implica un número razonable de repeticiones (dependiendo de la prueba), aleatorización de las dosis

en las unidades experimentales y un control para lograr una estimación válida del error experimental. En la mayoría de las pruebas se trabaja con un diseño completamente aleatorizado, del tipo clásico, para ser analizado a través del análisis de la varianza o del análisis de regresión, con unidades experimentales homogéneas y condiciones ambientales controladas.

Existen pruebas para evaluar la diferencia entre organismos expuestos a distintas dosis frente a un control negativo (dosis 0). Este tipo de análisis se realiza para determinar la concentración más alta a la que no se observa efecto (NOEC) o la concentración más baja a la que se observa efecto (LOEC) e implica pruebas de hipótesis. El método clásico para este tipo de análisis es el ANOVA, seguido por la prueba a posteriori de Dunnett. Esta prueba está diseñada para comparar los resultados obtenidos para un tratamiento en particular contra un control negativo (tratamiento con dosis 0). Para este tipo de análisis se requiere que se verifiquen los supuestos de un ANOVA (varianzas homogéneas, independencia de los errores, distribución normal de los residuos), que el número de repeticiones por tratamiento sea superior a tres y que todos los tratamientos tengan el mismo número de repeticiones. Si hay menos de tres repeticiones, no se debería proceder con una prueba de hipótesis, y si el número de repeticiones varía entre los tratamientos, se debería utilizar en lugar de la prueba de Dunnett, la prueba de t con el ajuste de Bonferroni (DÍAZ y cols., 2004).

MICROORGANISMOS USADOS EN EVALUACIONES DE LA TOXICIDAD

La mayoría de los procedimientos utilizados en toxicología son llevados a cabo sobre mamíferos, pero desde hace unos años está creciendo la presión pública para minimizar la utilización de vertebrados en ensayos de ecotoxicidad (WALKER y cols., 1998; REPETTO y cols., 2001).

Las alternativas más prometedoras en ecotoxicología abarcan la utilización de unos pocos organismos con sensibilidad limitada y/o que no están protegidos por la legislación. Estos incluyen bacterias, hongos, algas, plantas y animales invertebrados (REPETTO y cols., 2001).

Además de por lo anteriormente expuesto, las ventajas de aplicar bioensayos microbiológicos destacan el que los microorganismos poseen rutas metabólicas presentes en organismos superiores, por lo que las respuestas tóxicas a muchas sustancias químicas se producen a través de mecanismos similares a los organismos superiores, además la tasa de crecimiento de los microorganismos es elevada y el ciclo de vida corto, lo que hace que los ensayos sean más rápidos, los microorganismos son de fácil manipulación y su crecimiento y mantenimiento más económicos.

También debemos tener en cuenta que el gran número de individuos utilizados en cada test ofrece

ventajas estadísticas sobre otros ensayos en los que el número de individuos es menor. En los ensayos microbiológicos hay contenida una suspensión biológica con más de un millón de individuos por mililitro. Con todo esto, este tipo de sistemas permite abordar situaciones más complejas que en el caso de ensayos que emplean organismos de niveles tróficos superiores (ISAC y ARNÁIZ, 2006).

Aunque son muy diversos los organismos que se utilizan para estudios de toxicidad aguda, el efecto tóxico ha sido con frecuencia estudiado en bacterias, mediante la determinación de diversas variables indicadoras de toxicidad (ESPIGARES y cols., 1990; ESPIGARES y cols., 1998; ÖDBERG-FERRAGUT y cols., 1991; SEGOVIA y cols., 2002).

Un ejemplo claro de lo anteriormente expuesto, lo encontramos en el conocido Test de Ames, en este se usan sistemas bacterianos para detectar la toxicidad genética con un ensayo de mutagenicidad usando *Salmonella typhimurium* y, en menor medida, la cepa WP2 de *Escherichia coli*. Estudios realizados a mediados de la década de los 80 demostraron que sólo dos cepas del sistema *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100) bastaban para detectar aproximadamente el 90 % de los mutágenos de *Salmonella typhimurium* conocidos (AMES y cols., 1975).

Los modelos bacterianos muestran la toxicidad aguda de numerosas sustancias químicas. *Clostridium sp.* y *Pseudomonas putida* se han utilizado para demostrar el efecto tóxico de tres líquidos iónicos miscibles en agua, mediante la medida del crecimiento (NANCHARAIH y FRANCIS, 2015). Se ha estudiado la toxicidad inducida en *Bacillus sp.* L14 por la presencia de los metales pesados divalentes (GUO y cols., 2010). Varias cepas de *Escherichia coli* K12 se han utilizado para estudiar la mutagénesis de tres monoterpenos, ya que aunque los monoterpenos eran realmente genotóxicos, cuando se aplicaron en dosis bajas estimularon los mecanismos de reparación del ADN y actuaron como antimutagénicos (NIKOLIC y cols., 2015).

En el campo de los sensores microbianos electroquímicos se usan microorganismos con actividad enzimática para la detección de pesticidas, productos industriales y otros contaminantes de las aguas que son contaminantes ambientales frecuentes de *Pseudomonas putida* (CAMPUZANO, 2011).

En el funcionamiento de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) se usan ensayos microbiológicos para la medida de la inhibición química o de la toxicidad letal. El control y seguimiento de la calidad del agua debe emplear organismos de diferentes niveles tróficos mediante ensayos en los que se combinen distintos métodos biológicos de detección de la toxicidad, como puedan ser ensayos de letalidad con peces, rotíferos o crustáceos, test de inhibición del crecimiento bacteriano con *Pseudomonas putida*, etc (ISAC y ARNÁIZ, 2006).

HORMESIS

Hormesis, palabra que proviene del griego, que significa excitar, estimular, es el fenómeno de respuesta a dosis, caracterizado por una estimulación por dosis baja y una inhibición para dosis altas (GEMA y cols., 2009).

Se puede decir que Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821-1902), médico alemán, antropólogo, activista de la salud pública, patólogo, prehistoriador, biólogo y político, fue el primer descriptor de lo que estamos definiendo como hormesis. Virchow en 1854, observó un aumento de la actividad ciliar en el epitelio traqueal postmortem, debido al hidróxido de sodio y potasio a concentraciones bajas, y una disminución de dicha actividad, dependiente de la concentración, hasta llegar a detenerse a concentraciones más altas (HENSCHLER, 2006).

Hugo Schulz (1853-1932), farmacólogo de la Universidad de Greifswald, Alemania, demostró en 1887 que bajas dosis de sustancias con reconocidos efectos desinfectantes (mercurio, fenol, formaldehído, entre otros) estimulaban el crecimiento y respiración de algunas levaduras pero a dosis altas eran capaces de inhibir estos procesos (CALABRESE, 2015b).

Así Hugo Schulz junto con Rudolf Arndt, psiquiatra apasionado de la homeopatía, desarrollaron el concepto de dosis-respuesta integrada y este concepto derivó en la ley de Arndt-Schulz que se extendía a diferentes modelos biológicos. Esta ley enuncia lo siguiente: "*La acción fisiológica de una célula resulta aumentada o disminuida en relación con la intensidad del estímulo. Las estimulaciones débiles aumentan la capacidad vital, las fuertes la frenan y las exageradas la eliminan.*"

Los defensores de la homeopatía usaron la ley de Arndt-Schulz para defender y justificar los principios de la misma y aunque Schulz se postuló en contra de los dos principales paradigmas de la homeopatía como son, el principio de la alta potencia de las diluciones y el principio *similia similibus*, esto no impidió que su nombre se asociase con ésta a través de la mencionada ley de Arndt-Schulz (GEMA y cols., 2009).

La asociación que se produjo entre la homeopatía y la hormesis fue lo que provocó que se marginalizara esta última entre los investigadores del campo de las ciencias biomédicas.

Más adelante el término hormesis fue usado por primera vez en 1943 por Chester Southam y John Ehrlich. Estos investigadores estudiaban los efectos de los extractos de cedro rojo en el metabolismo de un número de cepas de hongos e informaban que bajas dosis de dicho extracto, aumentaban el metabolismo de los hongos de la madera, mientras dosis elevadas lo inhibían (CALABRESE, 2008a).

A finales de la década de los 70 del pasado siglo los trabajos sobre hormesis fueron aumentando. Diferentes disciplinas biológicas y biomédicas documentaban este tipo de observaciones, apareciendo en el campo de la epidemiología las curvas U en varias

condiciones de salud, especialmente aquellas relacionadas con el consumo de alcohol y enfermedades cardiovasculares (CALABRESE, 2008c).

En la década de los 80 los términos hormesis u hormético se citaron entre 10 y 15 veces al año en la base de datos *Web of Science*. En 2010, esos términos se citaron más de 3.000 veces en esta base de datos. Además, durante la pasada década estos términos también se integraron en libros de texto líderes en farmacología y toxicología como son los de los autores Calabrese, Eaton, Klaassen y Beck, mientras que en los últimos años se han dedicado cinco libros a aspectos relacionados con la hormesis de autores como LeBourg, El Ratán, Mattson, Calabrese, Sanders, Elliott y Stebbing (CALABRESE, y cols., 2012).

En las últimas décadas Calabrese y algunos colaboradores de la Universidad de Massachusetts retomaron el tema con numerosos artículos publicados en prestigiosas revistas científicas, conferencias, talleres de trabajo y un boletín virtual (GEMA y cols., 2009).

Sólo en 2013 y 2014 los términos hormesis y hormético fueron citados más de 6000 veces, dándose un incremento de más de 600 veces al año. Este aumento es generalizado, afectando a áreas biológicas y biomédicas. Se han publicado nuevos libros sobre hormesis desde diferentes perspectivas de autores como Costantini, Elliott, Krenz, Le Bourg y Rattan, lo que refleja la amplia gama de interés e implicaciones.

Asimismo, la hormesis ha sido un foco de numerosos simposios de conferencias dentro de diferentes sociedades científicas profesionales (p. ej., Sociedad de Toxicología, Sociedad de Análisis de Riesgos, Sociedad Química Americana, Sociedad Física de la Salud, Sociedad Nuclear Americana, etc.), y el enfoque de varios números especiales de revistas recientes (p. ej., *Journal of Cell Communication of Signaling*, 2014; *Homeopathy*, 2015) y la fundación de un programa de doctorado en Alemania (Friedrich-Schiller, Universidad de Jena) sobre mecanismos horméticos moleculares (CALABRESE y cols., 2015).

Existen estudios que desafían la creencia del modelo de umbral en toxicología y otras áreas de la biología, que implica relaciones dosis-respuesta y proporcionan un fuerte apoyo para el desarrollo del efecto hormético, como modelo bifásico dosis-respuesta caracterizado por una estimulación a bajas dosis y una inhibición a altas dosis. Estos hallazgos pueden afectar a numerosos aspectos de la toxicología, biología y la investigación biomédica relacionada con las relaciones dosis-respuesta, incluida la del diseño del estudio, la evaluación de riesgos, así como las estrategias de quimioterapia (CALABRESE y BLAIN, 2011).

En 2005, Calabrese y Blain publicaron los resultados de una base de datos con una evaluación detallada, que contenía cerca de 5000 respuestas a las dosis horméticas. Los resultados indicaron que las respuestas a dosis horméticas fueron observadas en una amplia gama de modelos biológicos, es decir, desde la planta hasta el ser humano, que se producen en más de un conjunto de criterios de valoración

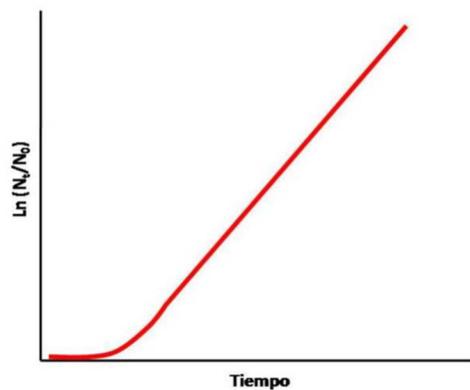


Figura 3. Curva de crecimiento positivo.

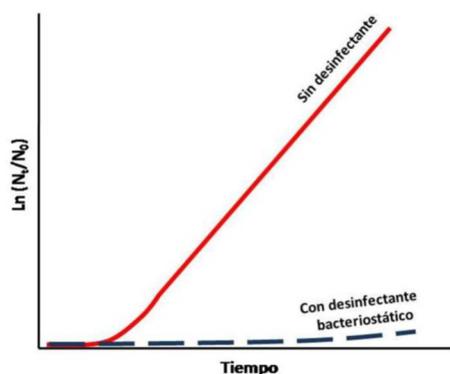


Figura 4. Acción de un desinfectante bacteriostático sobre la curva de crecimiento.

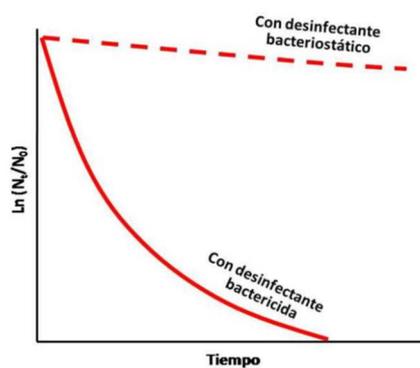


Figura 5. Curva de decrecimiento por efecto de un desinfectante bactericida y efecto de un desinfectante bacteriostático.

biológica y a través de una amplia variedad de clases químicas (CALABRESE y BLAIN, 2011).

Cuando se estudian los efectos sobre la salud y el medioambiente de los contaminantes interesa conocer la relación dosis-respuesta, así como diversos niveles tales como el nivel umbral, dosis letal 50 (DL_{50}), nivel de efecto adverso más bajo observado (lowest observed adverse effect level, LOAEL), o el nivel de

efecto adverso no observado (no observed adverse effect level, NOAEL).

Para poder estudiar esta relación dosis-respuesta podemos simplificar considerando dos tipos de curvas de crecimiento: las de crecimiento positivo y las de crecimiento negativo (mortalidad o decrecimiento).

En las curvas de crecimiento positivo, a partir de un pequeño inóculo se produce el crecimiento bacteriano. Aunque puede haber una fase de latencia, de adaptación al medio caracterizada por una mínima velocidad de crecimiento, la curva es exponencial durante la fase de crecimiento (figura 3).

Un ejemplo práctico de esta curva de crecimiento estaría representado por una herida quirúrgica o traumática que se contamina, comenzando la infección con un pequeño inóculo. En este caso la desinfección se realiza incorporando el antiséptico casi simultáneamente al inóculo. Esta situación es la más ventajosa para la desinfección:

- Se pueden utilizar desinfectantes bactericidas, que eliminarían los microorganismos del inóculo, y por lo tanto no progresaría la infección.

- También serán útiles los desinfectantes bacteriostáticos, ya que aunque no destruyan los microorganismos del inóculo, la infección no progresa (figura 4).

En el caso de los desinfectantes bacteriostáticos es muy importante la velocidad de inactivación del desinfectante. Los que tienen muy baja velocidad de inactivación resultarán eficaces, teniendo en cuenta el producto $C \cdot t$ y lo establecido en el modelo de Lambert y Johnston (LAMBERT y JOHNSTON, 2000).

Por otro lado tenemos las curvas de crecimiento negativo que son las más utilizadas en el estudio de los biocidas. Sobre un gran número de microorganismos se aplica un biocida para conseguir la muerte del microorganismo patógeno. Se explica mediante los modelos de Chick-Watson y Lambert-Johnston (LAMBERT y JOHNSTON, 2000).

Un ejemplo práctico de esta curva de decrecimiento estaría representado por una herida quirúrgica o traumática que se presenta en un avanzado estado de infección, sobre la que realizamos una cura aplicando un antiséptico (figura 5).

En este caso no sería efectiva la aplicación de un antiséptico bacteriostático, ya que se hace imprescindible reducir el número de microorganismos patógenos, y esto exige la utilización de un bactericida.

Estas curvas de crecimiento hacen referencia al uso de biocidas a concentraciones superiores al LOAEL y NOAEL con las que se consigue el efecto por el que se aplica la sustancia biocida en sí, para conseguir eliminar los microorganismos que producen dicha infección.

Habitualmente no se estudian los posibles efectos de concentraciones inferiores a los niveles umbral, LOAEL y NOAEL, sin embargo, en diversos tóxicos se ha descrito un efecto estimulante a concentraciones inferiores al nivel NOAEL, fenómeno para el que se creó el término "hormesis" (STEBBING, 1982).

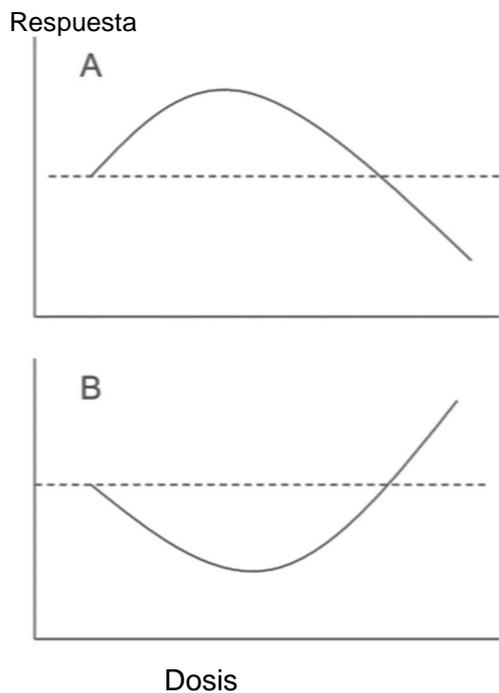


Figura 6. Formas generales de la respuesta hormética. (Fuente: CALABRESE, 2015c). A: Forma más común de respuesta hormética, que representa respuesta estimulada a dosis bajas e inhibida a dosis altas, es característica la curva en forma de U invertida. B: Curva de respuesta hormética, en forma de J o U, que representa la cuantificación de un efecto adverso en relación a la dosis.

Existe un planteamiento en el cual se afirma, que el modelo de respuesta fundamental en las ciencias biológicas, incluida la toxicología, es la relación dosis-respuesta hormética, relación que puede definirse como una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas, es decir, una relación de dosis-respuesta bifásica. La representación gráfica de esta relación puede ser una respuesta en forma de U invertida o en forma de J (figura 6). Ambos tipos de respuestas generales son ejemplos de relaciones dosis-respuesta hormética (CALABRESE, 2015c).

Así pues, hay numerosas sustancias que a concentraciones inferiores al NOAEL producen hormesis y se habla de curvas U o J y U o J invertidas, para representarlas como podemos observar en la figura 7.

La curva dosis-respuesta en forma de "U" se ha descrito cualitativamente en publicaciones (DAVIS y SVENDSGAARD, 1990; STEBBING, 1982), sobre la base de datos de hormesis química de CALABRESE y BALDWIN (1997), se ha proporcionado una descripción cuantitativa de la forma más común de

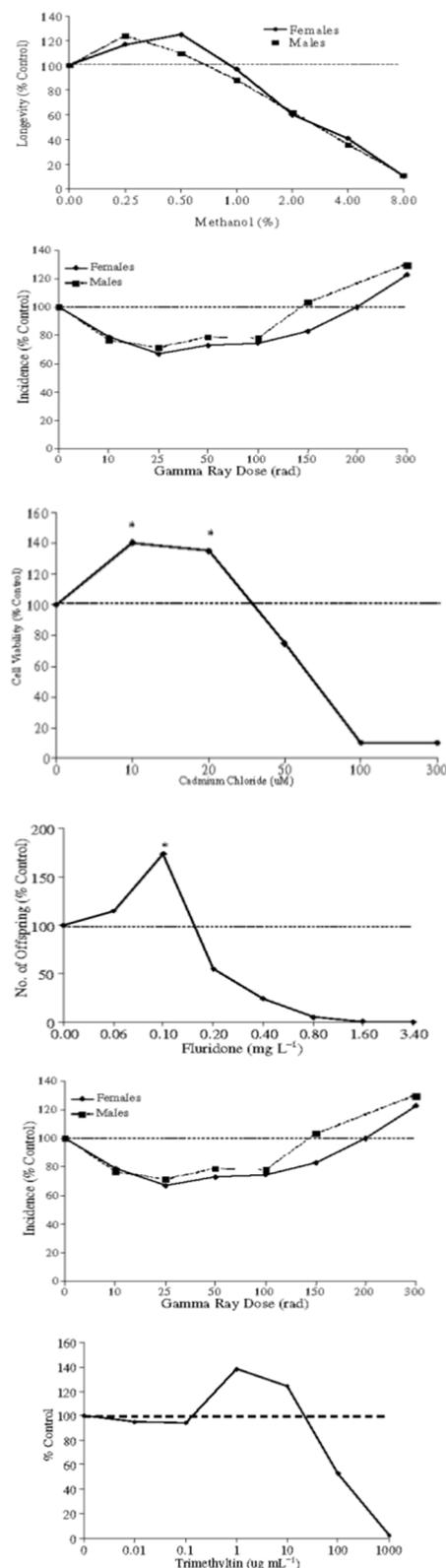


Figura 7. Ejemplos representativos de relaciones dosis-respuesta hormética (Fuente: CALABRESE, 2008f).

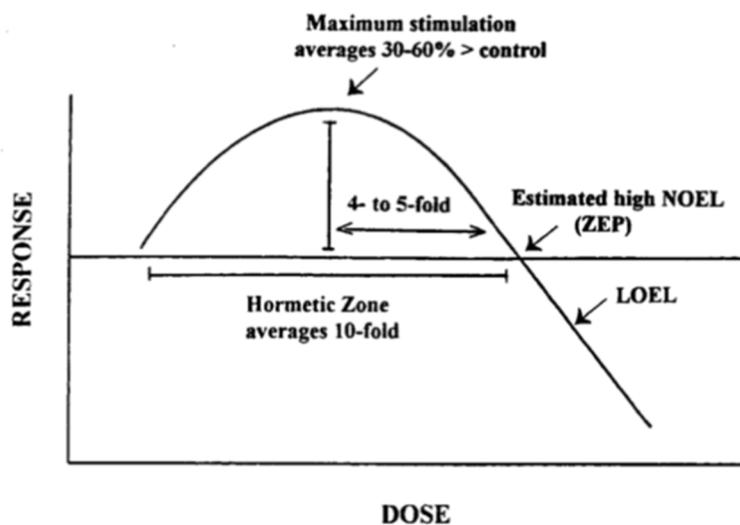


Figura 8. Relación dosis-respuesta que muestra las características cuantitativas de la hormesis (Fuente: CALABRESE y BALDWIN, 1998).

esta curva con respecto a su magnitud y rango de respuesta estimulante y relación con el tradicional NOAEL (figura 8).

Desde una perspectiva evolutiva, este proceso de hormesis otorga una ventaja a un organismo que primero encuentra una concentración diluida de una sustancia tóxica antes de encontrar una forma más concentrada y amenazante de la sustancia tóxica. La respuesta de adaptación o precondicionamiento inducido muestra la respuesta de dosis en forma de U invertida (CALABRESE y cols., 2007).

Basándonos en lo mencionado anteriormente podemos decir que la hormesis es una relación dosis-respuesta caracterizada por un efecto de estimulación a bajas dosis y de inhibición a altas dosis. La dosis-respuesta hormética ha sido típicamente representada en gráficas como una U o J invertida, dependiendo del efecto que se esté evaluando. Una amplia variedad de agentes físicos, químicos y biológicos exhiben dosis-respuesta hormética; por ejemplo algunos metales pesados, plaguicidas, antibióticos, antineoplásicos, etanol, aldehídos, cloroformo, sustancias pro-oxidantes, vitaminas, trazas de elementos metálicos y radiaciones ionizantes (GEMA y cols., 2009).

ESTUDIOS SOBRE EL EFECTO HORMÉTICO

Los estudios sobre el efecto hormético no son muy habituales, pero los realizados hasta ahora indican que es un fenómeno bastante frecuente, apareciendo que la relación dosis-respuesta no es lineal (STEBBING, 2000; CALABRESE y BALDWIN, 2002 y 2003a; CALABRESE, 2008a,b,c,d,e,f,g).

Los resultados mostrados hasta ahora sugieren que la hormesis tiene una gran importancia en el campo de la salud ambiental y la salud pública (THAYER y cols., 2005; COOK y CALABRESE, 2006).

En el campo de la salud pública, un factor

estudiado ha sido el ejercicio físico en el que se observa hormesis. Considerando el estrés oxidativo se muestra que un ejercicio físico escaso o excesivo tienen un efecto negativo sobre la salud, mientras que un ejercicio normal reduce el estrés oxidativo, protege frente a la aparición y progresión de enfermedades, y mejora el rendimiento y la calidad de vida (PINGITORE y cols., 2015).

En otro estudio se evaluó el riesgo de daño del ADN en los linfocitos de mujeres embarazadas con respecto al estado hormonal y nutricional y a la contaminación del aire, y se observa que el efecto protector de los contaminantes atmosféricos es un efecto hormético cuando las concentraciones no exceden los niveles admisibles (KALEMBADROZDZ, 2015).

Actualmente despierta un gran interés y una gran controversia la posible existencia de hormesis en la exposición a radiaciones ionizantes (CALABRESE, 2015a). Aunque generalmente se acepta una hipótesis "lineal, sin umbral", recientes estudios muestran que una exposición a bajas dosis causaría un efecto protector, de forma que los datos experimentales disponibles apoyarían la evidencia creciente de no linealidad en los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes a bajas dosis (SOKOLOV y NEUMANN, 2015). Incluso, diversos estudios sugieren que, después del tratamiento de irradiación, la microbiota humana tendría la capacidad de disminuir los riesgos de cáncer y mejorar la hormesis después de la irradiación (CLANTON y cols., 2015).

El efecto hormético también ha sido observado en diversos antibióticos. Debido al uso intensivo de enrofloxacin y ciprofloxacina en medicina humana y veterinaria, estas fluoroquinolonas aparecen como contaminantes en ambientes acuáticos. Se ha evaluado el efecto de estos antibióticos en plantas de cultivo de las especies *Cucumis*, *Lactuca*, *Phaseolus* y *Raphanus*, mediante medida del crecimiento postgerminativo (MIGLIORE, y cols., 2003). Las tetraciclinas inducen una respuesta hormética en el crecimiento de la planta *Zea mays* (MIGLIORE y cols., 2010), y en la oxytetraciclina también se demuestra un efecto hormético (CHI y cols., 2014). Bajos niveles de amoxicilina muestran un efecto hormético en el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* (LIU y cols., 2015). En el estudio de DAVIES y cols. (2006), se expone que algunos antibióticos presentan el fenómeno de hormesis.

En otros fármacos también se ha demostrado hormesis. Así, en el estudio que se hizo para evaluar la toxicidad acuática de productos farmacéuticos en *Daphnia*, la exposición crónica al antidepresivo fluoxetina incrementa la fecundidad, y la exposición

aguda al ácido clofibrico aumenta la proporción de machos nacidos (FLAHERTY y DODSON, 2005).

Otros estudios se han realizado sobre el efecto hormético de desinfectantes. Un estudio sobre la citotoxicidad de los compuestos *o*-fenilfenol, *o*-bencil-*p*-clorofenol y *p*-amilfenol terciario, evidenció un efecto hormético a bajas concentraciones (DAVOREN y FOGARTY, 2006). Diferentes concentraciones de soluciones acuosas de formaldehído producen hormesis en la acetilcolinesterasa en la lombriz *Eisenia andrei* (HACKENBERGER y cols., 2012). Igualmente, clorhexidina, povidona iodada y cloruro de benzalkonio muestran un efecto hormético significativo frente a *Pseudomonas aeruginosa*, y en menor medida frente a *Staphylococcus aureus* (MORALES-FERNÁNDEZ y cols., 2014). Estos estudios demuestran que el estudio dosis-respuesta de los desinfectantes parece no ser tan simple como la aplicación de un modelo lineal para todas las concentraciones. Para estudios con concentraciones de desinfectantes relacionadas con la concentración bactericida mínima (CMB), los modelos tales como el de Chick-Watson, o modelos más avanzados como el de Lambert y Johnston, que considera que la concentración del desinfectante va disminuyendo durante el proceso de desinfección, explican perfectamente el efecto dosis-respuesta y tiempo de acción del desinfectante. Así ocurre en todos los desinfectantes y cepas bacterianas incluidas en este estudio, con una regresión lineal logarítmica significativa que explica la relación dosis-respuesta. Sin embargo, a concentraciones bajas esta relación no es lineal y aparecen efectos horméticos en los que concentraciones más bajas tienen un mayor efecto inhibitorio. Este hecho tiene una gran importancia para la desinfección desde un punto de vista práctico. Para la desinfección de heridas, material, superficies, etc. se utilizan concentraciones por encima de la CMB, pero si en algunas zonas sólo se alcanzan concentraciones que producen efecto hormético, lejos de producir una desinfección lo que se produce es una estimulación del crecimiento. En las heridas infectadas, en la que los microorganismos pueden encontrarse en zonas a las que no llega adecuadamente el desinfectante este efecto hormético puede tener mucha importancia. Además existen otros estudios que se han realizado sobre el efecto hormético de desinfectantes como es el estudio sobre la citotoxicidad de los compuestos *o*-fenilfenol, *o*-bencil-*p*-clorofenol y *p*-amilfenol terciario, empleados como ingredientes activos de desinfectantes fenólicos, evidenció un efecto hormético a bajas concentraciones (DAVOREN y FOGARTY, 2006). Por otro lado las soluciones acuosas de formaldehído producen una inhibición de la acetilcolinesterasa en la lombriz *Eisenia andrei*, pero la aplicación de bajas concentraciones de formaldehído produce una mayor actividad acetilcolinesterasa comparada con el control (HACKENBERGER y cols., 2012). Esto no hace otra cosa que afirmar la importancia a este fenómeno en relación a los diferentes tipos de

desinfectantes que se usan hoy por hoy y en las diferentes circunstancias en las que se pueden encontrar, además de considerar la gran variabilidad de organismos a los que pueden afectar.

Es bien conocido el efecto tóxico de numerosos iones metálicos que se pueden encontrar como contaminantes ambientales, ya sean de fuentes naturales o antropogénicas, a causa de la exposición de las poblaciones humanas a estos contaminantes (PANG y cols., 2016). La toxicidad de estos elementos metálicos se determina por los procedimientos habituales en toxicología, que incluyen tests *in vitro*, estudios de relación estructura-actividad, bioensayos en animales y estudios epidemiológicos (FAUSTMAN y OMENN, 1975; RICHARDS y BOURGEOIS, 2014). Existen numerosos estudios que relacionan la hormesis y los metales (PEREZ-BENITO, 2006; NORWOOD y cols., 2007; RONCHINI y cols., 2015; PAGANO y cols., 2015; DAMELIN y cols., 2000). Es el caso del estudio realizado en el pez *Poecilia reticulata*, que muestra que cromo y vanadio tienen efecto hormético (PEREZ-BENITO, 2006). La toxicidad crónica de arsénico, cobalto, cromo y manganeso se ha estudiado frente al crustáceo *Hyalella azteca*, observándose un efecto hormético sólo en el arsénico (NORWOOD y cols., 2007). También se ha observado el efecto hormético del paladio en la planta leguminosa *Pisum sativum* (RONCHINI y cols., 2015) y del cerio en embriones de erizo de mar (PAGANO y cols., 2015). La hormesis también ha sido observada en células con numerosos iones metálicos (Mn, Hg, Zn, Cd, Pb, Ag, etc.). Hay estudios de citotoxicidad utilizando un ensayo *in vitro* basado en bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) que revelaron que las células McCoy expuestas a bajas concentraciones de mercurio (0,7 µM), cadmio (1 µM) y cloruro cúprico (3 µM) exhibieron aumentos significativos en la actividad celular (DAMELIN y cols., 2000).

Existen relaciones dosis-respuesta bifásicas de tipo hormético en el caso de más de 30 péptidos que representan muchas clases peptídicas importantes. Estas respuestas de dosis bifásicas inducidas por péptidos se producían en una amplia gama de tejidos, afectando a una gama diversa de puntos finales biológicos (CALABRESE y BALDWIN, 2003b).

En resumen, se puede afirmar, en concordancia con lo señalado en los trabajos publicados, que la respuesta hormética es más frecuente de lo que habitualmente se piensa, y también coinciden en que el efecto hormético no suele ser muy elevado, aunque sí significativo en cuanto a los efectos positivos que puede producir, con una gran trascendencia en el campo de la salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

AMES B, MCCANN J, YAMASAKI E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with

- the Salmonella/mammalian microsome mutagenesis test. *Mutation Research.* 31: 347-364.
- BERGMAN A, HEINDEL J, JOBLING S, KIDD K, ZOELLER R. (2013): State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: an assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization. ISBN: 978-92-807-3274-0 (UNEP) and 978 92 4 150503 1 (WHO).
- BUIKEMA A, NIEDERLEHNER B, CAIRNS J. (1982): Biological monitoring part IV - Toxicity testing. *Water Res.* 16: 239-262.
- CALABRESE EJ. (2008a): Converging concepts: Adaptive response, preconditioning and the Yerkes-Dodson law are manifestations of hormesis. In: *Ageing. Res. Rev.* 7: 8-20.
- CALABRESE EJ. (2008b): Another California Milestone: The first application of hormesis in litigation and regulation. *Intern. J. Toxicol.* 27: 31-33.
- CALABRESE EJ. (2008c): Neuroscience and hormesis: Overview and general findings. *Crit. Rev. Toxicol.* 38: 249-52.
- CALABRESE EJ. (2008d): Dose-response features of neuroprotective agents: an integrative summary. *Crit. Rev. Toxicol.* 38: 253-348, 349-89, 391-418, 419-51, 453-62, 63-71, 473-87, 489-542, 543-56, 557-77, 579-90, 591-8, 599-618.
- CALABRESE EJ. (2008e): Hormesis and medicine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 66: 594-617.
- CALABRESE EJ. (2008f): Hormesis: Principles and applications for pharmacology and toxicology. *Am. J. Pharm. & Toxicol.* 3:59-71.
- CALABRESE EJ. (2008g): Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1451-1474.
- CALABRESE EJ. (2015a): On the origins of the linear no-threshold (LNT) dogma by means of untruths, artful dodges and blind faith. *Environ. Res.* 142, 432-442.
- CALABRESE EJ. (2015b): Historical foundations of hormesis. *Homeopathy.* 104: 83-89.
- CALABRESE EJ. (2015c): Hormesis: principles and applications. *Homeopathy* 104, 69-82.
- CALABRESE EJ, BACHMANN KA, BAILER AJ y cols. (2007): Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response frame work. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222: 122-128.
- CALABRESE EJ, BALDWIN LA. (1997): The dose determines the stimulation (and poison): development of a chemical hormesis database. *Int. J. Toxicol.* 16: 545-559.
- CALABRESE EJ, BALDWIN LA. (1998): A general classification of U-shaped dose-response relationships in toxicology and their mechanistic foundations. *Hum. Exper. Toxicol.* 17: 353-364.
- CALABRESE EJ, BALDWIN LA. (2002): Defining hormesis. *Hum. Exper. Toxicol.* 21: 91-97.
- CALABRESE EJ, BALDWIN, LA. (2003a): Hormesis: The dose-response revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 175-197.
- CALABRESE EJ, BALDWIN LA. (2003b): Peptides and hormesis. *Crit. Rev. Toxic.* 33: 355-405.
- CALABRESE EJ, BLAIN R. (2011): The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, *Regul. Toxicol. Pharm.* 61: 73-81.
- CALABRESE EJ, DHAWAN G, KAPOOR R, IAVICOLI I, CALABRESE V. (2015): What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity? *Biogerontology*; 16:693-707.
- CALABRESE EJ, IAVICOLI I, CALABRESE V. (2012): Hormesis: Why it is important to biogerontologists. *Biogerontology*; 13:215-35.
- CALDERÓN J, CAPELL C, CENTRICH F, ARTAZCOZ L, GONZÁLEZ-CABRÉ M, VILLALBÍ J. (2002): Subproductos halogenados de la cloración en el agua de consumo público. *Gac. Sanit.* 16: 241-3.
- CAMPUZANO S. (2011): Presente y futuro de los biosensores microbianos electroquímicos. *An. Quím.* 107: 350-357.
- CHI Z, LIU R, YOU H, MA S, CUI H, ZHANG Q. (2014): Probing the in vitro cytotoxicity of the veterinary drug oxytetracycline. *Plos one.* 9: 7. e102334, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0102334>.
- CLANTON R, SAUCIER D, FORD J, AKABANI G. (2015): Microbial influences on hormesis, oncogenesis, and therapy: A review of the literature. *Environ. Res.* 142: 239-256.
- COOK R, CALABRESE EJ. (2006): The importance of hormesis to public health. *Environ. Health Perspect.* 114: 1631-1635.
- DAMELIN L, VOKES S, WHITCUTT J, DAMELIN S, ALEXANDER J. (2000): Hormesis: A stress response in cells exposes to low levels of heavy metals. *Hum. Exp. Toxicol.* 19: 420-430.
- DAVIES J, SPIEGELMAN G, YIM G. (2006): The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Micr.* 9: 445-453.
- DAVIS JM, SVENDSGAARD DJ. (1990): U-shaped dose-response curves: Their occurrence and implications for risk assessment. *J. Toxicol. Environ. Health.* 30: 71-83.

- DAVOREN M, FOGARTY A. (2006): In vitro cytotoxicity assessment of the biocidal agents sodium o-phenylphenol, sodium o-benzyl-p-chlorophenol, and sodium tertiary amylphenol using established fish cell lines. *Toxicol. in vitro.* 20: 1190–1201.
- DÍAZ MC, BULUS GD, PICA Y. (2004): Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones - Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. *Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.* ISBN 968-5536-33-3.
- EATON D, KLAASSEN C. (1975): Principles of toxicology. In: Klaassen, C.D. (Ed), Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons, 5th ed. *McGraw-Hill*, New York, ISBN: 0-07-105476-6. pp. 13-33.
- ESPIGARES M, CROVETTO G, GÁLVEZ R. (1998): In vitro evaluation of the toxicity of several dithiocarbamates using an *Escherichia coli* growth inhibition bioassay and the acetylcholinesterase inhibition test. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13: 165-174.
- ESPIGARES M, ROMAN I, GONZALEZ J, DE LUIS B, YESTE F, GALVEZ R. (1990): Proposal and application of an ecotoxicity biotest based on *Escherichia coli*. *J. Appl. Toxicol.* 10: 443-446.
- FAO/OMS (2011): Reunión Conjunta FAO/OMS de expertos acerca de la aplicación de la nanotecnología en los sectores alimentario y agropecuario: posibles consecuencias para la inocuidad de los alimentos. ISBN 978-92-4-356393-0 (WHO) ISBN 978-92-5-306495-3 (FAO).
- FAUSTMAN E, OMENN G. (1975): Risk assessment. In: Klaassen, C.D. (Ed), Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons, 5th ed. *McGraw-Hill*, New York, pp. 75-88.
- FLAHERTY C y DODSON S. (2005): Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere.* 61: 200–207.
- GEMA P, RICARDO R, GREGORIO M. (2009): Hormesis: Antecedentes e implicaciones en los sistemas biológicos. *Lat. Am. J. Pharm.* 28: 954-60.
- GUILLERMO H. (1999): La fiebre puerperal: La lucha de I. F. Semmelweis en la génesis de un nuevo paradigma. *IATREIA*, vol. 12, n° 3.
- GUO H, LUO S, CHEN L, XIAO X, XI Q, WEI W, ZENGA G, LIUC C, WANA Y, CHENA J, HEC Y. (2010): Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulator endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource Technol.* 101: 8599-8605.
- HACKENBERGER B, VELKI M, STEPIĆ S, HACKENBERGER D. (2012): The effect of formalin on acetylcholinesterase and catalase activities, and on the concentration of oximes, in the earthworm species *Eisenia andrei*. *Eur. J. Soil Biol.* 50: 137–143.
- HENSCHLER D. (2006): The origin of hormesis: historical background and driving forces. *Hum. Exp. Toxicol.* 25: 347-51.
- ISAC L, ARNÁIZ C, (2006): Microbiological tests of detection of the toxicity. Application to systems of residual water purification. *Afinidad.* 63: 183-194.
- JIMÉNEZ BUILES JA, MARTÍNEZ MI, LÓPEZ LE, (2004): Reducción de riesgos en salud por manipulación de cloro utilizando entrenamiento basado en las tecnologías de la información y la comunicación. *Congreso Iberoamericano de Informática Educativa - Conference Paper.*
- JOSEPH L. (1867): On the antiseptic principle in the practice of surgery. *The Lancet.* 95:40-42.
- KALEMBA-DROZDZ M, (2015): The interaction between air pollution and diet does not influence the DNA damage in lymphocytes of pregnant women. *Environ. res.* 136: 295–299.
- KINNAMAN GC. (1905): The anti-microbic action of iodine. *J. Amer. Med. Assoc.* 45: 600-606.
- LAMBERT R y JOHNSTON M. (2000): Disinfection kinetics: a new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves. *J. Appl. Microbiol.* 88: 907-913.
- LIU Y, WANG F, CHEN X, ZHANG J, GAO B, (2015): Cellular responses and biodegradation of amoxicillin in *Microcystis aeruginosa* at different nitrogen levels. *Ecotox. Environ. Safe.* 111: 138–145.
- MIGLIORE L, COZZOLINO S, FIORIC M, (2003): Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere.* 52: 1233–1244.
- MIGLIORE L, GODEASA F, PAOLA DE FILIPPIS S, MANTOVI P, BARCHI D, TESTA C, RUBATTU N, BRAMBILLA G. (2010): Hormetic effect(s) of tetracyclines as environmental contaminant on *Zea mays*. *Environ. Pollut.* 158: 129–134.
- MORALES FERNÁNDEZ L, FERNÁNDEZ M, ESPIGARES M, MORENO E, ESPIGARES E. (2014): Study of the hormetic effect of disinfectants chlorhexidine, povidone iodine and benzalkonium chloride. *Eur. Jour. Clin. Micr. & Infec. Dise.* 33: 103-109.
- NANCHARAIH Y, FRANCIS A. (2015): Hormetic effect of ionic liquid 1-ethyl-3-methyl-imidazolium acetate on bacteria. *Chemosphere.* 128: 178-183.
- NIKOLIC B, VASILJEVIC B, MITIC-CULAFIC D, VUKOVIC-GACIC B, KNEZEVICVUKCEVIC J. (2015): Comparative study of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic activities of monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in bacteria and mammalian cells. *Chem-Biol. Interact.* 242: 263-271.
- NORWOOD W, BORGMANN U, DIXON D. (2007): Chronic toxicity of arsenic, cobalt, chromium and

manganese to *Hyalella azteca* in relation to exposure and bioaccumulation. *Environ. Pollut.* 147: 262-272.

ÖDBERG-FERRAGUT C, ESPIGARES M, DIVE D. (1991): Stress protein synthesis, a potential toxicity marker in *Escherichia coli*. *Ecotox. Environ. Safe.* 21: 275-282.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2006): Metales pesados: ¿necesidad de más acciones globales? FORO V - Quinta reunión del Foro Intergubernamental de Seguridad Química. *IFCS/FORO-V/8 INF. Budapest, Hungría.* (http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum5/8inf_rev1_sp.pdf?ua=1).

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2017): Comunicado de prensa: Las consecuencias de la contaminación ambiental: 1,7 millones de defunciones infantiles anuales, según la OMS. Ginebra, Suiza.

PAGANO G, ALIBERTI F, GUIDA M, ORAL R, SICILIANO A, TRIFUOGGI M, TOMMASI F. (2015): Rare earth elements in human and animal health: State of art and research priorities. *Environ. Res.* 142: 215-220.

PANG Y, PENG R, JONES M, FRANCESCONI K, GOESSLER W, HOWARD B, UMANS J, BEST L. (2016): Metal mixtures in urban and rural populations in the US: The multi-ethnic study of atherosclerosis and the strong heart study. *Environ. Res.* 147: 356-364.

PEÑATE I, HAZA U, WILHELM A, DELMAS H. (2009): Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 40: 173-179.

PEREZ-BENITO J. (2006): Effects of chromium (VI) and vanadium (V) on the lifespan of fish. *J. Trace Elem. Med Bio.* 20: 161-170.

PINGITORE A, PACE G, MASTORCI F, QUINONES A, IERVASI G, VASSALLE C. (2015): Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition.* 31: 916-922.

REAL DECRETO 1054/2002, de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas. *Boletín Oficial del Estado*, 15 de octubre de 2002, num. 247.

REGLAMENTO (UE) 528/2012 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y el uso de los biocidas.

REPETTO G, JOS A, HAZEN M, MOLERO M, DEL PESO A, SALGUERO M, DEL CASTILLO P, RODRÍGUEZ-VICENTE M, REPETTO M. (2001): A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. *Toxicol. in vitro.* 15: 503-509.

RICHARDS I, BOURGEOIS M. (2014): Principles and practice of toxicology in public health. 2nd ed. *Jones & Bartlett Learning*, Burlington, pp. 119-128.

RODRÍGUEZ S, GOMARIZ M. (2002): Riesgo toxicológico medioambiental de compuestos activos utilizados para la desinfección de torres de refrigeración. 4. Desinfectantes y riesgo ambiental. *Editorial Complutense*. Madrid. ISBN: 84-7491-687-9, pp. 16-18.

RONCHINI M, CHERCHI L, CANTAMESSA S, LANFRANCHI M, VIANELLI A, GEROLA P, BERTA G, FUMAGALLI A. (2015): Palladium uptake by *Pisum sativum*: partitioning and effects on growth and reproduction. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 7600-7611.

SÁNCHEZ L, SAENZ E. (2005): Antisépticos y desinfectantes. *Dermatología Peruana.* 15: 82-10.

SEGOVIA N, CROVETTO G, LARDELLI P, ESPIGARES M. (2002): In vitro toxicity of several dithiocarbamates and structure-activity relationships. *J. Appl. Toxicol.* 22: 353-357.

SOKOLOV M, NEUMANN R. (2015): Global gene expression alterations as a crucial constituent of human cell response to low doses of ionizing radiation exposure. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 55.

STEBBING A. (1982): Hormesis: The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci. total environ.* 22: 213-234.

STEBBING A. (2000): Hormesis: Interpreting the β -curve using control theory. *J. Appl. Toxicol.* 20: 93-101.

THAYER K, MELNICK R, BURNS K, DAVIS D, HUFF J. (2005): Fundamental flaws of hormesis for public health decisions. *Environ. Health Persp.* 113: 1271-1276.

VERA-ÁVILA L, CÁZARES-IBÁÑEZ E, COVARRUBIAS-HERRERA R, CAMACHO-FRÍAS E. (2002): Metodología en línea para la determinación de HAP en agua a nivel de ultratrazas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 18: 516.

WALKER C, KAISER K, KLEIN W, LAGADIC L, PEAKALL D, SHEFFIELD S, SOLDAN T, YASUNO M. (1998): 13th Meeting of the scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals (SGOMSEC): alternative testing methodologies for ecotoxicity. *Environ. Health Persp.* 106: 441-451.

ZHANG, L., JIANG, Y., DING, Y., POVEY, M. & YORK, D. (2007): Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *J. Nanoparticle Res.*, 9: 479-489.