

ORIGINAL

Evaluación "*in vitro*" del aceite esencial de *origanum vulgare* frente a *varroosis* en *apis mellifera*

Evaluation "*in vitro*" of essential oil *origanum vulgare* in front of *varroosis* in *apis mellifera*

Daniel David Segura Córdoba, Estudiante de 5º Año de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Cuba,

dsegurac@udg.co.cu

Yonniel Alejandro Osorio Ortíz, Estudiante de 5º Año de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Cuba,

yosorioo@udg.co.cu

Dra. C. Osmaida Estrada Cutiño, Profesora Titular, Vicedecana de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Cuba, ostradac@udg.co.cu

Resumen

Con el objetivo de evaluar "*in vitro*" el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) en el control de varroosis. Se recolectaron hojas frescas al azar de la planta en la comunidad de El Níspero perteneciente al municipio Jobabo de la provincia Las Tunas. Se realizó la extracción del aceite esencial mediante el método de hidrodestilación (con agua y vapor) en el (CEQA). Los parásitos fueron colectados en un apiario de la comunidad de Santa Isabel, Bayamo a partir de panales zanganeros de la especie *Apis mellífera*. Para la evaluación del efecto acaricida se emplearon concentraciones de 1, 5, 10 y 20% respectivamente. Se utilizó como control el agua destilada. Se colocaron en una placa de Petri con papel de filtro impregnado con el producto, menos en el control, 15 ácaros en cada una de ellas. Las lecturas se realizaron a las 4, 8 y 24 horas. Se realizaron tres réplicas. Se determinó el porcentaje de ácaros muertos, mediante la observación en el microscopio-estereoscopio. Se realizó el análisis de varianza para la comparación de proporciones. Mediante el uso del Programa COMPARPRO 1.0 (Font et al., 2007). Se evidenció diferencia significativa entre el porcentaje de ácaros muertos por concentración, mostrando los mayores valores de mortalidad al 10 y 20% con 87 y 93% respectivamente. Se concluye que el biopreparado tiene efecto antiparasitario contra el ácaro *Varroa destructor* de *Apis mellífera*.

Palabras claves: Aceite; Apis; esencial; mellifera; origanus; varroosis

Abstract

With the aim of evaluating "*in vitro*" the essential oil of oregano (*Origanum vulgare*) in the control of varroosis. Fresh leaves were collected at random from the plant in the community of El Níspero belonging to the Jobabo municipality of Las Tunas province. The essential oil was extracted by means of the hydrodistillation method (with water and steam) in the (CEQA). The parasites were collected in an apiary in the community of Santa Isabel, Bayamo from drone combs of the *Apis mellifera* species. For the evaluation of the acaricida effect, concentrations of 1, 5, 10 and 20% were used respectively. Distilled water was used as a control. 15 mites were placed in a Petri dish with filter paper impregnated with the product, less in the control, 15 mites in each one of them. The readings were made at 4, 8 and 24 hours. Three replicates were made. The percentage of dead mites was determined by observation in the microscope-stereoscope. The analysis of variance was carried out for the comparison of proportions. By using the COMPARPRO 1.0 Program Font et al., 2007. There was a significant difference between the percentage of dead mites by concentration, showing the highest mortality values at 10 and 20% with 87 and 93% respectively. It is concluded that the biopreparation has an antiparasitic effect against the *Varroa destructor* mite of *Apis mellifera*.

Key words: oil; apis; essential; mellifera; origanus; varroosis

Introducción

La apicultura es una de las actividades más nobles y antiguas de la humanidad. En la historia los pueblos antiguos se dedicaban a su explotación, cosechando la miel, que es considerada como uno de los alimentos más nutritivos que se conocen por su contenido de vitaminas, sales minerales y azúcares de fácil digestión. Existen dos especies de abejas capaces de producir miel en grandes cantidades, las que viven en grandes colonias como las del género *Apis mellifera* (Abejas melíferas), o las (Meliponas), *Trigona* y *Melipona* (Caron, 2010).

La apicultura constituye una actividad de gran importancia para el país, no solo por los aportes económicos a partir de las producciones de miel de abejas, cera y propóleos que son elevados, sino además por la acción polinizadora de estos insectos sobre plantas silvestres y las utilizadas por el hombre con fines alimentarios y ornamentales,

contribuyendo a la conservación y mantenimiento de muchos ecosistemas (Verde *et al.*, 2012).

Sin embargo, los diversos beneficios que nos proveen estos insectos están amenazados por factores como el cambio climático, uso excesivo de pesticidas en cultivos, desconocimiento del empleo de buenas prácticas para disminuir la presencia de enfermedades y plagas que las afectan. Una de las principales plagas determinadas por la OIE que afectan a la abeja melífera es la *Varroa destructor*, reportada en todo el mundo salvo en Australia (Carabajo, 2015).

A partir de los años 60, con el inicio de la revolución verde, la humanidad se ha visto sometida a un fuerte incremento de productos agrotóxicos que cotidianamente provocan altos niveles de contaminación del medio ambiente y dejan a los pueblos sumidos en una dependencia absoluta y desmedida de estos insumos, sin que ello contribuya siquiera a aliviar el hambre y la desnutrición de que hoy son víctimas, unido todo esto a la aplicación de modelos económicos insostenibles.

El control del ácaro en nuestro país se inicia en el año 2000, basado en el uso de productos químicos como la flumetrina (bayvarol 4%), que genera problemas de resistencia y residualidad en los productos de las colmenas, esto ha conducido a problemas de riesgo toxicológico para los apicultores, abejas y por lo tanto también para los consumidores, siendo aplicado solo en época de no cosecha de miel, generalmente su costo es de millones de dólares (Gómez, Verde, Álvarez, y Toraño, 2004).

A nivel mundial la tendencia de los consumidores es adquirir productos sanos, completamente naturales. Las exigencias de los clientes en el mercado son, no solo, en cuanto a tolerancias muy estrictas de residuos en las mieles, sino también, en cuanto al tipo de explotación apícola en que se produjeron. Por lo que existe una tendencia global a la obtención de productos orgánicos.

Debido a esto es importante la búsqueda de productos naturales para combatir estas enfermedades. Por lo que el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) constituye, un candidato para el desarrollo de un nuevo producto para el control de *Varroa destructor* de *Apis mellifera*.

El objetivo general del trabajo es evaluar “*in vitro*” la efectividad del aceite esencial de (*Origanum vulgare*) a las concentraciones (1%, 5%, 10% y 20%) durante el período (4, 8 y 24 horas) en el control de la *Varroa destructor* de *Apis Mellífera*.

Población y muestra

Ubicación experimental

Las investigaciones se realizaron en el período comprendido entre octubre del 2018 hasta marzo del 2019, en el Departamento de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, el Centro de Estudio de Química Aplicada, el Laboratorio de Agentes Biológicos de la Universidad de Granma, y el Laboratorio del Departamento de Sanidad Animal del MINAGRI en Granma.

Selección del material vegetal para la obtención del aceite esencial

La selección de la especie vegetal se realizó tomando como criterio la revisión bibliográfica y otros trabajos realizados por la empresa apícola. Y a su presencia en todo el país y la factibilidad de su uso como una alternativa en la regulación poblacional de *Varroa destructor* de *Apis mellifera*. Se recolectaron hojas frescas al azar de plantas de Orégano presentes en la comunidad de El Níspero perteneciente al municipio Jobabo de la provincia Las Tunas. El follaje recolectado se almacenó en el Laboratorio de Productos Naturales (LPN) del Centro de Estudios de Química Aplicada, en un lugar fresco, ventilado y de poca iluminación.

Extracción del aceite esencial

Extracción del aceite esencial de la especie en estudio se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales del (CEQA) por el método de hidrodestilación (con agua y vapor) a partir del material vegetal molinado. La destilación se realizó en un equipo tipo Clavenger, (Duschatzky, Carrascull, Bailacy y Ponzi, 1994), constituido por un hidrodestilador y un condensador simple. Se utilizó agua como líquido refrigerante haciendo uso de un recirculador modelo MLW fabricado en Alemania.

Se realizaron cuatro extracciones de tres horas de duración cada una a partir de 82, 120, 189 y 200 gramos de material vegetal respectivamente, pesados en una balanza. Técnica BS 2202S SARTORIUS fabricada en Alemania.

El aceite esencial obtenido en cada extracción fue secado con Na₂SO₄ anhidro de calidad analítica para eliminar el agua remanente del proceso de destilación y posteriormente fue pesado para calcular el rendimiento porcentual (masa/masa) de la extracción.

Formulación del biopreparado

Los biopreparados con aceite esencial, se prepararon en concentraciones al 1, 5, 10 y 20 % respectivamente, con agua destilada como excipiente de base; hasta obtener la mezcla con la homogeneidad deseada, empleándose como control el agua destilada. Las emulsiones a diferentes concentraciones se prepararon mediante una técnica de ultrasonido con un equipo de tipo ultrasonic cleaner SB-120DT posteriormente se envasaron en frascos de color ámbar (50mL), para evitar la aceleración de la cinética de degradación por fotólisis. Todas las muestras fueron etiquetadas e identificadas.

Ubicación experimental del desarrollo del estudio

Se realizó en el período de octubre del año 2018 hasta enero del 2019. Los ácaros fueron colectados, identificados y clasificados en un apiario ubicado en la comunidad de Santa Isabel, municipio Bayamo en la provincia de Granma, a partir de panales zanganeros de la especie *Apis mellífera* sometida a sistema de explotación intensivo en cajas Langstroth cuya infestación ocurrió de forma natural.

Diseño experimental

Se emplearon cuatro concentraciones del biopreparado (1%, 5%, 10% y 20%) más un control.

Formulación de las dosis

Concentración 1-----1%--Se añadió en un tubo de ensayo 0.01ml del aceite esencial y 0.99mL de agua destilada.

Concentración 2-----5%-- Se añadió 0.05mL del aceite esencial y 0.95mL del agua destilada.

Concentración 3-----10 % Se añadió 0.10mL del aceite esencial y se le añadió una cantidad 0.90mL de agua destilada.

Concentración 4-----20% --al cuarto se formuló con 0.20mL de los aceites y se le añadió una cantidad 0.80mL de agua destilada.

Control (5) ----- agua destilada.

Cada concentración constituyó un tratamiento y se realizaron tres réplicas en cada caso. En una placa de Petri con papel de filtro impregnado del biopreparado con el aceite esencial, según técnica de (Lindberg, Melaenophalus y Winston, 2000), menos en el control, colocándose 15 ácaros en cada una de ellas. Las lecturas se realizaron a las 4, 8 y 24 horas, para determinar el porcentaje de ácaros muertos, variable medida, mediante el uso del microscopio-estereoscopio.

Procedimiento estadístico para el estudio "in vitro"

En el análisis estadístico se comparó el número de ácaros muertos por tratamiento, según el tiempo de observación para cada concentración y entre tratamiento en cada momento de observación a través de análisis de comparación múltiple de proporciones. Se empleó un análisis de varianza ($p < 0.05$) para determinar los tratamientos empleados. Se utilizó la prueba de rangos múltiples para la comparación múltiple de las medias. Se utilizó el paquete "Statistica For Windows" versión 10, 2011, además la aplicación informática Excel para el cálculo estadístico y COMPARPRO 1.0, confeccionada por (Font *et al.*, 2007).

Análisis de los resultados

En el podemos apreciar la relación entre la masa vegetal y el porcentaje de aceite esencial obtenido a partir de estas destilaciones. (Tabla 1)

El análisis estadístico de los rendimientos, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0.05$), lo que sugiere que la extracción de aceite esencial a partir del follaje fresco de las especies en estudio, empleando el método de destilación con agua y vapor, puede considerarse estable; y además el rendimiento no depende de la cantidad de follaje empleado para la extracción. El rendimiento promedio de aceite esencial fue de 0.87 ± 0.92 %, valor por encima al reportado por (Pinto, 2002), para las especies en estudio y otras afines con ella, el cual oscila entre 0.1 y 0.5 %.

Tabla 1.

*Rendimiento porcentual de la extracción del aceite esencial a partir del follaje fresco de la especie, *Origanum vulgare*.*

No.	Masa de material vegetal (g)	Masa de AE (g)	Rendimiento (%)
1	200.19	1,74	0.87
2	189.22	1,68	0.89
3	120.01	1,10	0.92
4	082.54	0,74	0.90

Valores con letras iguales no presentan diferencia significativa ($p < 0.05$) según prueba de rangos múltiples.

Por otra parte, Salamanca y Sánchez (2009) refiere que el tiempo de extracción para esta especie, oscila entre dos y cuatro horas. En las extracciones preliminares realizadas para la presente investigación, se observó que, a partir de las dos primeras horas, se obtenía aproximadamente el 90 % del aceite esencial y a partir de las tres horas, su contenido en el destilado permanece prácticamente constante.

De igual manera, la diferencia observada en el rendimiento de aceite esencial respecto a los valores reportados, pudo estar asociada también a la hibridación de la especie en la zona de recolección.

El aceite esencial en todas las extracciones realizadas tuvo color amarillo muy tenue, claro y transparente, olor penetrante característico de alfa-pineno y la textura característica de los aceites volátiles de las plantas.

En nuestra investigación podemos corroborar lo planteado por Salamanca y Sánchez (2009) los cuales refieren que la apariencia de este aceite esencial clara y transparente, generalmente es un indicio de la buena calidad de los aceites esenciales, dado a que su oxidación natural genera una coloración amarilla negruzca con olor desagradable.

Al evaluar la efectividad de las diferentes concentraciones de los biopreparados sobre los ácaros (Tabla 2), se observó que las concentraciones 10% y 20% muestran resultados similares, los cuales difieren significativamente del resto de las concentraciones y el control sin tratamiento. Estas concentraciones logran porcentajes de muertos del 87 y 93% respectivamente.

Tabla 2.

Porcentaje de ácaros muertos con el empleo de diferentes concentraciones del biopreparado

Tratamientos	Porcentaje de ácaros muertos	EE	sig
1%	53% ^d	8,9	***
5%	67% ^c		
10%	87% ^b		
20%	93% ^a		
Control	0% ^e		

Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa ($p < 0.05$) según prueba de Duncan Ruiz, Flores, Ruz, Puerta y Campano (1998), al comparar algunas de las numerosas plantas medicinales que según la bibliografía, tienen efectos acaricidas, como la *Knautia arvensis* (escabiosa), *Tanacetum vulgare* (tanaceto), *Ruta graveolens* (ruda) y *Urtica dioica* (ortiga) tanto en tintura alcohólica como en aceite esencial; fue favorecido el aceite esencial, quien debido a su más lenta evaporación es más conveniente su aplicación, ya que prolonga su poder acaricida en el tiempo, el cual tuvo mayor eficacia que la planta de ruda, lo que coincide con los resultados de nuestra investigación donde se corroboró que el aceite esencial de orégano posee un alto valor acaricida.

Por otra parte, Melathopoulos *et al.* (1999), estudiaron la efectividad del *Azadirachta indica* A. Juss (Nim), aceite que tiene una aplicación similar a la vaselina, es un árbol tropical, del cual se obtiene el aceite de sus semillas y constituye un control efectivo en el control de la *Varroa*. Sus resultados demostraron que el Nim es un adecuado acaricida, no tan efectivo como los acaricidas químicos. Al comparar los resultados obtenidos de la efectividad del aceite esencial de Nim frente a la *Varroa* se observó una efectividad de un 50 a 90%, resultados inferiores a los obtenidos en nuestro trabajo que fue de 53 a 93%.

Nuestros resultados, guardan similitud con los obtenidos por Flores, Ruiz y Cunha (2001), en Italia con el empleo del timol, el cual corrobora 81,2% de efecto acaricida. Sin embargo, en nuestro trabajo la efectividad osciló entre 53 y 93%, al utilizar concentraciones de 1%, 5%, 10% y 20%, obteniendo el mejor resultado al 5%, donde se observó 0 mortalidad de abejas y 67% en la *Varroa*.

Así mismo Rodríguez (2001), obtuvo resultados similares a los nuestros al aplicar el aceite esencial de *Piperaduncum* (Platanillo de Cuba), demostrando que posee un efecto acaricida promisorio y selectivo frente a *Varroa destructor*, debido a que los componentes químicos mayoritarios de este aceite son el canfeno, alcanfor, piperitona y viridiflorol. Constituyendo un candidato promisorio para el desarrollo de un acaricida botánico, el cual podría ser utilizado en un futuro en el contexto de un manejo integrado de la varroosis.

Por otra parte, May, Medina y Marrufo (2007), reportaron que al aplicar en dos charolas un gel de timol al 25%, con quince días de diferencia (1 y 15) y en cuatro charolas conteniendo un gel de timol al 25%, se obtuvieron resultados favorables para ya que se logró una eficacia del 97-94% en la eliminación de los ácaros presentes en las abejas adultas y las crías. Se coincide con los resultados obtenidos en nuestra investigación en las tres réplicas realizadas, donde se observó mortalidad de 87 y 93%, de los ácaros para las dosis de 10 y 20% respectivamente.

Según otros investigadores *Eguaras* y *Ruffinengo*, (2008), en la zona de San Luis provincia de Argentina se corroboró que los cordones impregnados en vaselina con los aceites esenciales de plantas constituyen un vehiculizante bastante accesible, que provoca buena reacción y se puede combinar con el uso de tabletas de espuma de poliestireno (oasis).

En nuestro trabajo se obtuvo una efectividad de un 53% a 93%, en 24 horas después de aplicado el tratamiento "in vitro" en el laboratorio. Sin embargo *Ruffinengo et al.*, (2007) reportó, al evaluar en condiciones de laboratorio dos ensayos diferentes, el efecto acaricida de los aceites esenciales de *Tagetes minuta*, *Heterotheca latifolia* y *Eucaliptus* sp, contra *Varroa destructor* y su toxicidad sobre *Apis mellifera*, con una efectividad que varió entre 63% y 84% resultados inferiores en condiciones similares.

Así mismo *Aguirre*, *Demedio* y *Roque* (2007), refieren que el ácido oxálico resultó ser una opción factible de control del ácaro *Varroa* en las condiciones de Baja California (México),

reportando una eficacia que osciló entre 82,81% y 90,58% respectivamente, resultados similares a los obtenidos en esta investigación.

De igual manera Espinosa y Guzmán (2007), evaluaron la eficacia de dos acaricidas naturales (ácido fórmico y timol), para el control del ácaro *Varroa destructor* en colonias de (*Apis mellifera*), obteniendo mayor eficacia a 12.5 g de timol (92.1%), mientras que con el ácido fórmico mostró 66.4%. Ambos acaricidas obtuvieron una mortalidad significativa de parásitos ($P < 0.0001$), pero su efecto disminuyó después de la primera réplica, estos resultados difieren de los obtenidos en nuestra investigación.

Por su parte León (2004), relacionó que el uso de aceites naturales derivados de plantas, contra los ácaros está bien fundamentado, los mismos destruyen la cría de la *Varroa* y alcanzan una alta mortalidad en adultos. En pruebas preliminares varias colonias infestadas fueron expuestas durante seis semanas (después del flujo de miel) a una de tres diferentes mezclas que contenían: timol (74- 79%), aceite de eucalipto (16-17%) y mentol y/o camphor (3,7- 4%). Entre un 74% y un 92% de los parásitos murieron; en cambio la mortalidad en controles no tratados fue de un 10%.

En la Figura 1, se observa la comparación entre las diferentes réplicas por tratamiento variaciones de efectividad por diferentes concentraciones, donde se muestra que, a la concentración de 1, 5 y 10 % tuvieron el mejor resultado a las 24 h y la de 20% a las 8 y 24 h, siendo esta la que mayor efecto tubo sobre la muerte en ácaros.

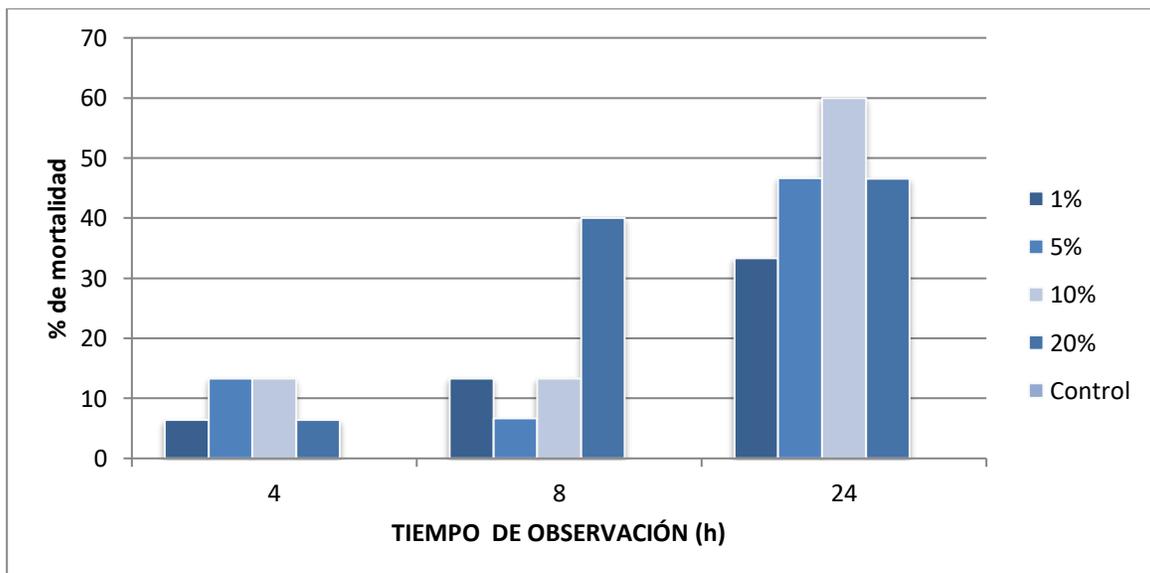


Figura 1. Efectividad de las diferentes concentraciones durante (4, 8 y 24 h)

Estudios realizados por otros investigadores Eguaras y Ruffinengo, (2008) reportaron valores similares a los obtenidos en nuestra investigación, al evaluar el efecto acaricida del timol administrado en dos formas; una aplicación única de 25g y otra de dos aplicaciones de 12,5g cada una, separadas por 12 días, obteniendo una mortalidad entre 91% y 94% respectivamente sin afectar las abejas adultas y las crías.

Conclusiones

1. Se observó mayor efectividad del aceite esencial de (*Origanum vulgare*) a la concentración de 20% durante el período de 24 horas, en el control de la *Varroa destructor* de *Apis Mellífera* "in vitro".

Referencias bibliográficas

- Aguirre, J. L., Demedio, J. y Roque E. (2007). Eficacia varroicida del Ácido Oxálico en jarabe de sacarosa por goteo. Rev. Salud Anim. 29(29): 118-122.
- Carabajo, K. (2015). Prevalencia del ácaro *Varroa* (*Varroa* sp.) en colmenares de las regiones norte y centro norte del Ecuador. (Tesis de pregrado grado. Ingeniero Agropecuario). Universidad Central del Ecuador. Quito.
- Caron, D.M. (2010). Manual Práctico de apicultura. Estados Unidos: Sustainable Harvest.
- Duschatzky, C., Carrascull, A., Bailacy, P. y Ponzi, M. (1994). Extracción de aceites esenciales de especies autóctonas. En: Anales de SAIPA, vol. XV
- Eguaras, M.J. y Ruffinengo, S.R. (2008). Estrategias para el control de *Varroa*. 2^{da} ed. Mar del Plata: Argentina. 89-97.
- Flores J. M; Ruiz J. A y Cunha S. R. (2001). Situación actual y perspectivas de los tratamientos en el control de *Varroa jacobsoni* Oud. en Andalucía- *Vida Apícola*; 2(3): 104.
- Espinosa, M.L. y Guzmán, N.E. (2007). Eficacia de dos acaricidas naturales, ácido fórmico y timol, para el control del ácaro *Varroa destructor* de las abejas (*Apis mellifera* L.) en Villa Guerrero, Estado de México, México. Vet. Méx., 38 (1) 105-110.
- Font, H. P., Noda, A., Torres, M., Herrera, D., Lizazo, L., Sarduy, L y Rodríguez, A. (2007). COMPARPRO 1.0. Instituto de Ciencia Animal. Departamento Biomatemática.

- Gómez, J., Verde, M., Álvarez, E. y Toraño, M. (2004). Organización de sistema de control sanitario para la especie apícola en Cuba. Estrategia y acciones. En I Congreso Latinoamericano de Apicultura. Ciudad de la Habana.
- León, Y. (2004). Escencia de eucalipto para controlar *Varroa destructor* en colonias de *apis mellifera* L. Gaceta de Ciencias Veterinarias Vol. 9 (1): 32-36
- Lindberg, G.D., Melaenophalus, H. y Winston, M. (2000). Laboratory Evaluation of Miticides to Control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Parasite. J Econ Entomol. 2000;93(2):189–98.
- May, I.W., Medina, M.L. y Marrufo, O. J. (2007). Eficacia de un gel a base de timol en el control del ácaro *Varroa destructor* que infesta colonias de abejas *Apis mellifera* bajo condiciones tropicales en Yucatán, México. Rev. Vet. Méx; 38(1):1-8.
- Melathopoulos, A., Winston, M., Whittington, R., Higo, H. y Le Doux, M. (1999). Field Evaluation of Neem and Canola Oil for the Selective Control of the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Mite Parasites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi*(Acari: Tarsonemidae). Rev Journal of Economic Entomology: Vol. 93, No. 3. 559–567.
- Pinto, A.Y. (2002). *Estudio comparativo del rendimiento de aceite esencial de orégano (Origanum vulgare) en dos diferentes pisos ecológicos - UNSA.* (Tesis de grado) Arequipa, Perú.
- Rodríguez, P.P. (2001). Varroosis: Aceite Mineral como Tratamiento Alternativo para los Ácaros de la Abeja Melífera (II Parte), Espacio Apícola, Año XI (47): 10-21. Ok
- Ruffinengo, S., Maggi, M., Faverin, C., García, R. Bailac, S., Principal, J. y Eguaras, M. (2007). Essential oils toxicity related to *Varroa destructor* and *Apis mellifera* under laboratory conditions. Rev. Zootecnia Trop. 25(1): 63-69
- Ruiz, A., Flores, M., Ruz, M., Puerta, F. y Campano, F. (1998). Eficacia de plantas medicinales contra *Varroa jacobsoni* Oud. en laboratorio. Ed. Apimondia. 11(3):22- 139. Disponible en: www.apinews.com/en/technical-articles/beehealth/item/.../746/1998 >> [Consultado: 2 de mayo del 2019]
- Salamanca, M. y Sánchez, M. (2009). *Extracción y caracterización de la oleorresina del orégano (Origanum vulgare)* (tesis para optar el título de tecnólogo químico). Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

Verde, M., Gómez, T. y Demedio, J. (2012). Salud Apícola. Tomo I Generalidades. Consejo Científico Veterinario de Cuba. ISBN: 978-959-7190 15-8. pp 23-27. La Habana. Cuba.