



**Evaluación ecotoxicológica de los residuos de *Lippia alba* Mill. sobre *Eisenia andrei*
(lombriz de tierra)**

Ecotoxicological evaluation of the residues of *Lippia alba* Mill. on *Eisenia andrei*
(earthworm)

Ana Cristina Noa Rodríguez¹ <https://orcid.org/0000-0003-2857-1385>

Yordanka Domínguez Linares¹ <https://orcid.org/0000-0001-6199-8757>

Yamilet Irene Gutiérrez Gaitén² <https://orcid.org/0000-0002-8885-4849>

Odette Beiro Castro¹ <https://orcid.org/0000-0002-2403-5799>

Maydelín Díaz González² <https://orcid.org/0000-0002-2181-4930>

Ramón Scull Lizama² <https://orcid.org/0000-0001-6401-221X>

Jorge Carlos Castillo Miranda³ <https://orcid.org/0000-0002-2686-4304>

Alejandro Felipe González^{2*} <https://orcid.org/0000-0003-2287-254X>

¹Centro Nacional de Toxicología. Subdirección de Evaluaciones Toxicológicas y del Medio Ambiente. La Habana, Cuba.

²Universidad de La Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. Departamento de Farmacia. La Habana, Cuba.

³Hospital Militar Central “Dr. Carlos J. Finlay”. La Habana, Cuba.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: afelipe860126@gmail.com

RESUMEN

Introducción: *Lippia alba* es una planta distribuida por todo el mundo. Sus aceites esenciales y extractos se usan en diversas formulaciones farmacéuticas y cosméticas, entre ellas, fricciones antiinflamatorias.

<http://scielo.sld.cu>

<https://revmedmilitar.sld.cu>



En la actualidad no se dispone de información científica sobre el impacto de los residuos vegetales generados en la producción de estas formulaciones en el ecosistema suelo, lo cual dificulta la producción a gran escala de dicho producto. En este ecosistema, la lombriz de tierra (*Eisenia andrei*) es un biomodelo representativo.

Objetivos: Evaluar la toxicidad del residuo vegetal generado en la producción de formulaciones herbarias de *Lippia alba* sobre *Eisenia andrei*.

Métodos: Se realizó una caracterización fitoquímica preliminar mediante tamizaje fitoquímico, el perfil por cromatografía líquida de alta resolución, la cuantificación de fenoles por Folin-Ciocalteu y flavonoides por el método del cloruro de aluminio. Se desarrolló la evaluación en lombrices mediante los ensayos por contacto y de degradación en los sustratos tierra, humus de lombriz y artificial.

Resultados: El tamizaje fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas. Se identificó la rutina como compuesto mayoritario en el perfil cromatográfico. En el ensayo por contacto directo del extracto acuoso no se observaron signos de toxicidad, por lo que se continuó con el ensayo de degradación de residuos, en el cual se evidenció una degradación total en el sustrato humus a los 56 días, no fue así para el resto de los sustratos.

Conclusiones: El residuo vegetal del extracto hidroalcohólico de *Lippia alba* no muestra toxicidad sobre *E. andrei*.

Palabras claves: plantas medicinales; lombriz de tierra; toxicología; rutina.

ABSTRACT

Introduction: *Lippia alba* is a plant widely distributed around the world. Its extracts and essential oils are used in various pharmaceutical and cosmetics formulations, including anti-inflammatory frictions. There is currently no scientific information available on the impact the impact of plant residues generated in the production of these formulations on the soil ecosystem, which makes large-scale production of this product difficult. In this ecosystem, the earthworm (*Eisenia andrei*) is a representative biomodel.

Objective: To evaluate the toxicity of the vegetal waste generated during the production of herbal formulations of *Lippia alba* on *Eisenia andrei*.



Methods: A preliminary phytochemical characterization was made through phytochemical screening, profiling by high performance liquid chromatography, quantification of phenols by Folin-Ciocalteu and flavonoids by aluminum chloride methods. The evaluation in earthworm was carried out by contact and degradation tests on soil, worm humus and artificial substrates.

Results: Phytochemical screening revealed the presence of alkaloids, flavonoids, phenolic compounds and saponins. Rutin was identified as the major compound in the chromatographic profile. In the direct contact test of the aqueous extract, no signs of toxicity were observed, so we continued with the residue degradation test, in which total degradation was evidenced in the humus substrate at 56 days; this was not the case for the rest of the substrates.

Conclusions: The plant residue of the hydroalcoholic extract of *Lippia alba* do not show toxicity on *E. andrei*.

Keywords: medicinal plants; earthworm; toxicology; rutin.

Recibido: 22/03/2023

Aprobado: 11/07/2023

INTRODUCCIÓN

Lippia alba es una especie perteneciente a la familia *Verbenaceae*, conocida como pronto alivio, quitadolor y salvia morada, que se distribuye a través del sur de EE. UU., México y el resto de América.⁽¹⁾

En la medicina tradicional se emplea como antiespasmódica, anticonvulsivante, antiulcerosa, digestiva, diurética, expectorante, laxante, sedante, somnífera y antimicrobiana.⁽²⁾

Sobre la especie se reportan diversas formulaciones farmacéuticas y cosméticas, por lo general, usando el aceite esencial como principio activo;⁽³⁾ aunque también se han desarrollado tabletas analgésicas a partir del extracto hidroalcohólico.⁽⁴⁾ En Cuba se emplea el extracto de las hojas, para elaborar fricciones analgésicas y antiinflamatorias; se reconocen como alternativa terapéutica en el Formulario nacional de fitofármacos y apifármacos.⁽⁵⁾

<http://scielo.sld.cu>

<https://revmedmilitar.sld.cu>



La producción de fitomedicamentos genera residuos orgánicos que tienen un marcado impacto medioambiental, ya que pueden contaminar los ecosistemas, por efecto de acumulación.⁽⁶⁾ Estos residuos son ricos en nutrientes y metabolitos, lo que favorece su reutilización en la recuperación de suelos, producción de biofertilizantes, biodiesel, entre otras aplicaciones,⁽⁷⁾ por tanto, su adecuado tratamiento es importante para la sostenibilidad del medio ambiente, el desarrollo económico y social.⁽⁸⁾

Actualmente se desconoce el impacto de los residuos vegetales de las formulaciones de *L. alba* para el medio ambiente, por lo que se hace necesario el desarrollo de evaluaciones ecotoxicológicas y propuestas de manejo de estos residuos.

Eisenia andrei es una especie modelo, que se emplea para las evaluaciones ecotoxicológicas en el sistema suelo. Algunas de las investigaciones más comunes en esta especie se relacionan con los estudios del impacto ambiental de un grupo de compuestos que pueden alcanzar el suelo. Los ensayos más empleados con estos fines son: contacto en papel de filtro, evasión y actividad en diferentes sustratos.⁽⁹⁾

La presente investigación está dirigida a evaluar la toxicidad del residuo vegetal que se genera en el proceso productivo de las fricciones antiinflamatorias de las hojas de *Lippia alba* sobre *Eisenia andrei*.

MÉTODOS

Caracterización fitoquímica preliminar

El residuo vegetal se obtuvo del filtrado del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lippia alba* Mill. Posteriormente se secó en estufa a 40 °C durante 48 horas para remover el disolvente.

El extracto acuoso se obtuvo a partir de 20 g de residuo en 100 mL de agua destilada, por el método de maceración durante 24 horas. Las fracciones se obtuvieron mediante extracciones sucesivas del residuo, empleando éter dietílico, etanol y agua como disolventes, en una proporción droga/disolvente de 1:5. La extracción se realizó por el método de maceración durante 48 horas en cada caso.

El tamizaje fitoquímico se realizó sobre las fracciones obtenidas del residuo vegetal. Para la identificación de los metabolitos se emplearon los ensayos de Dragendorff (alcaloides), Wagner (alcaloides), Baljet (lactonas y coumarinas), Liebermann-Burchard (triterpenos y esteroides), Fehling (sustancias reductoras), espuma (saponinas), tricloruro férrico (polifenoles), ninhidrina (aminoácidos),



Börntrager (antraquinonas) y Shinoda (flavonoides). La presencia o ausencia de metabolitos se comprobó mediante los cambios de coloración.⁽¹⁰⁾

Se realizó el perfil por cromatografía líquida de alta resolución, acoplada a espectroscopía ultravioleta (CLAR/UV) del extracto acuoso, a una concentración de 5 mg/mL, empleando una columna RP-18 como fase estacionaria. Como fase móvil se empleó agua ultrapura, con ácido fórmico al 0,1 % (A) y una mezcla de metanol/acetonitrilo far UV en proporción 7:3, con ácido fórmico al 0,1 % (B). La medición se realizó a una longitud de onda de 254 nm. Se inyectaron 20 µl de la muestra en el equipo, con un flujo de 1 mL/min. Para la identificación de los metabolitos se utilizaron patrones de flavonoides y ácidos fenólicos.

La cuantificación de fenoles totales y flavonoides se realizó por los métodos colorimétricos de Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio, respectivamente. Para determinar la concentración se empleó el método de curva patrón, usando ácido gálico (fenoles) y quercetina (flavonoides), como sustancias de referencia.⁽¹¹⁾ Para la elaboración de la curva patrón se midió la absorbancia a diferentes concentraciones del estándar utilizado.

Evaluación ecotoxicológica de los residuos

Se desarrollaron los ensayos por contacto y degradación en diferentes sustratos, siguiendo la metodología descrita por la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo⁽¹²⁾ y la Agencia de Protección Ambiental.⁽¹³⁾ En todos los ensayos se cumplieron las regulaciones de las buenas prácticas de laboratorio y se trabajó bajo condiciones controladas de temperatura y humedad.⁽¹⁴⁾

Se seleccionaron organismos adultos menores de 2 meses, con clitelo (estructura tegumentaria glandular característica de los anélidos clitelados) sanos, sin manifestar alteraciones fisiológicas y conductuales y con un peso comprendido entre 300-600 mg. Los organismos fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (19 ± 2 °C). Todas las lombrices fueron alimentadas con estiércol bovino hasta 24 horas antes de comenzar el experimento. El ensayo por contacto^(12,13) se llevó a cabo en la oscuridad, mientras que, para el ensayo en sustratos^(12,13) se realizó un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, según lo establecido por las guías para cada uno de los ensayos.

En un primer estudio por contacto^(12,13) se evaluaron las fracciones éter dietílico, etanol y agua, obtenidas por extracciones sucesivas del residuo del extracto hidroalcohólico de *L. alba*, mientras que en un



segundo estudio se evaluó el extracto acuoso en diluciones al 25 %, 50 %, 75 % y 100 %, partiendo del extracto total obtenido del residuo. En cada caso, se introdujo un grupo control con los disolventes empleados (control vehículo).

Antes de iniciar el estudio se les determinó el pH a todas las muestras de análisis. En el caso de los grupos de éter dietílico y etanólico, el papel de filtro se pasó por una corriente de aire para el secado y posteriormente se incorporó 1 mL de agua destilada.

Se tomaron 12 organismos por grupo, los cuales fueron depositados de forma individual en tubos de cristal con 9 cm de largo y 3 cm de diámetro, que contenían un papel de filtro (Whatman no. 1 de 8,7 x 7 cm) embebido en la solución de ensayo.

Para el estudio de degradación se empleó un método estático con duración de 56 días. Se determinó el pH a los diferentes sustratos al inicio y al final de cada ensayo.⁽¹²⁾ Se emplearon 90 lombrices, distribuidas en 3 grupos experimentales, con 3 réplicas cada uno (10 organismos por réplica), las cuales fueron ubicados en recipientes de vidrio esterilizados, con una capacidad mayor a 400 g.

- Grupo 1 (suelo natural): suelo ferralítico rojo proveniente de la zona de cultivo de *Lippia alba*, del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana.
- Grupo 2 (humus de lombriz): humus fresco proveniente del área de cría y mantenimiento del Cenatox, sin restos vegetales y con pH entre 4 y 8.
- Grupo 3 (sustrato artificial): se preparó la mezcla de 40 g de turba (10 % del total), 80 gramos de caolinita (20 % del total) y 280 g de arena de cuarzo (70 % del total) para cada frasco.

Los organismos se expusieron por contacto e ingestión del sustrato, al cual se le habían adicionado 40 g del residuo vegetal de la planta, en la superficie del sustrato. Se adicionó agua destilada para garantizar un 55 % de humedad, la cual se mantuvo durante todo el estudio.⁽¹³⁾

En los días 7, 14, 28, 41 y 56 se observaron los organismos, para detectar cualquier efecto tóxico: ocurrencia de mortalidad, alteraciones en la conducta (respuesta disminuida o exacerbada ante un estímulo mecánico) y alteraciones en su anatomía como aspecto filiforme, abultamientos y constricciones, daños en la región clitelar, signos de deshidratación, fragmentación, entre otros, así como



la variación del peso corporal al final del estudio, para el ensayo de degradación.^(12,13,15) Además, se midió el pH de los diferentes sustratos al inicio, el día 28 y al final del ensayo.

Análisis estadístico

Para el procesamiento de los resultados se empleó el paquete de análisis estadístico SPSS versión 22. La cuantificación de fenoles y flavonoides se hizo por triplicado, para el cálculo de la media y la desviación estándar de las concentraciones determinadas. A partir de la curva patrón se obtuvo la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación.

Se aplicaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene para comprobar el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, para las variables peso de la lombriz y porcentaje de degradación. Para la comparación entre los grupos expuestos y el control del estudio ecotoxicológico, se empleó el método paramétrico Dunnett y Duncan. Las diferencias significativas se establecieron a una $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Caracterización fitoquímica preliminar

En el tamizaje fitoquímico del residuo vegetal, resultaron positivos los ensayos para compuestos grasos, alcaloides, azúcares reductores, flavonoides, fenoles, antocianinas y saponinas.

En el cromatograma obtenido en el perfil CLAR/UV del extracto acuoso del residuo, se apreció una baja complejidad química con 4 picos cromatográficos de poca intensidad y un pico mayoritario que coincidió con el tiempo de retención del patrón rutina (glucósido flavonoide encontrado en algunas plantas), lo cual sugiere la presencia de este compuesto en el extracto acuoso del residuo; resultado que se reporta por primera vez en la presente investigación (Fig. 1).

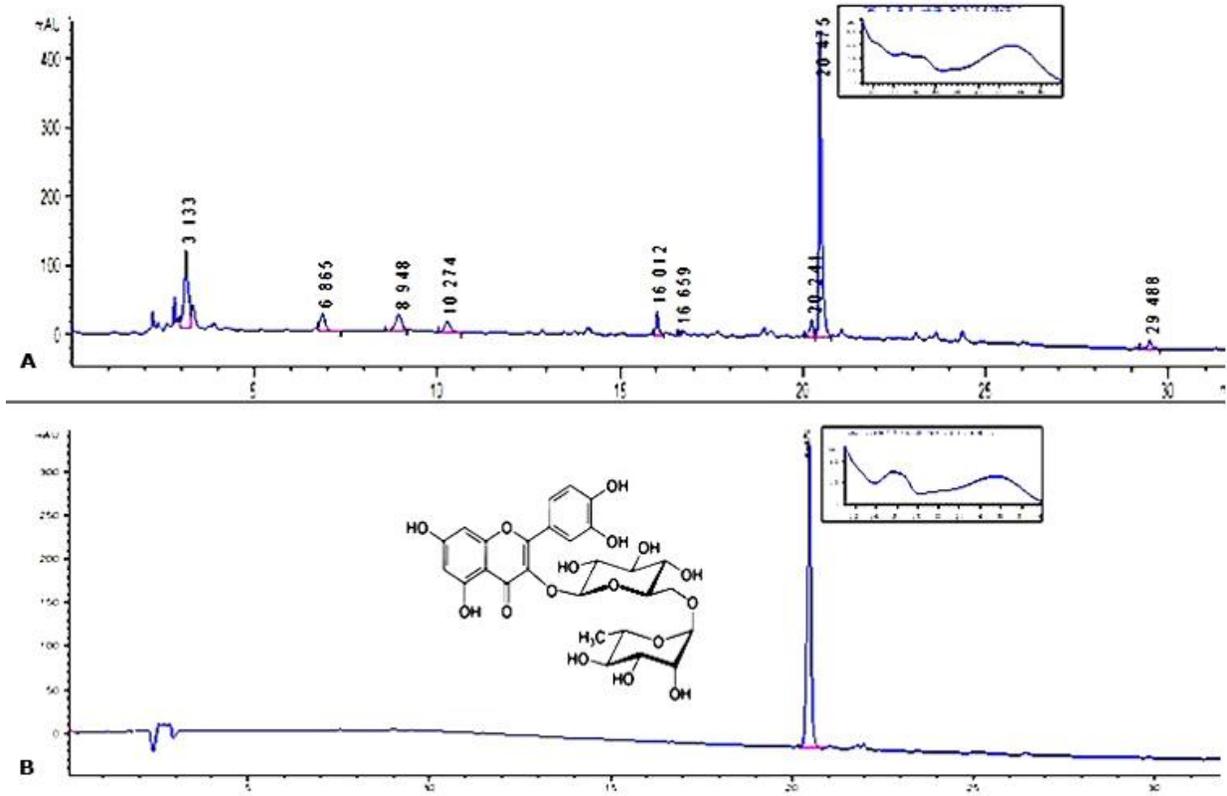


Fig. 1 - Perfil CLAR/UV del extracto acuoso del residuo vegetal del extracto acuoso de *Lippia alba* (A) y de la rutina (B) obtenido del programa ChromNAV 2.0 HPLC.

En la tabla 1 se muestran los valores de concentraciones de fenoles totales y flavonoides, determinados a partir de la curva patrón del ácido gálico con una ecuación de la recta $Y = 0,0117X + 0,0461$ y un coeficiente de correlación de 0,9961 y de la curva patrón de quercetina, con una ecuación de la recta $Y = 0,0024X + 0,0582$ y un coeficiente de correlación de 0,9947.

Tabla 1 - Contenido de fenoles totales y flavonoides totales en los extractos acuosos de *L. alba*.

Muestra	Contenido total (mg/mL)	
	Fenoles	Flavonoides
Extracto acuoso	1,55/0,02	0,60/0,01

Los valores se expresaron como media/desviación estándar (n= 3).



Ensayo por contacto

Se determinó el pH de las soluciones de ensayo; se encontraron en un rango entre 7 y 8,5; lo cual es compatible con la vida de las lombrices.

En las fracciones éter dietílico y etanol se observó el enrollamiento de 3 organismos que se recuperaron en el rango de 48 horas, sin que se observara otra alteración, por lo que se decidió desmontar el estudio. Sin embargo, en el grupo expuesto al extracto acuoso, desde la incorporación de los organismos a los recipientes de ensayo, se apreciaron cambios en la conducta, como enrollamiento, movimientos bruscos y pérdida del fluido celómico. A las 24 horas en este mismo grupo, continuaron las alteraciones antes mencionadas y aparecieron otras (Fig. 2) que provocaron la muerte del 50 % de las lombrices. A las 48 horas ocurrió la muerte del 100 % de las lombrices.



Fig. 2 - Alteraciones fisiológicas de la lombriz de tierra en el ensayo por contacto. A) clitelo edematoso, B) consistencia blanduzca, aspecto filiforme y pérdida de la integridad del clitelo, C) enrollamiento.

A partir de la toxicidad observada en la fracción acuosa del residuo, se repitió el ensayo, pero, en esta ocasión, se realizó al extracto acuoso, obtenido del residuo con varias diluciones desde 25-100 % a partir del extracto total. En las condiciones evaluadas, las lombrices no mostraron signos de toxicidad en los grupos expuestos a las diferentes concentraciones, por lo que el efecto observado en el experimento anterior pudiera deberse a la influencia del disolvente residual durante el proceso de extracción sucesiva.

Ensayo de degradación en sustratos

Se realizó sobre 3 sustratos diferentes por un período de 56 días, tiempo que coincidió con la degradación completa de los residuos en uno de los soportes de ensayo (humus). Al inicio, se determinó el valor de



pH de los sustratos empleados, el cual se encontró en un rango de 7,5 a 8,2, lo que no afecta la supervivencia de las lombrices.

En todos los grupos, las lombrices tuvieron movimiento libre dentro de cada soporte, lo que pudo visualizarse a través de las galerías formadas; esto denota una conducta de aceptación a los sustratos de ensayo.

En la figura 3 se representa el comportamiento del peso de las lombrices en los diferentes sustratos evaluados. A los 14 días del experimento se observó una disminución de peso en el grupo tierra y humus de lombriz; contrario al comportamiento observado en las lombrices del grupo sustrato artificial. Por otra parte, en el rango de 28-56 días se evidencia una disminución de peso en los grupos tierra y sustrato artificial; sin embargo, es evidente que en el grupo humus existe un incremento en el tiempo, excepto para el día 56. Estos resultados se corresponden con los porcentajes de degradación del sustrato que se presentan en la figura 4.

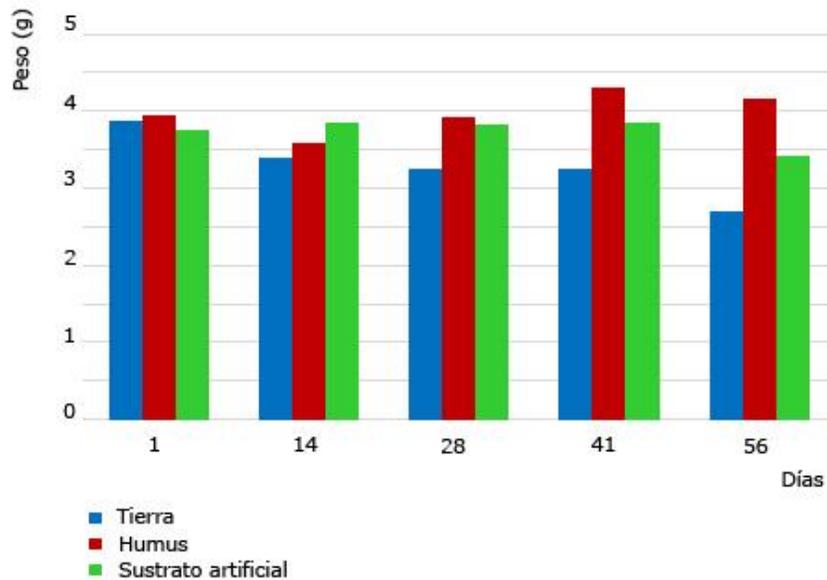


Fig. 3 - Comportamiento del peso de las lombrices en el tiempo en sustratos tierra, humus de lombriz y sustrato artificial.

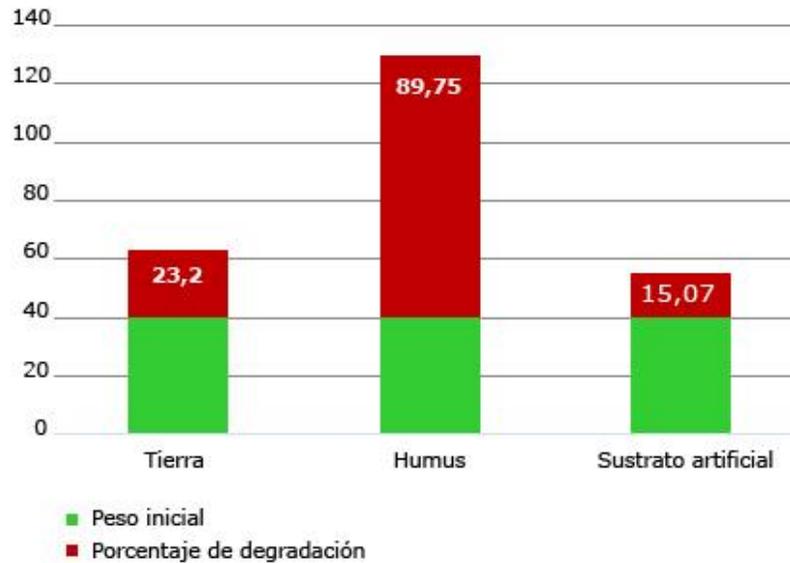


Fig. 4 - Degradación del residuo vegetal en los diferentes sustratos.

DISCUSIÓN

En el tamizaje fitoquímico se observó la presencia de flavonoides en la fracción acuosa, lo cual puede estar relacionado con la existencia de flavonoides glucosilados en el extracto, metabolitos que se han reportado antes para esta especie.^(16,17) Por otra parte, en la fracción etanólica no se evidenció la presencia de este tipo de compuestos, lo cual se debe a que el residuo se obtuvo a partir de una solución hidroalcohólica, disolvente que favorece la extracción de los flavonoides.⁽¹⁸⁾ Además, se identificaron alcaloides en la fracción acuosa, lo cual sugiere predominio de este metabolito en forma de sales solubles,⁽¹⁹⁾ sin embargo, la literatura carece de información científica convincente sobre la presencia de este tipo de metabolitos en la especie. En general, los resultados del tamizaje coinciden con los encontrados en la infusión y decocción de las hojas.⁽²⁰⁾

En el perfil cromatográfico se detectó la presencia de rutina como componente mayoritario del extracto acuoso del residuo de la planta. Este resultado coincide con un reporte previo en la literatura para un extracto de las hojas.⁽²¹⁾ La rutina es un compuesto al que se le reconocen diversas propiedades



farmacológicas, como sedante, anticonvulsivante, antidepresiva, analgésica, antiinflamatoria, antidiabética, entre otras.⁽²²⁾

En el ensayo por contacto^(12,13) se observó la muerte de todas las lombrices de tierra al exponerlas a la fracción acuosa del residuo, comportamiento no observado en el extracto acuoso obtenido directamente del residuo. Estas diferencias pudieran deberse a la existencia de un remanente de etanol o éter en la fracción acuosa y no a los efectos de los metabolitos sobre estas.

La baja toxicidad de los fenoles y flavonoides sobre la lombriz de tierra ya ha sido demostrada en estudios anteriores.^(23,24) Incluso, se conoce que las lombrices son capaces de movilizar y reciclar los compuestos fenólicos;⁽²⁵⁾ evidencias que justifican los resultados.

El desplazamiento de las lombrices por el sustrato permite pasar una parte a través de su tracto digestivo, que favorece la exposición a los componentes que están dentro de este, así como la asimilación y degradación de nutrientes que incorporan a su dieta, lo cual tiene una marcada influencia en el peso de las lombrices.⁽²⁶⁾

A pesar de que las lombrices tuvieron un desplazamiento libre por el sustrato, solo incrementaron de peso, al final del estudio, aquellas que estaban en el sustrato humus. También se observó un incremento de peso en las lombrices del sustrato artificial a los 14 días de ensayo. Este incremento se debe a que dicho sustrato contiene un 10 % de materia orgánica (turba), la cual es aprovechada por las lombrices, además de los residuos incorporados a este grupo, lo que ubica a este sustrato en una ventaja inicial con respecto a los otros soportes evaluados.

En el grupo tierra se comportó de manera diferente, pues descendieron de los valores iniciales. La tierra utilizada proviene de un área empleada para el cultivo de plantas medicinales con fines investigativos en el Instituto de Farmacia y Alimentos. Es conocido que, el contenido de materia orgánica de los suelos en Cuba es bajo; oscila entre un 2-3 %.⁽²⁷⁾ Por otra parte, el tiempo que duró el experimento no fue suficiente para la preparación de los residuos incorporados, por lo que no pudieron ser aprovechados por las lombrices.

Para el grupo humus se observa un incremento de peso a partir del día 28, lo cual pudiera estar relacionado a la microfauna intrínseca existente en este sustrato, la cual participa de forma activa en la etapa de biodegradación, para que el residuo pueda ser aprovechado por las lombrices.⁽²⁶⁾ Esta etapa tiene



una duración aproximada de 15 días, razón por la que no se observa un incremento de peso en las lombrices en este período inicial.

Las lombrices son capaces de movilizar y reciclar la materia orgánica presente en el suelo, incluidas proteínas complejas y compuestos fenólicos; además, estimulan y aumentan la actividad biológica del suelo mediante la ingestión y fragmentación de la materia orgánica presente, lo que proporciona una mayor superficie de contacto para los microorganismos.⁽²⁵⁾ Hay que destacar que, debido al trabajo conjunto entre lombrices y microorganismos, el residuo orgánico es degradado hasta mineralizarse parcialmente, convertirse en humus y estabilizarse.⁽²⁸⁾

Para el día 56 del estudio se apreció una degradación de casi la totalidad de los residuos en el grupo humus, lo cual justifica una ligera disminución del peso de las lombrices a este tiempo. Resultados similares fueron obtenidos por el grupo de trabajo del SETMA (Cenatox) en un estudio no publicado, con 2 ensayos de degradación de los residuos vegetales de soya transgénica (NM DEF02), maíz transgénico (híbrido MIR 162 y TC 1507) y convencional. El tiempo de degradación para la soya transgénica fue de 50 días y no mostró mortalidad ni alteraciones en los organismos expuestos; en el caso del maíz la total degradación ocurrió en el día 66 del estudio sin ocurrencia de mortalidad.

En la presente investigación se demuestra que el residuo vegetal del extracto hidroalcohólico de *Lippia alba* no muestra toxicidad sobre *E. andrei*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Malik S, Odeyemi S, Pereira GC, Mamede de Freitas Jr. L, Abdul-Hamid H, Atabaki N, et al. New insights into the biotechnology and therapeutic potential of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson, J Essent. Oil Res. 2021; 33(6): 523-35. DOI: 10.1080/10412905.2021.1936667
2. Chaverri C, Ramón-Farías F, Cicció JF. Chemistry of essential oils of the shrub *Lippia alba* (Verbenaceae) from Mexico and Costa Rica. UNED Res. J. 2022; 14(2): e4005. DOI: 10.22458/urj.v14i2.4005



3. Ortega M, Acosta E, Molina A, Gutiérrez C, Castro G y Tofiño A. Actividad biológica de los aceites esenciales del arbusto *Lippia alba* (*Verbenaceae*). Rev Biol Trop. 2020; 68(1): 344-59. DOI: 10.15517/rbt.v68i1.39153
4. Gomes AF, Almeida MP, Ruela ALM, Amaral JG, David JM, Leite MF. Development and evaluation of physical and release properties of a tablet formulation containing dry hydroethanolic extract from *Lippia alba* leaves. J Herb Med. 2021; 29: 100459. DOI: 10.1016/j.hermed.2021.100459
5. MINSAP. Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos. La Habana: ECIMED. 2017 [acceso: 28/01/2023]. Disponible en: <https://instituciones.sld.cu/cimeq/2018/01/09/formulario-nacional-de-fitofarmacos-y-apifarmacos-segunda-edicion-ano-2017/>
6. Varela SA, Brasil JG. Uso de compost en la producción de plantines de especies forestales. Argentina: INTA digital; 2011. [acceso: 31/01/2023]. Disponible en: https://repositoriosdigitales.mincyt.gov.ar/vufind/Record/INTADig_4be4f15d4cc5e38489a40dac04295d6e
7. Abadi B, Mahdavian S, Fattahi F. The waste management of fruit and vegetable in wholesale markets: Intention and behavior analysis using path análisis. J Clean Prod. 2021; 279: 123802. DOI: 10.1016/j.clepro.2020.123802
8. González Y, Villalobos J. Manejo ambiental de residuos orgánicos: Estado del arte de la generación de compostaje a partir de residuos sólidos provenientes de sistemas de trampa de grasa y aceite. Tecnol Marcha. 2021; 34(2): 11-22. DOI: 10.18845/tm.v34i2.4843
9. EPA. Ecological effects test guidelines. OCSPP 850.3100: Earthworm Subchronic Toxicity Test; 2012. [acceso: 15/01/2023]. Disponible en: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0154-0019>
10. Miranda MM, Cuéllar AC. Manual de prácticas de laboratorio: Farmacognosia y productos naturales. La Habana: Editorial Félix Varela; 2000.
11. Hsu BY, Lin SW, Stephen B, Chen BH. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Chenopodium formosanum* Koidz. (djulis) by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. J Pharm. Biomed Anal. 2017; 132: 109-16. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.09.027



12. OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 207: Earthworm, acute toxicity test. Paris: OECD; 1984. DOI: 10.1787/9789264070042-en
13. EPA. Ecological effects test guidelines. OCSPP 850.3100: Earthworm subchronic toxicity test. Harmonized Test Guidelines. Series 885 Microbial Pesticides Test Guidelines-Final Guideline; 1996. [acceso: 04/01/2023]. Disponible en: <http://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-850>
14. MINSAP. Regulación No 39/04: Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental. La Habana: CECMED; 2004. [acceso: 26/01/2023]. http://www.cecmecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/reg_39-04_principios_de_buenas_practicas_de_laboratorio_no_clinico_de_seguridad_sanitaria_y_medio_ambiental.pdf
15. Svenska Institutet for Standarder. Guideline DIS 11268-1: Soil quality—effects of pollutants on earthworms. Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. Geneva: SIS; 2012. [acceso: 03/02/2023]. Disponible en: <https://www.sis.se/std-915467>
16. Timoteo P, Karioti A, Leitao SG, Vincieri FF, Bilia AR. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. Food Chem J. 2015; 175: 366-73. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.129
17. Ferraz A, Prates M, Freire M, Schwaiger S, Stuppner H, Halabalaki M, et al. Seasonal variation in the chemical composition of the two chemotypes of *Lippia alba*. Food Chem J. 2019; 273: 186-93. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.089
18. Chávez ML, Sepulveda L, Kumar D, Luna HA, Rodríguez LV, Ilina A, et al. Conventional and emerging extraction processes of flavonoids. Processes. 2020; 8(4): 434-40. DOI: 10.3390/pr8040434
19. Adejoke H, Louis H, Amusam OO, Apebende G. A review on classes, extraction, purification and pharmaceutical importance of plants alkaloids. J Med Chem Sci. 2019; 2: 130-9. DOI: 10.26655/jmchemsci.2019.8.2
20. Sette-De-Souza PH, do Rego SE, Macedo MR, Batista S, da Rocha A, de Oliveira TJ, et al. Antibacterial activity and phytochemical screening of extracts of *Lippia alba* (Mill). NE Brown. Afr. J Microbiol Res. 2014; 8(29): 2783-7. DOI: 10.5897/AJMR2014.6791



21. Texeira G, Siqueira FJM, Lima WG, Ferreira AL, Duarte AJM, Rodrigues dos Santos LLA. Phytochemical characterization and bioprospection for antibacterial and antioxidant activities of *Lippia alba* Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae). *Nat Prod Res.* 2018; 32(6):723-31. DOI: 10.1080/14786419.2017.1335727
22. Ganeshpurkar A, Saluja AK. The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharm J.* 2017; 25(2): 149-64. DOI: 10.1016/j.jsps.2016.04.025
23. Pavela R, Morshedloo M, Mumivand H, Khorsand GJ, Karami A, Maggi F, et al. Phenolic monoterpene-rich essential oils from Apiaceae and Lamiaceae species: insecticidal activity and safety evaluation on non-target earthworms. *Entomol Gen.* 2020; 40(4): 421-35. DOI: 10.1127/entomología/2020/1131
24. Mapula M, Manyevere A, Kwabena K, Munjonji L. Characterisation of *Chamaecytisus tagasaste*, *Moringa oleifera* and *Vachellia karroo* Vermicomposts and Their Potential to Improve Soil Fertility. *Sustainability.* 2020; 12(22): 9305. DOI: 10.3390/su12229305
25. Kiyasudeen S, Jessy RS, Ibrahim MH. Earthworm's gut as reactor in vermicomposting process: A mini review. *Int J Sci Res Publ.* 2014; 4(7): 2250-3153 [acceso: 26/01/2023]. Disponible en: <https://www.ijsrp.org/research-paper-0714.php?rp=P312891>
26. Pradas A. Tratamiento de residuos orgánicos mediante vermicompostaje: Interacciones lombriz-microorganismo y aplicaciones biotecnológicas del vermicompost. España: Universidad de la Laguna; 2020. [acceso: 15/12/2022]. Disponible en: <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/21696>
27. González D. Determinación de la materia orgánica del suelo mediante espectroscopia de reflectancia vis-NIR en áreas cultivadas con boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) [Tesis de maestría]. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu"; 2018. [acceso: 28/12/2022]. Disponible en: <https://dspace.uclv.edu.cu/server/api/core/bitstreams/34113939-b74c-41bf-857c-77b0cbfb247b/content>
28. Dohaish EJAB. Vermicomposting of organic waste with *Eisenia fetida* increases the content of exchangeable nutrients in soil. *Pak J Biol Sci.* 2020; 23(4): 501-9. DOI: 10.3923/pjbs.2020.501.509



Conflictos de interés

Los autores no declaran conflictos de interés. Este estudio fue hecho con el apoyo financiero de la Iniciativa de Cooperación Triangular Adelante ICT 328-22.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: *Ana Cristina Noa Rodríguez, Alejandro Felipe González, Yordanka Domínguez Linares.*

Curación de datos: *Maydelín Díaz González, Yamilet Irene Gutiérrez Gaitén, Ramón Scull Lizama.*

Análisis formal: *Ana Cristina Noa Rodríguez, Yordanka Domínguez Linares, Alejandro Felipe González.*

Investigación: *Ana Cristina Noa Rodríguez, Yordanka Domínguez Linares, Ramón Scull Lizama, Odette Beiro Castro.*

Metodología: *Ana Cristina Noa Rodríguez, Yordanka Domínguez Linares, Yamilet Irene Gutiérrez Gaitén.*

Supervisión: *Alejandro Felipe González, Yordanka Domínguez Linares.*

Redacción - borrador original: *Ana Cristina Noa Rodríguez, Alejandro Felipe González, Jorge Carlos Castillo Miranda.*

Redacción - revisión y edición: *Ana Cristina Noa Rodríguez, Alejandro Felipe González, Yordanka Domínguez Linares, Ramón Scull Lizama.*