



Foto di Dinesh Valke

*Cinnamomum zeylanicum* è ricco di componenti quali carvacrolo, timolo e aldeidi aromatiche come la cinnamaldeide.

## Oli essenziali e sicurezza: studi di tossicità nei modelli animali

*Al giorno d'oggi gli oli essenziali trovano applicazioni in una vasta gamma di settori come il cosmetico, l'alimentare, il farmaceutico e il settore per la produzione di disinfettanti. Sono molto apprezzati per le loro attività antimicrobiche, antivirali, antifungine, antiossidanti, antinfiammatorie ed ansiolitiche che determinano benefici e proprietà terapeutiche nei confronti di animali, piante e uomini. Tuttavia è bene considerare che l'impiego non consapevole di queste sostanze può, in alcuni casi, comportare rischi per la salute. Gli studi di tossicità in modelli animali possono essere di grande aiuto nella valutazione di tali rischi.*

**\*Laura Narciso**

**\*\*Carla Raggi**

**G**li oli essenziali, definiti secondo la Farmacopea Europea come "Prodotto odoroso, generalmente di composizione complessa, ottenuto da una materia prima vegetale, sono metaboliti secondari delle piante, volatili, limpidi (solo raramente colorati), liposolubili e solubili in solventi organici, in genere liquidi anche se alcuni sono solidi (come l'iris) o semi solidi (legno di guaiaco). Possono essere sintetizzati da tutti gli organi vegetali, come fiori (ad es. la rosa), foglie (ad es. la menta), semi (ad es. i finocchi), frutti (ad es. il limone), radici (ad es. lo zenzero), legno o corteccia (ad es. cedro e la cannella) (1). I metodi di estrazione degli oli essenziali, riconosciuti dalla Farmacopea Europea, sono la distillazione a vapore, la distillazione a secco e la pressatura a freddo.

La composizione chimica degli oli essenziali è molto complessa e altamente variabile anche all'interno della stessa specie vegetale a causa di fattori ambientali e climatici come la regione in cui cresce, le pratiche, i tempi di coltivazione e di raccolta. Le tecniche maggiormente utilizzate per la sua determinazione sono: gascromatografia, analisi di spettrometria di massa, cromatografia liquida o risonanza magnetica. I terpeni sono

le principali strutture chimiche presenti negli oli essenziali, seguiti da altre molecole come aldeidi, alcoli, fenoli, chetoni ed eteri.

In generale, i componenti maggiormente espressi sono anche quelli che possiedono le principali attività biologiche. Infatti gli oli possiedono proprietà ben conosciute fin dall'antichità quando, durante lo sviluppo della civiltà occidentale e orientale, sono stati adoperati non solo come fonti di cibo, ma anche in medicina e in cerimonie religiose o sociali. Un esempio è l'olio di cannella dal caratteristico aroma speziato utilizzato millenni fa non solamente come aroma alimentare e fragranza, ma anche come ingrediente principale dell'olio di unguento santo (come menzionato in Esodo 32:22-26). Inoltre, per le sue proprietà conservanti, la cannella ed il suo olio essenziale erano ricercati dagli egiziani per le procedure di imbalsamazione (2).

Ad oggi gli oli vengono molto apprezzati per le loro attività antimicrobiche, antivirali, antifungine, antiossidanti, antinfiammatorie ed ansiolitiche che determinano benefici e proprietà terapeutiche nei confronti di animali (veterinaria), piante (agricoltura) e uomini (aromaterapia e medicina).

### Effetti avversi degli oli essenziali

Gli oli essenziali sono facilmente reperibili in farmacia, nei supermercati o online, e vengono ampiamente utilizzati dalla popolazione, spesso senza che vengano prese le opportune precauzioni. Infatti, come riportato in uno studio condotto nel 2016, l'11% della popolazione australiana ha utilizzato oli essenziali per scopi medicinali, di solito auto-prescritti (3). Alcuni oli essenziali possono essere estremamente pericolosi, soprattutto

se assunti in particolari periodi della vita come durante la gravidanza e l'allattamento in cui si è più propensi all'utilizzo di piante e/o loro derivati perché erroneamente ritenute "Naturali e quindi più Sicure" rispetto ai farmaci. Sebbene alcuni oli possano recare vantaggi alleviando ad esempio alcuni sintomi legati alla gravidanza, come l'olio essenziale di camomilla che ha un effetto antiemetico (4), altri invece risultano molto pericolosi e causano tossicità nella madre (con danni al fegato e ai reni). Alcuni oli essenziali possono essere teratogeni e causare difetti congeniti di natura strutturale alla nascita, possono indurre nell'embrione effetti antiangiogenici che portano a pre-eclampsia, parto prematuro, ritardo nella crescita del feto e

anche la morte. Gli effetti embriotossici sono spesso causati dai principali componenti degli oli essenziali, i monoterpeni, ed in particolare quelli appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae (5). Grazie alla loro struttura chimica (lipofilicità), il basso peso molecolare e la capacità di legare le proteine, gli oli essenziali sono in grado di attraversare la placenta e indurre tossicità nel feto, agendo in particolare sul sistema nervoso. Componenti pericolosi di alcuni oli essenziali che dovrebbero essere evitati durante la gravidanza e l'allattamento sono cinnamaldeide, citrale e pulegone che possono interagire direttamente con la membrana cellulare dell'embrione, (E)-anetolo,  $\beta$ -eudesmol, tujone, apiole, metil salicilato e thuja (6).



*Cuminum cyminum. Un possibile effetto tossico indotto a livello dermico da alcuni oli essenziali o dai loro componenti è la sensibilizzazione cutanea, una risposta del sistema immunitario a certe sostanze che entrano in contatto con la pelle provocando reazioni allergiche*

Foto da projectpurityseeds.com



Negli ultimi anni, alcuni studi hanno dimostrato come alcuni componenti degli oli essenziali presentino attività genotossica (inducono tossicità del DNA) e cancerogena (favoriscono l'insorgenza di tumori) (7).

Gli oli essenziali usati in aromaterapia sono normalmente diluiti in oli vettori e applicati direttamente sulla pelle. Alcuni oli possono provocare tossicità e indurre differenti tipi di effetti avversi a livello topico: irritazione, sensibilizzazione cutanea, fotosensibilizzazione.

Una **irritazione** cutanea è una risposta biologica della pelle che induce uno stato di infiammazione e in genere si manifesta immediatamente dopo che l'olio è applicato la prima volta. Questo effetto è molto simile ad una dermatite da contatto e la reazione sulla pelle è limitata all'area che è entrata in contatto con l'olio. Tale irritazione cutanea può essere generata da oli essenziali derivati da piante quali *Cuminum cyminum*, *Origanum vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Thymus vulgaris*, *Tagetes minuta*, ricchi di componenti quali carvacrolo, timolo e aldeidi aromatiche come la cinnamaldeide. Un altro possibile effetto tossico indotto a livello dermico da alcuni oli essenziali o dai loro componenti è la **sensibilizzazione cutanea**, una risposta del sistema immunitario a certe sostanze che entrano in contatto con la pelle provocando reazioni allergiche. Un'esposizione prolungata dell'olio può indurre una risposta ritardata dei linfociti T, causando reazioni infiammatorie gravi. I principali componenti responsabili dei fenomeni allergici a livello topico sono: citrale, cinnamaldeide, geraniolo, eugenolo, cumarina, linalolo, citronellolo, limonene, benzil cinnamato, farnesolo, alcool anisilico, alcool cinnamilico e idrossicitronellale. La **Fotosensibilizzazione** è un

fenomeno che si può manifestare sulla pelle quando una fototossina presente nell'olio essenziale è in grado di assorbire i raggi solari (UVA) e causare effetti tossici. I principali responsabili di queste reazioni sono le furanocumarine o psoraleni presenti negli oli essenziali degli agrumi (come l'arancio amaro - *C. aurantium* o il limone - *C. limon*) (8), ma anche nelle foglie di prezzemolo, di cumino e della calendula (9).

Grazie alla loro natura lipofilica, gli oli essenziali sono in grado di attraversare le barriere biologiche facilmente ed essere assorbiti nel circolo sistemico tramite esposizione orale, inalatoria o anche cutanea. Questo permette loro di espletare gli effetti benefici, ma anche di esercitare effetti tossici e complicazioni.

Gli oli essenziali possono manifestare i loro effetti avversi anche a livello neurologico. Quando sono inalati, essi raggiungono il cervello attraverso il bulbo olfattorio, trasferendo segnali chimici in segnali elettrici e a livello alveolare possono attraversare la barriera aria-sangue ed entrare nel circolo sanguigno (10). Dal circolo sistemico possono poi raggiungere il sistema nervoso e attraversare la barriera emato-encefalica. Le proprietà neurotossiche degli oli essenziali sono da attribuirsi principalmente a molecole come l'1,8 cineolo, la canfora, il thuiene ed il pulegone e si possono manifestare con sintomi gravi come le convulsioni, soprattutto nei bambini.

Un altro importante e non raro effetto avverso è l'intossicazione acuta risultante dall'ingestione accidentale di grandi quantità di oli essenziali non diluiti. Ciò potrebbe causare convulsioni, nausea e vomito e, in casi rari, anche la morte. Nelle intossicazioni acute, i neonati

e i bambini sono le categorie maggiormente a rischio perché presentano un peso corporeo inferiore rispetto all'adulto e perché spesso non hanno ancora sviluppato completamente gli enzimi in grado di metabolizzare le sostanze tossiche. Tra gli oli essenziali più pericolosi, responsabili di aver causato intossicazioni per ingestione ci sono: melaleuca, wintergreen, chiodi di garofano, cannella ed eucalipto (11).

### Utilizzo degli oli essenziali e Regolamentazione

Al giorno d'oggi gli oli trovano applicazioni in una vasta gamma di settori come il cosmetico, l'alimentare, il farmaceutico e il settore per la produzione di disinfettanti. (8).

Attualmente in Europa non esiste una normativa esclusiva per gli oli, ma questi seguono la regolamentazione a cui fa riferimento il prodotto completo nel quale sono stati addizionati (12). Quando gli oli sono utilizzati nelle applicazioni cosmetiche, nei prodotti fitosanitari e come biocidi sono soggetti alla registrazione REACH (Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals) (13).

Per sviluppare una normativa che regolamenti la produzione ed il consumo degli oli essenziali il parlamento europeo, l'Agenzia Europea per le Sostanze Chimiche (ECHA) e le autorità nazionali collaborano con diverse associazioni internazionali come: EFEO (European Federation of Essential Oils), IFEAT (International Federation of Essential oils and Aroma Trades), IFRA (International Fragrance Association), IOFI (International Organisation Of the Flavor Industry) e RIFM (Research Institute for Fragrance Materials), che mediano le esigenze tra i produttori degli oli essenziali e l'autorità regolatoria. La Federazione Europea degli Oli Essen-

ziali e l'Associazione Internazionale dei Produttori di Profumi hanno pubblicato linee guida per l'identificazione e la purezza di queste sostanze (14).

Gli oli essenziali sono sostanze potenzialmente pericolose ed è quindi necessario riportare sulle confezioni la specifica destinazione d'uso e le appropriate avvertenze per tutelare la salute del consumatore. Nell'etichetta dovrebbero essere riportate le seguenti indicazioni: purezza dell'olio, elenco dei componenti in base alla quantità in ordine decrescente, nome botanico della pianta di origine (in latino), istruzioni d'uso, metodo di produzione, parte di pianta da dove è stato estratto, paese di origine, numero di lotto di produzione, ente di certificazione e avviso (anche come simbolo) di sicurezza/pericolo. Un'altra importante informazione che deve essere presente è la data di scadenza dopo l'apertura (Fig. 1). Infatti, come tutti i composti organici, anche gli oli essenziali sono soggetti a degradazione soprattutto durante una prolungata e non corretta conservazione a causa di fattori come l'ossigeno, l'elevata temperatura e la presenza di luce. Le conseguenze di questa degradazione non solo alterano l'attività degli oli ma potrebbero renderli anche pericolosi per la salute.

### Modelli in vivo per la valutazione tossicologica degli oli essenziali

Come affermava Paracelso: "*Omnia venenum sunt, nec sine veneno quicquam existit. Dosis sola facit, ut venenum non fit*" (Tutte le cose sono un veleno e non esiste nulla che sia senza veleno. Solo la dose fa che una sostanza non sia veleno), anche per gli oli essenziali è fondamentale conoscere la concentrazione che li rende pericolosi. Per classificare la tossicità di una sostanza è necessario indi-

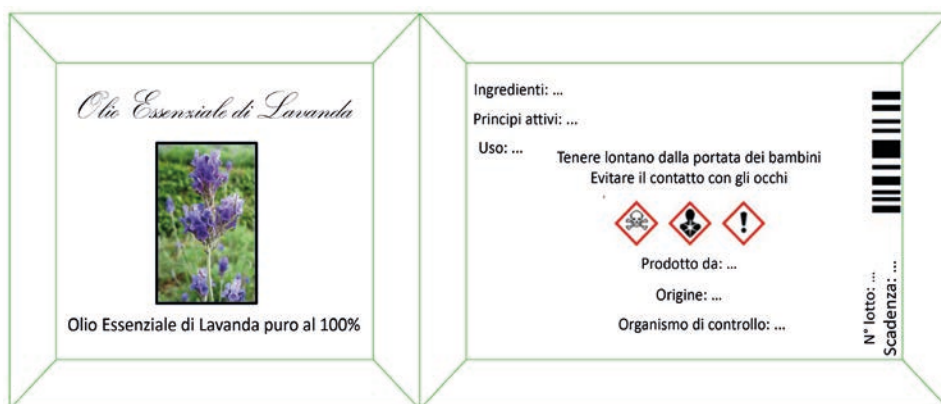


Fig. 1 Un esempio delle informazioni da riportare nell'etichetta

viduare la LD50 (Lethal Dose, Dose Letale), cioè la dose che risulta essere letale nel 50% dei soggetti trattati. Altri parametri importanti negli studi di tossicità sono: il tempo di esposizione (tossicità cronica o esposizione a lungo termine e tossicità acuta o a breve termine) e il metodo di somministrazione (via orale, topica o inalatoria).

Per indagare la tossicità di una sostanza devono essere effettuati degli studi che prevedano l'utilizzo di modelli in grado di rispondere ai potenziali effetti avversi che questa induce. Possono essere condotti studi *in vitro* che utilizzano linee cellulari o tessuti e presentano vantaggi come l'elevata riproducibilità, i bassi costi e risultati in breve tempo, oppure studi *in vivo* che prevedono l'impiego di animali e, a differenza degli studi sulle cellule, sono in grado di offrire una risposta più complessa, tenendo conto non solo di uno specifico tessuto ma dell'organismo intero e riproducendo più fedelmente le condizioni reali. Inoltre, l'impiego di animali permette di valutare fattori come l'età, il sesso, la specie, il tempo di esposizione e le vie di somministrazione (orale, inalatoria e topica) che non sono parametri analizzabili in uno studio *in vitro*. Il maggior numero di modelli *in vivo* impiegati per i test di tossicità prevede l'uso di mammiferi

come topi, ratti o conigli, che possiedono un profilo genomico conosciuto e ben dettagliato e con molte analogie con gli esseri umani.

Considerando l'elevata quantità di esperimenti che impiegano gli animali negli studi scientifici, nel 1959 Russel and Burch (15) hanno formulato il "**Principio delle 3R**: Replacement, Refinement and Reduction (Rimpiazzare, Ridurre e Rifinire)" per rimpiazzare o **sostituire** i modelli animali tradizionali con metodi *in vitro* o con modelli animali alternativi; **ridurre** il più possibile il numero di individui utilizzati; **refinire** o **alleviare** le sofferenze degli individui esaminati (Fig. 2).

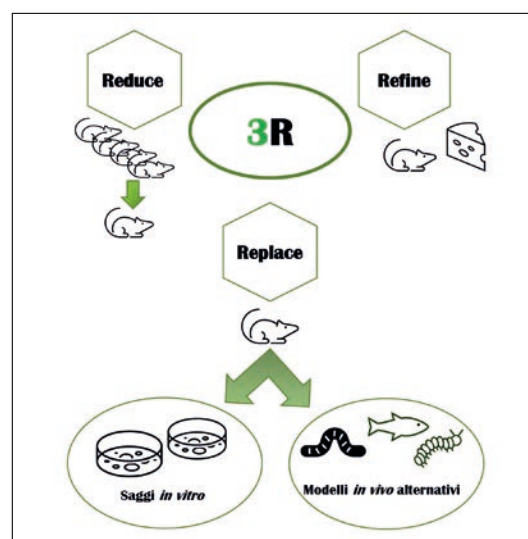


Fig. 2 Principio delle 3R: Replacement, Refinement, Reduction (Rimpiazzare, Ridurre, Rifinire)



Foto di Mark Yokoyama



Foto di Gérard

*Guaiacum officinale*. I metodi di estrazione degli OE, riconosciuti dalla Farmacopea Europea, sono la distillazione a vapore, la distillazione a secco e la pressatura a freddo

Gli oli essenziali di *Syzygium aromaticum* possono causare irritazione cutanea

Attualmente il principio delle 3R è accettato come standard scientifico ed è stato implementato nel quadro legislativo europeo dedicato alla protezione degli animali impiegati nella sperimentazione scientifica. I test sperimentali sui mammiferi seguono le linee guida per la valutazione della tossicità delle sostanze, definite dall'OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (16).

Per valutare la LD50 degli oli essenziali si utilizzano test di tossicità *in vivo* impiegando mammiferi e più raramente anfibi (rane), tuttavia nel rispetto del principio delle 3R, i mammiferi possono essere sostituiti con animali aventi un minore sviluppo neurologico

(Fig. 3). Uno dei modelli alternativi maggiormente utilizzato è il verme nematode *Caenorhabditis elegans*, considerato un intermedio tra i test *in vitro* ed *in vivo*. Mediante l'impiego di *C. elegans* è possibile valutare la letalità (LD50) nelle prime fasi dello sviluppo (larve del verme) e la tossicità riproduttiva (analisi del numero delle uova).

Per analizzare se un olio essenziale è in grado di provocare irritazione, normalmente si utilizza il Draize Test che solitamente si effettua sull'occhio del coniglio; una valida alternativa è l'HET-CAM test (Hen's Egg Test on the ChorioAllantoic Membrane) che prevede l'uso di uova di galline

fecondate. Dopo la rimozione del guscio, l'olio essenziale è posto sulla membrana corio-allantoidea (CAM) delle uova e la comparsa di emorragie o di coagulazione di sangue indica eventuali effetti tossici sulla membrana. I modelli animali di *C. elegans* e l'HET-CAM test sono stati usati recentemente in uno studio per valutare il potenziale di tossicità di oli essenziali di cedro, rosmarino ed eucalipto (17).

Tra gli invertebrati impiegati per testare la tossicità e l'efficacia degli oli essenziali sono state utilizzate le larve di *Galleria mellonella*, detta anche camola del miele, lepidottero che solitamente invade gli alveari. In un recente lavoro, i bruchi di *Galleria mellonella* sono stati



utilizzati per misurare l'efficacia di differenti oli essenziali di origano nel contrastare l'infezione fungina del patogeno umano *Candida albicans* (18). Altri modelli alternativi per studiare la tossicità degli oli essenziali sono i vertebrati acquatici come le "trote iridee" (*Oncorhynchus mykiss*). Questo pesce osseo vive sia in acqua dolce che marina, appartiene alla famiglia dei Salmonidi ed è spesso impiegato in tossicologia per testare sostanze utilizzate in acquacoltura. Anche negli allevamenti ittici si assiste al problema emergente del fenomeno dell'antibiotico-resistenza, pertanto gli oli essenziali sono sempre più utilizzati in acquacoltura sia come sostituti degli antibiotici,

### Modelli in vivo alternativi



*Caenorhabditis elegans*



*Galleria mellonella*



*Oncorhynchus mykiss* (trout iridea)



*Danio rerio* (Zebrafish)

Fig. 3 *Caenorhabditis elegans* è un verme nematode lungo circa 1 mm; *Galleria mellonella* è una falena della famiglia delle Pyralidae, ben nota per essere parassita delle api e dei loro alveari; *Danio rerio*, detto anche zebrafish, è un piccolo pesce di acqua dolce appartenente alla famiglia Cyprinidae; *Oncorhynchus mykiss* (trout iridea) è un pesce osseo d'acqua dolce e marina appartenente alla famiglia dei Salmonidae. Questi sono tra gli organismi modello più utilizzati negli studi di tossicologia e di biologia molecolare e dello sviluppo e dei loro alveari



**Tu pensi al CONTENUTO...  
Noi pensiamo al CONTENITORE!**

**FARMACEUTICA**



**COSMETICA**



**ERBORISTERIA**



**LABORATORIO**



**BOTTIGLIE ALIMENTARI**



**VASI-ALIMENTARI**



**CASALINGHI**



**Tel. 02 38100327 cell. 351 5416335**  
**E-mail: info@gizami.it www.gizami.it**

**Via Newton, 11**  
**20016 Pero Sud (MI) - Zona industriale**

grazie alle loro proprietà antimicrobiche, sia perché presentano una migliore biodegradabilità. Studi di tossicità acuta e prolungata sono stati condotti sulla trota iridea, per valutare la tossicità e il potenziale anti-parassitario degli oli essenziali di cumino e timo (19).

Un'altra specie frequentemente utilizzata in tossicologia è il pesce zebrato (Zebrafish) *Danio rerio*, appartenente alla famiglia delle *Cyprinidae* perché presenta numerosi vantaggi: si possono facilmente analizzare diversi periodi dello sviluppo dell'animale poiché sia lo stadio embrionale (le uova) che lo stadio giovanile (le larve) sono trasparenti; ha piccole dimensioni così richiede una minore quantità di sostanza da testare rendendolo così anche più economico; la prole è numerosa e la sua crescita rapida, così i tempi di risposta delle ricerche effettuate sono brevi. In uno studio del 2021, l'olio essenziale di *Zingiber officinale* è risultato teratogeno sugli embrioni di Zebrafish (20). Considerando l'elevato e sempre più frequente utilizzo degli oli essenziali, per garantirne un utilizzo più sicuro e consapevole si rende necessario implementarne lo studio tossicologico con modelli *in vitro* e *in vivo*; per quest'ultimi gli studi futuri saranno rivolti all'identificazione di nuovi modelli alternativi che garantiscano il benessere animale nel rispetto del principio delle 3R.

**\* Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità**

**\*\* Centro Nazionale per il Controllo e la Valutazione dei Farmaci, Istituto Superiore di Sanità.**

## Bibliografia

1. "https://www.intechopen.com/chapters/72267" Olio essenziale come agenti antimicrobici: efficacia, stabilità e problemi di sicurezza per l'applicazione alimentare | IntechOpen
2. "https://www.intechopen.com/chapters/71260" Profilo di sicurezza degli oli essenziali | IntechOpen
3. Harnett JE, McIntyre E, Steel A, et al. Use of complementary medicine products: A nationally representative cross-sectional survey of Australian adults. *BMJ Open*. 2019;9:e024198. DOI: 10.1136/bmjopen-2018-024198.
4. Khorasani F, Aryan H, Sobhi A, Aryan R, Abavi-Sani A, Ghazanfarpour M, Saeidi M, Rajab Dizavandi F. A systematic review of the efficacy of alternative medicine in the treatment of nausea and vomiting of pregnancy. *J Obstet Gynaecol*. 2020 Jan;40(1):10-19. doi: 10.1080/01443615.2019.1587392. Epub 2019 Jun 19. PMID: 31215276.
5. Wojtunik-Kulesza, K.A. Toxicity of Selected Monoterpenes and Essential Oils Rich in These Compounds. *Molecules* 2022, 27, 1716. <https://doi.org/10.3390/molecules27051716>
6. Dosoky NS, Setzer WN. Maternal Reproductive Toxicity of Some Essential Oils and Their Constituents. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 27;22(5):2380. doi: 10.3390/ijms22052380. PMID: 33673548; PMCID: PMC7956842
7. Fuentes C, Fuentes A, Barat JM, Ruiz MJ. Relevant essential oil components: a minireview on increasing applications and potential toxicity. *Toxicol Mech Methods*. 2021 Oct;31(8):559-565. doi: 10.1080/15376516.2021.1940408. Epub 2021 Jul 14. PMID: 34112059.
8. Vostinaru O, Codruta Heghes S, Filip L. Safety Profile of Essential Oils [Internet]. *Essential Oils - Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications*. IntechOpen; 2020. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.91363>
9. Singh S, Chaurasia PK, Bharati SL, et al. A mini-review on the safety profile of essential oils. *MOJ Biol Med*. 2022;7(1):33-36.
10. Jiahao Liang et al. Essential oils: Chemical constituents, potential neuropharmacological effects and aromatherapy - A review, *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*. 2023, 2-13.
11. R. Tisserand, R. Young, *Essential Oil Safety: a Guide for Health Care Professionals*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2014, 978-4430-6241-4)
12. Oli essenziali: destinazioni d'uso e riferimenti normativi - Gruppo Farmalmpresa
13. Il Regolamento (CE) n. 1907/2006 REACH - Centro Nazionale Sostanze Chimiche, prodotti Cosmetici e protezione del Consumatore (iss.it)
14. Essential oils - ECHA (europa.eu)
15. Russell W.M.S., Burch R.L. I principi della tecnica sperimentale umana. Methuen; Londra, Regno Unito: 1959. p. 23
16. [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788)
17. Lanzerstorfer P, Sandner G, Pitsch J, Mascher B, Aumiller T, Weghuber J. Acute, reproductive, and developmental toxicity of essential oils assessed with alternative *in vitro* and *in vivo* systems. *Arch Toxicol*. 2021 Feb;95(2):673-691. doi: 10.1007/s00204-020-02945-6. Epub 2020 Nov 7. PMID: 33159585; PMCID: PMC7870616
18. Kaskatepe, B., Aslan Erdem, S., Öztürk, S., Safi Öz, Z., Subasi, E., Koyuncu, M., Vlainić J. and Kosalec, I. Antifungal and anti-virulent activity of *Origanum majorana* L. essential oil on *Candida albicans* and *in vivo* toxicity in the Galleria mellonella larval model» *Molecules*, (2022),
19. Tabarraei H, Hassan J, Mosavi SS. Determination of LD50 of some essential oils and histopathological changes in short-term exposure to one of them in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology Research and Application*. 2019;3. doi: 10.1177/2397847318820719
20. Thitinarongwate W, Mektrirat R, Nimlamool W, Khonsung P, Pikulkaew S, Okonogi S, Kunanusorn P. Phytochemical and Safety Evaluations of *Zingiber officinale* Essential Oil in Zebrafish Embryos and Rats. *Toxics*. 2021 May 3;9(5):102. doi: 10.3390/toxics9050102. PMID: 34063620; PMCID: PMC8147612.