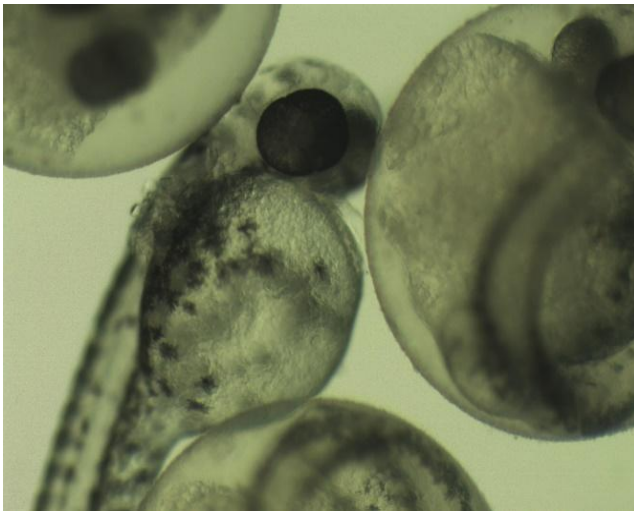


ESTUDI SOBRE LA TOXICITAT DELS OLIS ESSENCIALS  
*PIMPINELLA ANISUM*, *OCIMUM BASILICUM* I *EUCALYPTUS*  
*GLOBULUS* SOBRE EL PEIX ZEBRA *DANIO RERIO*



Nom: Marina Ramos Valios  
Grau: Ciències Ambientals  
Tutor: Santi Escartin  
Curs: 2017-2018  
Treball de Final de Grau  
Universitat de Girona

## Agraïments:

Donar les gràcies al meu tutor Santi Escartin per acompanyar-me en tot al procés; al Simone Mariani per la seva visió professional i la gran ajuda a l'hora de tractar les dades i aconseguir els resultats; a la Margarida Casadevall per atendre la gran quantitat de dubtes que m'han anat sorgint al llarg d'aquests mesos; a l'Anna Menció per la seva ajuda en els petits detalls i al Frederic Gich per la seva aportació toxicològica.

A la Bàrbara Rovira i la Judith Escudero per no haver dubtat en cap moment en donar-me un cop de mà i a l'Anna García per introduir-me en el món del peix zebra.

I finalment, donar les gràcies a la meua família i els meus amics per estar al meu costat, per totes les preguntes i respostes, per l'interès i per donar-li a aquest treball la mateixa importància que jo l'hi he donat.

Gràcies a tots.

## Abstract

The use of pesticidal products that have the least impact on the environment is widely acknowledged. Essential oils from a wide variety of plants have been used as insect repellents and larvicides for centuries. Nevertheless, the research that has evaluated the toxicity of essential oils in vertebrates is scarce or completely missing. This paper aims to test the toxicity of essential oils of green anise (*Pimpinella anisum*), basil (*Ocimum basilicum*) and blue eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) with aquatic vertebrates. These oils are recognized larvicides. Embryos of less than 64 hours of zebra fish (*Danio rerio*) were used as a non-target organisms to conduct toxicity tests using concentrations of 70 $\mu$ L / L, 50 $\mu$ L / L and 20 $\mu$ L / L of the three oils. The results obtained were used to find lethal concentration at which 50 of the tested organisms (LC 50) died through a Probit function. For anise, in the case of zebrafish, LC 50 was 48.47  $\mu$ L / L while for eucalyptus and basil oils this concentration could not be found because we could not find dead more than half of the organisms in the treatments. In the case of mosquito larvae, similar results were found being the LC 50 for anise oil 59.97  $\mu$ L / L. Again, we could not find the LC 50 for eucalyptus oils and basil. The differences between treatments were significant in the case of the experiments with anise, both with zebrafish embryos and mosquito larvae. These results support the efficacy of aniseed oil as larvicide but warn about the danger of using it in the environment. While basil and eucalyptus oils appear to be effective larvicides from other studies, our results do not support these findings and provide relevant information about the safety of these oils with vertebrates. Our results indicate the need to carry out specific tests with non-target organisms before accepting a priori that essential oils with larvicidal properties are safe for other all organisms living in aquatic systems.

## Resum

Hom reconeix la necessitat d'utilitzar productes pesticides que tinguin el menor impacte possible sobre el medi ambient. Els olis essencials extrets d'una gran varietat de plantes han estat utilitzats com a repel·lents d'insectes i larvicides des de fa segles. Tanmateix, els treballs que avaluen la toxicitat dels olis essencials en vertebrats són escassos o falten per complet. Aquest treball té com a finalitat testar la toxicitat dels olis essencials de l'anís verd (*Pimpinella anisum*), l'alfàbrega (*Ocimum basilicum*) i l'eucaliptus blau (*Eucalyptus globulus*) amb vertebrats aquàtics. Aquest olis són reconeguts larvicides. Es va utilitzar el peix zebra (*Danio rerio*) com a espècie no-diana i, concretament, els embrions de menys de 64 hores de vida per fer proves de toxicitat utilitzant concentracions de 70µL/L, 50µL/L i 20µL/L dels tres olis. Els resultats obtinguts es van utilitzar per buscar la concentració letal a la qual es moria el 50 dels organismes testats (CL 50) mitjançant la funció Probit. Per l'anís, en el cas del peix zebra, la CL 50 ha estat 48.47 µL/L mentre que pels olis d'eucaliptus i d'alfàbrega no s'ha pogut trobar aquesta concentració doncs en cap cas s'ha arribat a la mort de més de la meitat dels organismes testats als tractaments. En el cas de les larves de mosquit, es troben resultats semblants sent la CL 50 per l'oli d'anís de 59.97 µL/L mentre que pels olis d'eucaliptus i alfàbrega tampoc s'ha obtingut aquesta concentració. Les diferències entre tractaments van ser significatives en el cas dels experiments amb anís, tant amb els embrions de peix zebra com amb les larves de mosquit. Aquests resultats suporten la eficàcia de l'oli d'anís com a larvicida però alerten sobre el perill d'utilitzar-lo al medi. Mentre que a altres estudis els olis d'alfàbrega i d'eucaliptus semblen funcionar com a eficients larvicides, els nostres resultats no suporten aquestes troballes i proporcionen informació rellevant sobre la innocuïtat d'aquests darrers olis amb vertebrats. Els nostres resultats indiquen la necessitat de dur a terme proves específiques amb organismes no-diana abans d'acceptar a priori que els olis essencials amb propietats larvicides siguin innocus per als altres organismes que viuen als sistemes aquàtics.

## Resumen

Se reconoce la necesidad de utilizar productos pesticidas que tengan el menor impacto posible sobre el medio ambiente. Los aceites esenciales extraídos de una gran variedad de plantas han sido utilizados como repelentes de insectos y larvicidas desde hace siglos. Al mismo tiempo, los trabajos que evalúan la toxicidad de los aceites esenciales en vertebrados son escasos o incluso inexistentes. Este trabajo tiene como finalidad testar la toxicidad de los aceites esenciales del anís verde (*Pimpinella anisum*), la albahaca (*Ocimum basilicum*) y el eucalipto azul (*Eucalyptus globulus*) en vertebrados acuáticos. Estos aceites son reconocidos larvicidas. Se utilizó el pez cebra (*Danio rerio*) como especie no-diana y, concretamente, los embriones de menos de 64 horas de vida para las pruebas de toxicidad utilizando concentraciones de 70 $\mu$ L/L, 50 $\mu$ L/L y 20 $\mu$ L/L de los tres aceites. Los resultados obtenidos se utilizaron para buscar la concentración letal en la cual se moría el 50% de los organismos testados (CL 50) mediante la función Probit. Para el anís, en el caso del pez cebra, la CL 50 ha sido 48.47  $\mu$ L/L mientras que para los aceites de eucalipto y albahaca no se ha podido encontrar esta concentración debido a que en ningún caso se ha llegado a la muerte de más de la mitad de los organismos testados en los tratamientos. En el caso de las larvas de mosquito, se obtienen resultados parecidos siendo la CL 50 para el aceite de anís 59.97  $\mu$ L/L mientras que para los aceites de eucalipto y albahaca tampoco se ha obtenido esta concentración. Las diferencias entre tratamientos fueron significativas en el caso de los experimentos con anís, tanto con los embriones de pez cebra como con las larvas de mosquito. Estos resultados apoyan la eficacia del aceite de anís como larvicida pero alertan sobre el peligro de utilizarlos en el medio. Mientras que en otros estudios los aceites de albahaca y eucalipto parecen funcionar como eficientes larvicidas, nuestros resultados no secundan estos hallazgos y proporcionan información relevante sobre la inocuidad de los anteriores aceites en vertebrados. Nuestros resultados indican la necesidad de llevar a cabo pruebas específicas con organismos no-diana antes de aceptar a priori que los aceites esenciales con propiedades larvicidas sean inocuos para otros organismos que viven en los sistemas acuáticos.

# Índex

Introducció .....	7
Antecedents .....	7
Olis essencials.....	8
Manca d'estacions depuradores d'aigües residuals .....	9
Peix Zebra com a organisme no diana: <i>Danio rerio</i> .....	9
Objectius .....	11
Materials i metodologia .....	12
Preparació de l'aquari i rutina.....	12
Procés de creuament .....	13
Prova de toxicitat dels olis essencials de: l'anís <i>Pimpinella anisum</i> , l'eucaliptus <i>Eucalyptus globulus</i> i l'alfàbrega <i>Ocimum basilicum</i> en el peix zebra <i>Danio rerio</i> .....	14
Prova de toxicitat dels olis essencials de l'anís <i>Pimpinella anisum</i> , l'eucaliptus <i>Eucalyptus globulus</i> i l'alfàbrega <i>Ocimum basilicum</i> en el mosquit del gènere <i>Culiseta</i> .....	16
Anàlisi dels resultats:.....	16
Resultats.....	18
Olis essencials vs. peix zebra.....	18
Olis essencials vs. <i>Culiseta sp.</i> .....	20
Discussió.....	21
Conclusions .....	23
Bibliografia .....	24

## Introducció

En els darrers anys, la preocupació de la societat per una vida cada cop més saludable, tant per les persones com pel medi ambient, ha anat en augment. Això es veu reflectit en l'elecció de productes tant per a l'alimentació o la higiene personal com en protectors d'agents externs. Davant d'aquesta demanda per part de la població, les empreses han hagut de renovar-se per poder oferir productes que satisfacin aquesta tendència i promoguin la sostenibilitat.

El producte "eco-friendly" en anglès, o "ecològic" en català, el defineix la Generalitat de Catalunya com "Dit del producte, la tècnica o el procés que té un impacte gens perjudicial o poc perjudicial sobre el medi al llarg de les fases de producció o aplicació". Són molts els productes d'aquestes característiques que han vist com la seva demanda augmenta any rere any. Un exemple serien els repel·lents de mosquits perquè són productes que en certes èpoques de l'any o en certes zones, arriben a tenir un ús diari i a més a més, s'apliquen directament sobre la pell, tant d'adults com de nens petits. Aquestes substàncies majoritàriament provenen dels olis essencials d'algunes plantes, i poden venir directament en format d'oli o en format de crema. L'augment de la demanda de productes ecològics fa que cada cop siguin més les empreses i productes que es comercialitzen sota aquesta etiqueta.

### Antecedents

Estudis previs han demostrat que alguns olis vegetals, a més de tenir clares propietats repel·lents en front els mosquits, també poden resultar efectius eliminant les larves d'aquests insectes. Tot sovint es dona per descomptat que un oli essencial d'origen natural (no de síntesi) que funciona com a larvicida contra insectes és innocu amb organismes no diana com són ara molts vertebrats aquàtics. Les organitzacions internacionals que vetllen per la seguretat dels productes pesticides són les responsables de definir si un oli essencial és perjudicial o no per als organismes no diana i pel medi ambient. De la mateixa manera, paradoxalment, sovint no es duen a terme les proves necessàries sinó que s'utilitzen treballs científics de terceres persones que no sempre relacionen el producte en qüestió amb un organisme no diana. Tot plegat, es tendeix a assumir que un oli essencial, pel simple fet de ser natural o "eco-friendly" ha de ser necessàriament innocu. Recentment, Escartin i Mariani (2014) van observar que l'oli essencial de l'eucaliptus *Corymbia citriodora* era letal per a les larves de mosquit tigre (*Aedes albopictus*) i, al mateix temps, ho era per al peix *Gambusia affinis* o els capgrossos de l'espècie *Pelophylax perezi*. Seguint aquesta "moda" dels olis essencials, altres autors han testat un ventall enorme d'aquests productes amb propietats insecticides en l'intent de trobar una alternativa ecològica a la problemàtica de les plagues de mosquits (Monzon et al. 1994, Chantraine et al. 1998, Lucia et al. 2008).

Degut a aquesta problemàtica, i a partir d'aquests treballs, es planteja realitzar aquest estudi provant diferents olis, amb conegudes propietats larvicides, amb un vertebrat, el peix zebra *Danio rerio*. Els efectes que poden tenir alguns d'aquests productes en el peix zebra ja han estat estudiats (Lucia, Licastro, Zerba i Masuh 2008) i és per això que es decideix aquí d'ampliar aquests estudis provant diferents olis en el peix zebra.

## Olis essencials

Els olis essencials són substàncies que es troben en diferents teixits vegetals i que contenen nombrosos compostos químics que, en gran part, són els derivats d'algunes funcions metabòliques de les plantes (tot sovint terpens) i s'utilitzen, pels mateixos vegetals, com a dissuasius de l'herbivorisme o del parasitisme per part de vertebrats i invertebrats. Per aquesta raó, molts compostos són tòxics per a un ampli espectre d'insectes que es poden alimentar o poden parasitar la planta. Des de fa dècades s'està intentant trobar solucions per lluitar contra les plagues d'insectes que any rere any envaeixen els cultius o són perjudicials per als humans als centres urbans. Una d'aquestes plagues ve representada per una llarga llista de mosquits, encapçalada a Europa pel mosquit de nit (*Culex pipiens*) i el mosquit tigre (*Ae. albopictus*), dues espècies que ens podem trobar pràcticament a tot el territori català.

Els darrers estudis han proporcionat resultats prometedors en quan als olis essencials com a larvicides de mosquit (Pavela 2015) els quals, com ja dèiem abans, es consideren automàticament no tòxics per a vertebrats i humans pel simple fet de ser extrets de plantes. Entre tota una varietat de possibilitats (vegeu Pavela 2015), s'han escollit aquí els olis essencials de l'anís verd *Pimpinella anisum*, l'alfàbrega *Ocimum basilicum* i l'eucaliptus blau *Eucalyptus globulus* per les seves propietats larvicides contra el mosquit i per ser comuns a la nostra societat actual.



Figura 1. *Pimpinella anisum*. Font: <http://www.plantasmedicinales10.com/articulo/anis-verde.html>

L'anís verd (figura 1) pertany a la família de les apiàcies i és originari de l'Orient. L'oli essencial ens aporta minerals vegetals i vitamines i serveix per combatre mals de cap, calmar dolors menstruals o ajudar a la digestió. L'oli de l'anís verd s'obté de les fulles de la planta.



Figura 2. *Ocimum Basilicum*. Font: <http://www.elcorreodelsol.com/articulo/albahaca-planta-altruista>

L'alfàbrega (figura 2) pertany a la família de les lamiàcies i és originària de l'Índia. Aquesta planta es fa servir molt a la cuina mediterrània aprofitant l'aroma de les seves fulles i llavors.



Per altra banda l'oli essencial d'aquesta lamiàcia té beneficis pel sistema digestiu, immunològic i nerviós. Aquest oli s'obté a partir de les fulles i les tiges.



Figura 3. *Eucalyptus globulus*. Font: <http://www.photomazza.com/?Eucalyptus-globulus&lang=es>



Figura 4. *Eucalyptus globulus*. Font: <http://www.ciudadciencia.es/eucalipto/>

L'Eucaliptus blau (figures 3 i 4) és un arbre de la família de les mirtàcies originària del Sud-Est d'Austràlia. Pot arribar a fer una alçada de 100 metres i el seu oli essencial s'obté de les seves fulles. Té propietats diverses com per exemple antisèptiques o antiinflamatòries i s'utilitza en aromateràpia o en tractaments de les infeccions de les vies respiratòries.

Tot i que els olis essencials provenen de productes naturals, també poden ser tòxics o perjudicials pels ecosistemes i els seus organismes, per tant, es provarà la seva toxicitat amb un vertebrat aquàtic com és el peix zebra *Danio rerio*.

#### **Manca d'estacions depuradores d'aigües residuals**

Al medi aquàtic una de les problemàtiques és l'abocament incontrolat d'aigües residuals directament als rius o mars.. Actualment a Catalunya hi ha més de 500 EDAR (Agència Catalana de l'Aigua) i tracten les aigües residuals d'una gran part dels municipis del territori. Tot i així, encara hi ha molts punts on no es tracten les aigües, ja sigui per manca de recursos o per ser municipis molt petits que no hi estan obligats.

Una EDAR tracta tant les aigües residuals domèstiques com les d'escorrentia. Un cop fet el procés, la major part d'aquesta aigua retorna al lloc d'on es va extreure, ja sigui un riu, embassament o aquífer. Una EDAR compta amb un pre-tractament, tractament primari, tractament secundari o biològic i finalment, si és necessari, l'estació depuradora tindrà un tractament terciari. És al pre-tractament on aquest tipus de productes desapareixen en major part. La disminució d'aquests olis i greixos disminuiria el cost de la neteja d'aigües però per altre banda, com ja s'ha dit anteriorment, al haver-hi poblacions que encara no tenen depuradora, aquests productes arriben directament i sense cap tractament al medi aquàtic. El pre-tractament s'encarrega d'eliminar matèria en suspensió més gran de 5 mm, eliminar sorres, olis, greixos i homogeneïtzar.

#### **Peix Zebra com a organisme no diana: *Danio rerio***

En les últimes dècades, aquesta espècie s'ha fet servir àmpliament als laboratoris perquè el seu genoma presenta una semblança amb el de l'ésser humà de més del 70% (Kerstin et al 2013). Tant mateix, té una gran capacitat per regenerar òrgans que han estat parcialment amputats i els seus embrions són transparents, fet que permet l'observació del desenvolupament embrionari durant tot el procés (Lin, Chiang i Tsai 2016). La seva presència

en molts laboratoris també es veu afavorida per tenir una gran capacitat de reproducció i presentar una mida petita que permet estabular molts individus en un espai reduït.

El peix zebra és un peix tropical de la família dels ciprínids originari de Bangladesh i Nepal. Té una forma fusiforme, amb una única aleta dorsal i presenta un estampat de ratlles blaves horitzontals al llarg de tot el seu cos que li donen aquest nom. Presenta un lleuger dimorfisme sexual (figura 5); els mascles són més prims, estilitzats i amb tonalitats daurades mentre que les femelles acostumen a ser més grans, amb un abdomen pronunciat i tonalitats més platejades. Tot i això, pot resultar molt difícil distingir un mascle d'una femella. Són peixos que



Figura 5. Mascle i femella *Danio rerio*

es reproduïxen durant tot l'any i que tenen una gran capacitat d'adaptació als canvis en el medi. Tot i ser una espècie euriterma (Schaefer i Ryan, 2006), la seva temperatura ideal es troba al voltant del 28 graus encara que pot viure entre els 22 i els 30 però sense reproduir-se. Té una esperança de vida de 2 anys tot i que en condicions òptimes aquest temps es pot veure augmentat. El pH de l'aigua ha d'estar entre 7 i 8 (Sang Ho, Chanchal, Imran and Sun Chul, 2017). A la natura el podem trobar tant en rierols com en aigües estancades i s'alimenten de zooplàncton i insectes (Westerfield, 2000). És un peix que té una alta demanda dins el món de l'aquariofília per la seva actitud tranquil·la i afable, la capacitat de conviure amb altres espècies i la seva reduïda mida. Segons la Llista vermella d'espècies amenaçades de la IUCN (The IUCN Red List of Threatened, 2017) l'estat d'amenaça del peix zebra en l'actualitat a nivell mundial és de "preocupació menor".

# Objectives

## Main goal

- Testing the toxicity of essential oils with larvicidal properties in mosquitoes, on the zebrafish *Danio rerio* in its embryonic stage as a study model.

## Specific goals

On the basis of the main objective, three direct specific objectives are derived:

- Testing the toxicity of the essential oil of anise *Pimpinella anisum*, basil *Ocimum basilicum* and Tasmanian bluegum *Eucalyptus globulus* in the larval stage of the zebrafish.
- Testing the toxicity of the essential oil of anise *Pimpinella anisum*, basil *Ocimum basilicum* and Tasmanian blue gum *Eucalyptus globulus* in the larvae of the mosquito of the genus *Culiseta*.
- Comparing the toxicity of the oils studied between vertebrates (larvae of the zebrafish) and invertebrates (aquatic mosquito larvae) from previous studies. It is necessary to reach a previous operational objective to achieve all the stated goals:
  - Keeping the zebrafish in optimal conditions to ensure a good lay with the maximum of viable and healthy embryos. In this way, we can understand the whole process of crossing and embryonic development.

## Materials i metodologia

A l'hora d'escollir l'espècie de l'estudi es van tenir en compte diferents aspectes:

- i. que fos un vertebrat
- ii. que fos fàcil d'aconseguir
- iii. que tingués un rang de tolerància ampli envers el seu hàbitat
- iv. que permetés fer l'estudi durant l'hivern
- v. poder evitar problemes legals i ètics

L'espècie escollida va estar el peix zebra *Danio rerio* per comptar amb tots aquests aspectes a més de ser de fàcil accés.

### Preparació de l'aquari i rutina

Amb l'objectiu de preparar l'hàbitat dels peixos adults, es va escollir un tanc de 50 L (figura 6) afegint 47 litres d'aigua de l'aixeta (municipi de Cardedeu al Vallés Oriental) amb 5 ml de "Dajana-Aquasan" per cada 25 L d'aigua per tal d'eliminar el Clor. Es va instal·lar un escalfador d'aigua per mantenir-la a 27 °C amb una variació de +/- un grau (Westerfield, 2000). Durant la



Figura 6. Aquari dels adults

nit la temperatura es va mantenir a 26°C i durant el dia a 28°C. Dintre de l'aquari es va incorporar un termòmetre per poder anar-la controlant al llarg del dia. També es va col·locar, un oxigenador que injecta bombolles d'aire a l'aigua per tal de trencar la superfície i afavorir l'intercanvi de gasos entre l'aigua i l'aire. El sistema també disposava d'un filtre amb un cabal de 300L/h que funciona 24 hores al dia (figura 6).

Un cop l'aigua ja no tenia clor i va adquirir la temperatura adient, es van afegir 5 mascles i 8 femelles de peix zebra seguint el procés d'aclimatació establert per peixos nascuts en captivitat, i es van afegir 20 ml de "Dajana-Biofilter" per cada 40 L per activar tot el cicle de l'aigua i del filtre. Un dia a la setmana es treien 3 L de l'aquari i s'afegien 4 L anticlorats prèviament amb 0.2ml d'anticlor per cada L. Es va posar un litre de més cada setmana per

contrarestar l'evaporació i mantenir el nivell de 47 L a l'aquari. Fent aquests canvis d'aigua, es va aconseguir canviar un quart de l'aigua total al mes. Per altra banda, un cop setmanalment, també es treia el filtre, es desmuntava i es netejava. Un cop col·locat de nou el filtre net, s'afegien 13ml de bacteries de manteniment segons la prescripció del producte. Així mateix, cada dos dies, i amb una reixa fina, es filtrava el fons de l'aquari per treure el màxim d'excrements dipositats que podrien fer augmentar els nivells de nitrats. La tapa de l'aquari compta amb un llum fluorescent neutre i un ventilador que bé incorporat que afavoreix la renovació de gasos a l'aquari. Per tal de que la llum que rebien els peixos s'adaptés al seu ritme circadià, el llum es mantenia obert 12 hores al dia, des de les 8 del matí fins els 8 de la tarda. El llum i el ventilador estan connectats i per tant quan s'encenia o s'apagava el llum, el ventilador seguia la mateixa ordre.

### Procés de creuament



*Figura 7. Paridora*

El mètode escollit per a la reproducció del peix és a partir de petits recipients anomenats "paridores" (figura 7). Les paridores són de plàstic i comprenen dues parts. La primera és el recipient exterior sense cap mena de forat, i dintre d'aquest, va encaixada la segona part que té el fons reixat per tal que els ous es colin i els progenitors no els tinguin a l'abast ja que es tracta d'una espècie que es menja els seus propis ous. A la paridora es pot col·locar una barrera al mig per tal de separar els peixos per sexe i així poder controlar totalment en quin moment volem la posta. S'omplen amb 800 ml d'aigua de l'aixeta escalfada prèviament fins els 28 graus amb 0.16 ml de "Dajana-Aquasan". Les paridores es van posicionar a una habitació aclimatada a 28 graus amb una variació d'un grau mitjançant una estufa i un calefactor d'aire. La temperatura es va controlar constantment a partir d'un termòmetre exterior i un termòmetre a l'interior d'una paridora. Abans de fer cap creuament, es feia un anàlisi bàsic de l'aigua de l'aquari per confirmar que la qualitat era l'adient per tenir un peixos sans i dos dies abans es canviava l'alimentació per menjar no processat com són les artèmies salines (Westerfield, 2000). Amb la finalitat d'assegurar la posta es van col·locar dues femelles per mascle a la paridora, separats per la barrera i tapats perquè es tracta d'una espècie neguitosa. A l'habitació aclimatada es tancaven els llums a les 8 de la tarda i es mantenien així al llarg de 12 hores fins les 8 del matí quan s'encenien i es treia la barrera que separava per sexe perquè comencés tot el procés reproductiu. A la natura, aquest peix fa la posta amb les primeres llums

del dia i es per això que en menys de mitja hora la femella posava els ous i es deixaven 15 minuts de marge perquè el mascle els fertilitzés.

**Prova de toxicitat dels olis essencials de: l'anís *Pimpinella anisum*, l'eucaliptus *Eucalyptus globulus* i l'alfàbrega *Ocimum basilicum* en el peix zebra *Danio rerio***

Estudis previs han demostrat l'eficàcia d'aquests olis essencials com a larvicides de mosquit mostrant una concentració letal a la qual moren el 50% de les larves (CL50)  $\leq 50$  ppm o 50  $\mu\text{L/L}$  (Pavela, 2015). Es per això que es decideix provar concentracions de 70, 50 i 20  $\mu\text{L/L}$  en les larves del peix zebra. A fi d'una total homogeneïtzació de l'oli amb l'aigua, es va utilitzar el dissolvent Tween 80 (Escartin i Mariani 2014). Seguint el procediment explicat anteriorment sobre el creuament, es van realitzar tres creuaments obtenint la posta d'una de les paridores. S'aconsegueixen 259 ous amb una viabilitat del 52%. Per fer l'estudi de cada oli són necessaris 60 ous.

- ***Pimpinella anisum***

Es van agafar 0.07 ml d'oli i es van col·locar en un recipient de vidre. Es van afegir 0.1 ml de Tween 80, incorporant 50 ml d'aigua d'aquari i barrejant el total. Al formar-se col·loides, es van incorporar 0.1 ml més de Tween 80 fins que la barreja va estar totalment homogeneïtzada. Amb l'objectiu d'aconseguir una concentració de 70  $\mu\text{L/L}$ , es va passar la barreja a un recipient de 1 L i es va enrasar amb aigua de l'aquari.

Un cop es va tenir preparada la solució amb la concentració més alta, es va fer servir com a solució mare per aconseguir la resta de concentracions mitjançant els següents càlculs:

$$100 \text{ ml} * \left( \frac{50 \mu\text{L}}{1000 \text{ ml}} \right) * \left( \frac{1000 \text{ ml}}{70 \mu\text{L}} \right) = 71,42 \text{ ml de la solució mare}$$

Per aconseguir la concentració de 50  $\mu\text{L/L}$ , es van agafar 71,42 ml de la solució mare, col·locant-los en un recipient de 100 ml i enrasant amb aigua de l'aquari.

$$100 \text{ ml} * \left( \frac{20 \mu\text{L}}{1000 \text{ ml}} \right) * \left( \frac{1000 \text{ ml}}{70 \mu\text{L}} \right) = 28,57 \text{ ml de la solució mare}$$

Per aconseguir la concentració de 20  $\mu\text{L/L}$ , es van agafar 28.57 ml de la solució mare, col·locant-los en un recipient de 100 ml i enrasant amb aigua de l'aquari.

Un cop van estar preparades les tres concentracions, es va preparar la concentració control a partir de l'aigua de l'aquari amb la mateixa quantitat de dissolvent (Tween 80) que la resta de les mostres, sent en aquest cas 0.2 ml/L

Per cada concentració es van crear 3 rèpliques tenint a cada rèplica 5 larves de peix zebra de 48/62 hores post-fecundació (hpf). Es van posar 20 ml de medi per placa de Petri amb 5 larves, es van tapar i es van mantenir a 28 graus  $\pm 1$ .

- ***Eucalyptus globulus***

Es va seguir el mateix procediment que per l'oli essencial d'anís però només es van afegir 0.1 ml de Tween 80 al no haver-se format col·loides durant la barreja. Es va agafar la concentració més alta de 70 µL/L com a solució mare, i es van obtenir les concentracions de 50 i 20 µL/L.

$$100 \text{ ml} * \left(\frac{50\mu\text{L}}{1000\text{ml}}\right) * \left(\frac{1000\text{ml}}{70\mu\text{L}}\right) = 71,42 \text{ ml de la solució mar}$$

Per obtenir la concentració de 50 µL/L, es van agafar 71,42 ml de la solució mare, es van col·locar en un recipient de 100 ml i es van enrasar amb aigua de l'aquari fins arribar a un litre.

$$100 \text{ ml} * \left(\frac{20\mu\text{L}}{1000\text{ml}}\right) * \left(\frac{1000\text{ml}}{70\mu\text{L}}\right) = 28,57 \text{ ml de la solució mare}$$

Per obtenir la concentració de 20 µL/L, es van agafar 28,57 ml de la solució mare, es van col·locar en un recipient de 100 ml i es va enrasar amb aigua de l'aquari fins arribar a un litre.

En aquest cas també es van crear 3 rèpliques per a cada concentració amb 5 larves de peix zebra de 48/62 hpf per cada rèplica. Els controls per aquest oli estaven preparats amb una concentració de 0.1 ml/L de Tween 80. Es van posar 20 ml de medi per placa de Petri amb 5 larves, es van tapar i es van mantenir a 28 graus ± 1.

- ***Ocimum basilicum***

Per la prova amb l'oli essencial de l'alfàbrega, al no disposar de més embrions, es van fer tres creuaments més aconseguint la posta en una de les paridores i obtenint 259 ous amb una viabilitat del 57%.

Seguint el mateix procediment que pels dos olis anteriors, es va afegir 0.1 ml de dissolvent Tween 80 tant a la solució mare com a la solució control. Un cop preparada la solució mare de 70 µL/L es van obtenir també, a partir d'aquesta, les dues solucions amb concentracions menors restants. Aquestes dues concentracions menors es van aconseguir de la mateixa manera que en els dos olis anteriors.

$$100 \text{ ml} * \left(\frac{50\mu\text{L}}{1000\text{ml}}\right) * \left(\frac{1000\text{ml}}{70\mu\text{L}}\right) = 71,42 \text{ ml de la solució mar}$$

Per tenir la concentració de 50 µL/L, es van agafar 71,52 ml de la solució mare, es van col·locar en un recipient de 100 ml i es va enrasar amb aigua de l'aquari.

$$100 \text{ ml} * \left(\frac{20\mu\text{L}}{1000\text{ml}}\right) * \left(\frac{1000\text{ml}}{70\mu\text{L}}\right) = 28,57 \text{ ml de la solució mare}$$

Per obtenir la concentració de 20 µL/L, es van agafar 28,57 ml de la solució mare, es van col·locar en un recipient de 100 ml i es va enrasar amb aigua de l'aquari.

Com en els dos estudis anterior, es van crear 3 rèpliques per cada concentració amb 5 larves de peix zebra de 48/58 hpf per cada rèplica. Els controls van tenir una concentració de 0.1 ml/L de Tween 80. Es van posar 20 ml de medi per placa de Petri amb 5 larves i es van tancar i mantenir a 28 graus  $\pm$  1.

Amb l'objectiu d'avaluar i determinar la mortalitat de les larves, i gràcies a la transparència dels teixits del peix, s'anava controlant el batec del cor. Quan aquest era inexistent, es considerava que aquell individu havia mort.

**Prova de toxicitat dels olis essencials de l'anís *Pimpinella anisum*, l'eucaliptus *Eucalyptus globulus* i l'alfàbrega *Ocimum basilicum* en el mosquit del gènere *Culiseta*.**



Figura 8. Proba dels olis en *Culiseta.sp*

Per dur a terme les proves de toxicitat en les larves de mosquit es van escollir 180 larves del gènere *Culiseta* en estadi 3. Es van destinar 60 larves per cada oli, de manera que s'han fet 3 rèpliques per concentració amb 5 larves per rèplica igual que en l'estudi amb el peix zebra. En aquest cas, l'habitació es va mantenir a temperatura ambient al voltant dels 22 °C  $\pm$  1 grau. Per tal de fer un ús sostenible de l'aigua, es van fer servir les solucions mare creades per l'estudi de *Danio rerio* i a partir d'aquestes, aplicant els mateixos factors de conversió, es van obtenir les tres concentracions. Amb la finalitat de que els dos estudis siguin el més semblants possible, es van fer servir els mateixos materials i la mateixa aigua en tot el procés (figura 8). Per confirmar la mort de les larves de mosquit, s'avaluava la seva mobilitat. Si durant 2 minuts la larva no feia cap tipus de moviment, es donava per morta.

**Anàlisi dels resultats:**

Per cada experiment es van calcular les mitjanes de la mortalitat de peixos i mosquits a les tres rèpliques així com els errors estàndards. Amb aquests resultats es van crear els respectius gràfics amb el programa Sigma Plot 12.0.

Quan era possible, les diferències entre tractaments i controls, tant per l'experiment amb els peixos zebra com per les larves de *Culiseta sp.*, es van comparar mitjançant anàlisis de la variància de les medianes Kruskal-Wallis que es van dur a terme mitjançant el programa lliure Past 3. Les diferències específiques per parells entre tractaments i controls es van comparar amb el mètode no paramètric Mann-Whitney.

Finalment, la concentració a la qual es moria el 50% dels peixos i de les larves es va testar mitjançant regressions de tipus Probit amb el programa lliure MedCalc.



## Materials

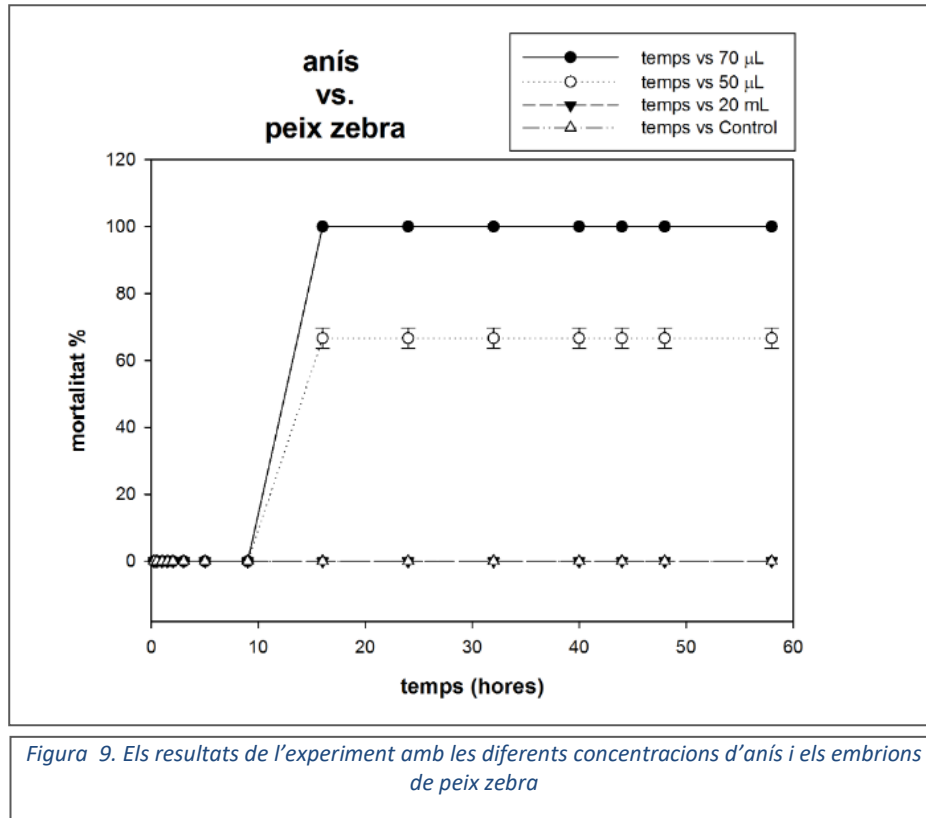
Per a dur a terme els experiments es van utilitzar els utensilis i productes mencionats a continuació:

- Peixos zebra *Danio rerio*
- Aquari de 50 L
- Paridores d'1 L
- Pipetes Pasteur 3ml
- Pipetes Pasteur 2ml
- Xeringues de 0.5 ml
- Xeringues de 2,5 ml
- Xeringues de 10 ml
- Eppendorf 1.5ml
- Plaques de Petri
- Formaldehid 4%
- Menjar escamat de peixos tropicals "TetraMin"
- Artèmies congelades (*Artemia salina*)
- Anticlor "Dajana-Aquasan"
- Bactèries vives "Dajana-Biofilter"
- Guants de nitril
- Oli essencial *Pimpinella anisum*. "Terpenic labs". 10 ml
- Oli essencial *Eucalyptus globulus*. "Marnys". 15 ml
- Oli essencial *Ocimum basilicum*. "Mystic moments". 50 ml
- Suero fisiològic 0.9% NaCl
- Blau de metilè 0.1 %
- Tween 80
- Reixa per seleccionar peixos
- Reixa per netejar el fons de l'aquari
- Termòmetres aquàtic
- Termòmetre d'exterior
- Escalfador d'aire "Kendal-750W" i "Fagor-2000W"
- Escalfador d'aigua "Akbastabil-200W"
- Filtre d'aigua "Adjustable filtre-300l/h"
- Oxigenador "Elite 800-2W"
- Lupa "optika microscopes talus 10x"
- Llum "Philips 18w PL-L"

## Resultats

### Olis essencials vs. peix zebra.

Tots els embrions de peix zebra van morir després de 16 hores al tractament amb la concentració de 70  $\mu\text{L/L}$  d'anís (figura 9). Tot i que a les 16 hores ja no batejava cap cor, es van seguir fent observacions durant 24 hores més per confirmar-ho. El 66,66% dels embrions va morir després de 16 hores al tractament de 50  $\mu\text{L/L}$  d'anís mentre que cap embrió va morir amb la concentració de 20  $\mu\text{L/L}$  i als controls (figura 9).



Es van poder veure diferències significatives entre les medianes dels tractaments i controls ( $p=0,01173$ ,  $\text{Chi}^2= 9,346$ ). Concretament, al tractament de 70  $\mu\text{L/L}$  es van observar significativament més embrions morts que al tractament de 50  $\mu\text{L/L}$  i al de 20  $\mu\text{L/L}$ . Aquest últim no era diferent del control.

Una CL 50 significativa ( $p<0,0001$ ) es va poder detectar amb una concentració de 48,474  $\mu\text{L/L}$  a l'experiment de l'anís.

El 6,66% i el 13,33% dels embrions van morir respectivament a les concentracions 50  $\mu\text{L/L}$  i de 70  $\mu\text{L/L}$  al final de l'experiment amb l'eucaliptus (figura 10). No es van poder detectar diferències significatives entre els tractaments amb l'eucaliptus i no es va poder calcular la CL 50 doncs la mortalitat dels individus va ser inferior al 50%.

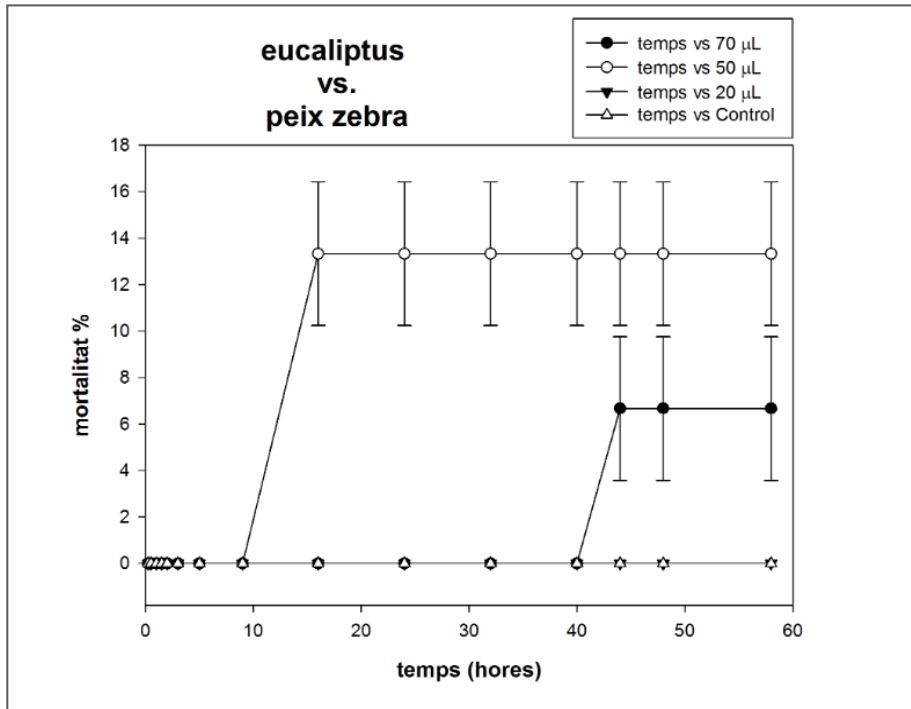


Figura 10. Els resultats de l'experiment amb les diferents concentracions d'eucaliptus i els embrions de peix zebra

Una mitjana del 6,66% dels embrions del peix zebra es va morir als controls a l'experiment amb l'alfàbrega (figura 11). A causa de la manca de mortalitat als tractaments no es va poder estimar la significativitat de les diferències entre tractaments ni la CL 50.

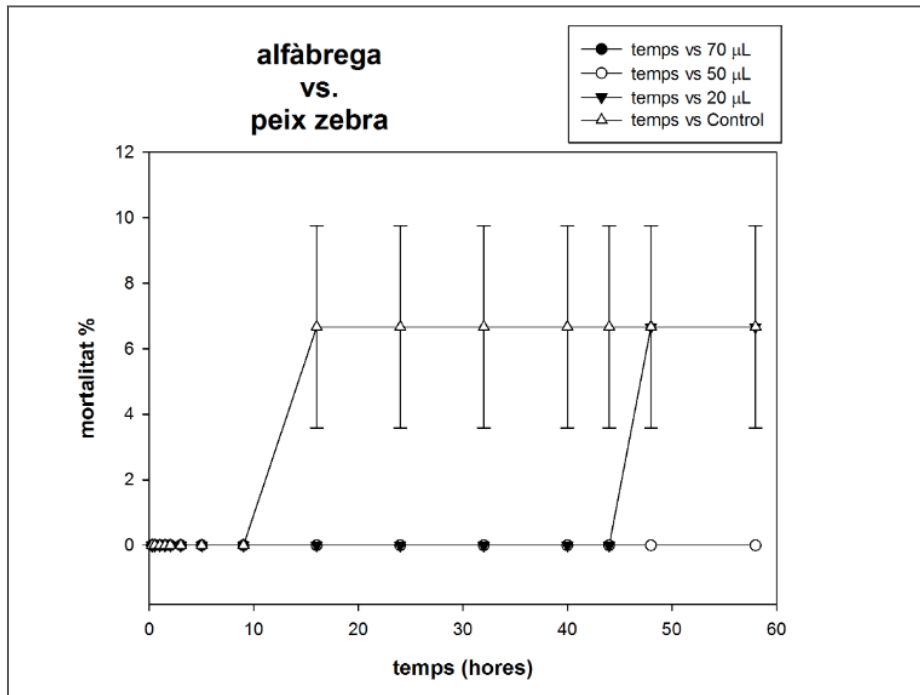
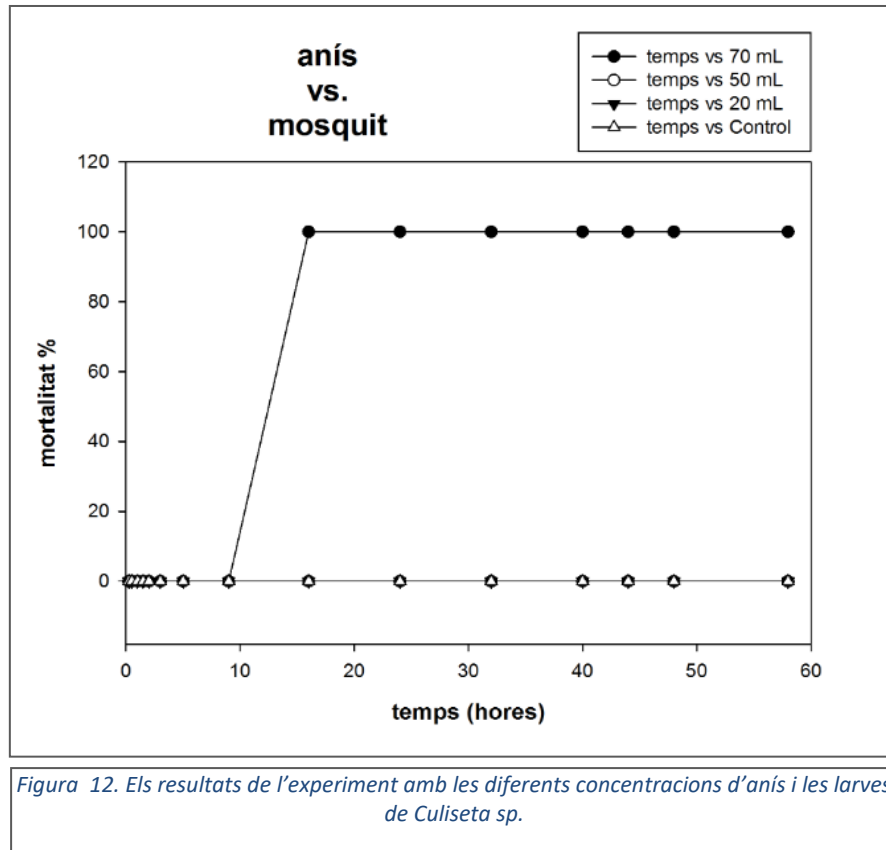


Figura 11. Els resultats de l'experiment amb les diferents concentracions d'alfàbrega i els embrions de peix zebra

Després d'una hora i mitja de l'inici de l'experiment amb larves de *Culiseta* sp. amb l'anís, el 100% de les larves va morir al tractament de 70 µL/L. Cap altra larva va morir a la resta de tractaments o als controls (figura 12).

#### Olis essencials vs. *Culiseta* sp.



Es va poder calcular una CL 50 significativa ( $p < 0,0001$ ) de 59,97 µL/L per aquest experiment. Cap larva va morir amb la resta de productes testats.

## Discussió

### **Pimpinella anisum Vs Danio rerio**

Pavela (2014 i 2015) va testar l'oli essencial d'anís verd en les larves de mosquit *Culex quinquefasciatus* trobant una CL 50 de 27 ppm. Aquesta petita concentració demostra que aquest oli podria ser un molt bon substitut natural com a larvicida per *C. Quinquefasciatus*.

Tot i que amb aquesta concentració en el nostre estudi no van haver-hi morts de larves de *Danio rerio*, si que s'ha trobat una CL 50 de 48,47 ppm per l'oli d'anís i per tant és una concentració molt petita capaç de matar a més de la meitat de la mostra.

### **Eucalyptus globulus Vs Danio rerio**

Amer i Mehlhorn (2006) van testar, amb larves de tercer estadi del mosquit *Aedes aegypti*, l'oli essencial de l'eucaliptus blau sense arribar a trobar la CL 50 a causa de la baixa mortalitat. Per altra banda, Rueda, Pérez i Meza (2010) van provar la toxicitat d'aquest oli contra les larves de quart estadi de *Aedes aegypti* trobant una CL 50 de 58.57 ppm.

Les diferències en els resultats es podrien donar per la diferència en el temps d'exposició de les larves però, com en el nostre estudi no s'ha pogut trobar la concentració letal per la baixa mortalitat en les larves del *Danio rerio*, es veu com l'oli essencial d'*Eucalyptus globulus* podria ser eficient com a larvicida de *Aedes aegypti*.

### **Ocimum basilicum Vs Danio rerio**

Tot i que amb aquest oli essencial no s'ha pogut trobar la concentració letal per la baixa o nul·la mortalitat de les mostres, Govindarajan, Sivakumar, Rajeswar i Yogalakshmi (2013) van testar l'oli de l'alfàbrega en larves de *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* i *Anopheles subpictus* trobant una CL 50 de 14, 12 i 10 ppm, respectivament. Al no haver presentat una mortalitat significativa en el vertebrat aquàtic estudiat, l'oli essencial d'alfàbrega podria ser una bona opció en la lluita contra les plagues d'aquests mosquits.

### **Pimpinella anisum Vs Culiseta sp.**

La prova feta per l'oli essencial d'anís en les larves d'estadi 3 de *Culiseta sp.* va donar com a resultat una CL 50 de 59.97 ppm diferenciant-se de la CL 50 de 27 ppm de Pavela (2014 i 2015) testat en l'espècie *Culex quinquefasciatus*.

Les diferències trobades entre Pavela (2014 i 2015) i aquest estudi podrien ser degudes als diferents gèneres als que pertanyen els mosquits fets servir en els tres estudis, fent al gènere *Culiseta sp.* més resistent en front agents tòxics. Un altre factor, estudiat per Pavela (2014), podria ser que l'acció larvicida de l'oli essencial *Pimpinella anisum* es pot veure afectada per la temperatura ambient mostrant en el seu estudi la mortalitat més baixa a 10°C i la més alta a 20°C disminuint a temperatures més altes.

## Reflexió ètica

El CSIC estipula que un peix es considera animal quan comença l'alimentació exògena, cosa que passa a partir del cinquè dia post-fecundació en el peix zebra. És per això que els estudis no han pogut durar 96 hores com indicaven molts altres estudis sinó que han arribat com a màxim fins a les 62 hores perquè, al afegir les 48-62 hores que triga l'embrió en sortir del còrion i convertir-se en larva, ja fan les 120 hores. Aquest fet s'ha respectat molt primer, perquè és el que la llei marca per no considerar aquest projecte experimentació animal i segon, per motius ètics propis. Al llarg de tot el procés s'han fet un ús sostenible dels recursos naturals. L'aigua pels experiments ha estat la mínima; dels residus obtinguts s'ha fet un rebuig adient segons cada característica; tot el material que s'ha fet servir o que ha sobrat, dins de la mesura del possible, serà reutilitzat; l'energia calorífica que s'ha necessitat s'ha amortitzat al màxim sense malbaratar i els peixos adults s'han donat a un privat.

## Conclusions

According to the studies carried out in this work, the following conclusions can be drawn:

- *Pimpinella anisum* essential oil has been tested in larvae of *Danio rerio* at 64 hours post-fertilization with a LC 50 of 48.47 ppm. It has proved to have a high degree of toxicity in aquatic vertebrates. This means that more specific studies are required to evaluate the toxicity of this oil in the organisms of aquatic systems if it is intended to be used as a larvicide in the future.
- The essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Ocimum basilicum* applied on the *Danio rerio* have not presented significant differences between treatments and controls. Therefore, they could be considered good candidates as natural larvicides to combat mosquitoes if these studies were longer and they could confirm the non-toxicity of this oil on *Danio rerio*.
- In the study about the toxicity of these three oils on the larvae of *Culiseta sp.*, the only final outcome was obtained for the *Pimpinella anisum* oil. It showed a LC 50 of 57.97 ppm. Hence, the toxicity of this oil is confirmed for the larvae of *Danio rerio* and for the larvae of *Culiseta sp.*
- The essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Ocimum basilicum* have not presented significant levels of toxicity in the larvae of *Culiseta sp.*, despite having demonstrated it in other studies for other genera of mosquitoes (Pavela, 2015).

Ultimately, it is necessary to study the toxicity of these oils as non-target organisms to ensure their innocuousness or harmfulness to aquatic organisms in order to find a natural alternative for the elimination of mosquito pests.

## Bibliografia

1. Aceites esenciales. (s.d.). Aceite esencial de Albahaca: Todas sus Increíbles Propiedades. Recuperat de <https://aceites-esenciales.org/aceite-esencial-de-albahaca/#Beneficios del aceite de esencial de albahaca>
2. Amer, Abdelkrim & Mehlhorn, Heinz. (2006). Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology research*. 99. 466-72. doi: [10.1007/s00436-006-0182-3](https://doi.org/10.1007/s00436-006-0182-3)
3. ATLL Concessionària de la Generalitat de Catalunya, SA. (s.d.). Gestió de l'aigua. Recuperat de <http://www.atll.cat/Ca/page.asp?id=34>
4. Baskar K, Sudha V, Nattudurai G, Ignacimuthu S, Duraipandiyan V, Jayakumar M et al. (2017). Larvicidal and repellent activity of the essential oil from *Atalantia monophylla* on three mosquito vectors of public health importance, with limited impact on non-target zebra fish. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 101, 197-201. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.03.002>
5. Chantraine J-M, Laurent D, Bollivan C, Saavedra G, Ibañez R & Vilaseca LA. 1998. Insecticidal activity of essential oils on *Aedes aegypti* larvae. *Phytoterapy Research* 12: 350-354. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199808\)12:5<350::AID-PTR311>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199808)12:5<350::AID-PTR311>3.0.CO;2-7)
6. Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC). (s.d.). Èssers modèlics. Entre la natura i el laboratori. Recuperat de <http://essersmodelics.csic.es/peix.html>
7. da Silva, Toshik Iarley, Leite Alves, Antonio Carlos, de Azevedo, Francisco Roberto, Araújo Marco, Cláudia, dos Santos, Hernandes Rufino, y Azevedo, Raúl. (2017). Actividad larvívica de aceites esenciales en *Aedes aegypti* L. (Díptera: Culicidae). *Idesia* (Arica), 35 (2), 63-70. Epub 13 de mayo de 2017. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292017005000026>
8. Dias, C., Moraers, D. (2013). Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitology Research*, 113 (2), 565-592. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3687-6>
9. Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. DOCE 135. (1991)
10. Disposición 1337 Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, BOE 34 (2013)
11. Doke SK, Dhawale SC. (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J*. 23, 223-229. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>
12. Escartin, S. i Mariani, S. (2014). Evaluating the toxicity of oil of lemon eucalyptus, *Corymbia citriodora* (Hook.), against larvae of the Asian tiger mosquito and non-target fish and larval amphibians. *Anales de Biología* 49, 97-105. doi: <http://dx.doi.org/10.6018/analesbio.36.17>
13. Generalitat de Catalunya. (s.d.). Agència catalana de l'aigua. Depuradora 500. Recuperat de <http://aca-web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?nfpb=true&pageLabel=P58200318271467813118810>



14. Generalitat de Catalunya. (s.d.). Llengua catalana. Recuperat de [http://aplicacions.llengua.gencat.cat/llc/AppJava/index.html?action=Principal&method=detall&input\\_cercar=ecologic&numPagina=1&database=TERMCAT&idFont=819496&idHit=819496&tipusFont=Diccionaris+terminol%F2gics+del+TERMCAT&numeroResultat=5&databases\\_avansada=&categories\\_avansada=&clickLink=detall&titol=ecol%F2gic+-a&tematica=Medi+ambient&tipusCerca=cerca.tot](http://aplicacions.llengua.gencat.cat/llc/AppJava/index.html?action=Principal&method=detall&input_cercar=ecologic&numPagina=1&database=TERMCAT&idFont=819496&idHit=819496&tipusFont=Diccionaris+terminol%F2gics+del+TERMCAT&numeroResultat=5&databases_avansada=&categories_avansada=&clickLink=detall&titol=ecol%F2gic+-a&tematica=Medi+ambient&tipusCerca=cerca.tot)
15. Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswary, M., Yogalakshmi, K., 2013a. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). *Exp. Parasitol.* 134, 7–11. doi: [10.1016 / j.exppara.2013.01.018](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.01.018)
16. The IUCN Red List of Threatened Species. (2017). *Danio rerio*. Recuperat de <http://www.iucnredlist.org/details/166487/0>
17. Instituto superior del medio ambiente. (s.d). El tratamiento de aguas residuales y su marco normativo. Recuperat de <http://www.ismedioambiente.com/agenda/el-tratamiento-de-aguas-residuales-y-su-marco-normativo>
18. Ivonne J. Nieto R, Ahmed M. Salama, Jorge E. Castaño P, Carolina Chegwin A. Determinación de la toxicidad de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología.* 25(3):186-187. doi: [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70044-5](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70044-5)
19. Howe K, Clark M, Torroja C, Torrance J, Berthelot C, Muffato M et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498-503. doi: [10.1038/nature12111](https://doi.org/10.1038/nature12111)
20. Lin CY, Chiang CY, Tsai HJ. (2016). Zebrafish and Medaka: New model organisms for modern biomedical research. *J Biomed Sci.*, 23(19). doi: [10.1186 / s12929-016-0236-5](https://doi.org/10.1186/s12929-016-0236-5)
21. Llanos, Carlos, Monteza, Carla, & Scotto, Carlos. (2012). Determinación de la concentración letal media (CL50) y eficacia del eugenol como anestésico sobre *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(4), 429-440. Recuperat de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172012000400005&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172012000400005&lng=es&tlng=es).
22. Lucia A, Licastro S, Zerba E & Masuh H. 2008. Yield, chemical composition, and bioactivity of essential oils from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 129: 107-114. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00757.x>
23. Monzon RB, Alviator JP, Luczon LLC, Morales AS & Mutuc FES. 1994. Larvicidal potential of five Philippine plants against *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 25(4): 755-759.
24. Pavela, R. (2014). Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17, 287-293. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2014.02.001>

25. Pavela, R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 174-187. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050>
26. Pavela, R., and Benelli, G. (2016). Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends in Plant Science*, 21 (12). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>
27. Rueda, X.; Pérez, O.; Meza, H. (2010). Actividad del aceite esencial foliar de Eucaliptus globulus contra Aedes aegypti Linnaeus. Facultad de Ciencias Básicas, Colombia. *Revista Bistua*. 8, 71-77.
28. Sang Ho, K., Chanchal S., Imran K. and Sun Chul K. (2017). Breeding of zebrafish in the laboratory environment for research development. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(4), 712-714. doi: [10.3329/bjp.v12i4.34143](https://doi.org/10.3329/bjp.v12i4.34143)
29. Schaefer, J. and Ryan, A. (2006) Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*. 69(3):722-734. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01145.x>
30. Truong, L., Gonnerman, G., Simonich, M., and Tanguay, R. (2016). Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. *Environmental Pollution*, 218, 1089-1093. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.061>
31. Yáñez Rueda, X., & Pérez, O., & Meza, H. (2010). Actividad larvicida del aceite esencial foliar de Eucaliptus globulus contra Aedes aegypti Linnaeus. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 8 (1). Recuperat de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90315226009>
32. Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene. Recuperat de [https://zfin.org/zf\\_info/zfbook/zfbk.html](https://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html)