

Determinación de la composición química y estudios de solubilidad en la harina de lombriz *Eisenia foetida*.

ROSA ALBA VIELMA RONDÓN^{1,2} Y MEDINA ANA LUISA^{1,3}.

¹DPTO. DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS. ²DPTO. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA. FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS. SECTOR CAMPO DE ORO, DETRÁS DEL H.U.L.A. ³LABORATORIO FIRP. FACULTAD DE INGENIERÍA, AV. TULLIO FEBRES CORDERO. UNIVERSIDAD DE LOS ANDES. MÉRIDA-VENEZUELA.

E-mail: rosavvefr@yahoo.com

Recibido Abril 2006 - Aceptado Diciembre 2006

RESUMEN

La lombriz *Eisenia foetida* representa una alternativa nutricional por el alto contenido de proteínas. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición química de la harina de lombriz y a la vez estudiar su solubilidad, ya que esta última es una propiedad funcional importante para la formulación de alimentos. Para realizar este estudio, las lombrices se convirtieron previamente en harina. El contenido de proteínas, grasas y cenizas se determinó por el método de la AOAC, mientras que fibra y humedad se determinó por digestión in vitro (ácida-básica) y Karl-Fisher respectivamente. El índice de solubilidad se ensayó en un rango de pH de 3,0 hasta 8,0. La composición química de la harina liofilizada y secada en estufa en términos porcentuales fue lo esperado para una fuente de nutrientes de origen animal. Los lisados proteicos de la harina liofilizada (LHL) presentaron un máximo en el índice de solubilidad a pH 8 mientras que en los lisados proteicos de la harina secada en estufa (LHSE) se mantuvo casi constante en el rango de pH estudiado.

Estos resultados se compararon con los de la caseína, la cual presentó un mínimo de solubilidad a pH 4,5. Se pudo demostrar que el comportamiento de solubilidad de los lisados proteicos de lombriz fue diferente al obtenido en la caseína, debido a que la muestra presenta un medio complejo de proteínas, impidiendo obtener una curva clásica de solubilidad.

PALABRAS CLAVES

Eisenia foetida, lombriz, composición química y solubilidad.

ABSTRACT

The worm *Eisenia foetida*, represents a nutritional

alternative for the high content of proteins and fatty acids. The objective of this work was to determine the chemical composition of the worm flour dried off in stove (HSE) and lyophilized (HL), at the same time to study its solubility, since this, is an important functional property for the formulation of foods. To carry out this study, the worms were transformed previously into flour. The content of proteins, fats and ashes were determined by the method of the AOAC, while fiber and humidity was determined by digestion in vitro (acid-basic) and Karl-Fisher respectively. The index of solubility was study within the range of pH 3,0 to 8,0. The chemical composition found for the flour regardless the drying procedure was in agreement with the expected for an animal source. The lysate of protein of the lyophilized flour showed a minimum of solubility index at pH 8, while, the solubility of the lysate of protein of the flour dried off in stove was constant in all range of pH studied. These results were in disagreement with those obtained for casein, which presented a minimum of solubility at pH 4,5. This should be explain by the fact that the sample contain a complex medium of proteins, which not permit to obtain a classic curve of solubility.

KEY WORDS:

Eisenia foetida, worm, chemical composition and solubility.

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de alimentos es difícil satisfacerla empleando sistemas tradicionales. Es por ello que la producción de alimentos a partir de recursos no convencionales, que sean ricos en nutrientes esenciales como es el caso de la harina de lombriz *Eisenia foetida*, constituye una actividad

recomendada en los países en vía desarrollo (Ortega et al., 1996). Ésta, además de contener aminoácidos esenciales (Velásquez et al., 1986a; Vielma et al., 2003a) y ácidos grasos esenciales (Velásquez et al., 1986b; Vielma et al., 2003b) también contiene vitaminas y minerales importantes en la nutrición humana (Salazar y Rojas, 1992; Vielma et al., 2007). Lo anteriormente descrito ratifica, la importancia de estudiar esta lombriz criada bajo las condiciones establecidas en este estudio.

Por otra parte, la solubilidad es una característica importante para el enriquecimiento de alimentos, especialmente cuando se pretende aumentar el valor nutritivo de diferentes fórmulas (Velásquez et al., 1990).

En tal sentido, el poder suministrar a la industria alimenticia productos novedosos, como lo serían las proteínas de esta especie de lombriz, representa un aspecto tecnofuncional importante.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la composición química, así como los aspectos funcionales de la harina de lombriz *Eisenia foetida* como alimento no convencional, para su posible utilización en el enriquecimiento de alimentos para consumo humano y animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Las muestras fueron obtenidas de la lombriz *Eisenia foetida*, en estado adulto (3 meses), criadas en un lombricultivo ubicado en el herbario "Luis Ruiz Terán" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Las lombrices se alimentaron a base de un compostaje de desechos orgánicos de la preparación de alimentos del comedor universitario de la Universidad de Los Andes. A este compostaje se le controló la temperatura, humedad y pH, para garantizar el óptimo crecimiento de las lombrices (Salazar y Rojas, 1992).

Pre-tratamiento de las muestras

Muestra de harina de lombriz obtenida por liofilización (HL) y secado en estufa (HSE): Se seleccionaron aleatoriamente 300 lombrices y luego fueron lavadas con agua corriente, conservadas durante 24 horas en un recipiente contentivo de agua e insuflación de aire (Velásquez et al., 1986a). El proceso de liofilización para la obtención de la harina liofilizada (HL) se realizó a -40 °C. Para la obtención de la harina secada en estufa (HSE) se siguió la misma metodología descrita para obtener la HL hasta el proceso de insuflación de aire. Luego, las lombrices previamente lavadas se sometieron a un shock osmótico con una solución de NaCl al 4% (Velásquez et al., 1986a). Después del beneficio, se lavaron con abundante agua

y se colocaron en una estufa a 60 °C durante 9 horas. Finalmente, las lombrices secas se molieron hasta el grado de un producto harinoso homogéneo.

Determinación de la Composición Química de la Harina de Lombriz *Eisenia foetida*

La determinación de proteínas (MicroKjeldahl), grasa (Soxhlet) y cenizas se realizó por el método de la (AOAC, 1986). Para la determinación de fibra cruda se utilizó el método por digestión in vitro (ácido-básico) (Quintero, 1994). La determinación de humedad se realizó por el Método de Karl-Fisher (Farmacopea de los Estados Unidos de México, 1988) y carbohidratos solubles se calculó por diferencia (composición centesimal)

Determinación del índice de solubilidad de la caseína y de los lisados proteicos de la harina liofilizada (LHL) y secada en estufa (LHSE).

Tratamiento de las muestras

Preparación de la caseína (Medina, 1992).

La caseína se obtuvo a partir de 2 litros de leche cruda. La leche fue descremada por centrifugación (25 °C, 4000 rpm x 10 min.). La leche descremada (500 mL) se diluyó con 200 mL de agua destilada y se llevó a su punto isoeléctrico (pH 4,6) con una solución de HCl 1N. Después de la decantación y eliminación del sobrenadante, el precipitado se lavó varias veces con agua destilada y se llevó hasta pH 7 con una solución de NaOH 0,1 M. Esta operación fue realizada dos veces. Posteriormente, el precipitado se filtró en un embudo Buchner. El residuo (caseinato de sodio) se congeló a -20 °C y se liofilizó.

Preparación de los lisados de la Harina de Lombriz Liofilizada (LHL) y Harina Secada en Estufa (LHSE) a 20 mg/mL.

Se pesaron por duplicado 0,85 g de HL y 0,88 g HSE. Cada una de las muestras se transfirieron a un vaso de precipitado que contenía 18 mL de agua destilada y 1 mL de buffer de inhibidores de proteasas (Leupeptin 10 µL, TLCK 100 µM, PMSF 50 µM, EDTA 100 mM, Benzamidina 1 mM, Antipafina 0,2 µM, Quimostatina 1 µM, Pestatina 1 µM, Inhibidores de tripsina de soya 50 µg/mL, EGTA 2mM, E-G4 3µM y DTT 1mM) (Laboratorio de enzimología, Facultad de Ciencias-Universidad de Los Andes).

Las muestras se colocaron en un baño de hielo con agitación constante durante 5 min. y luego se homogeneizaron. Cada lisado se transfirió a un balón de 25 mL de capacidad y se llevó a volumen con agua destilada (solución madre 20 mg/mL).

Las dos muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 min. a 4 °C y el sobrenadante se denominó lisado de harina liofilizada (LHL) y lisado de harina secada en estufa (LHSE).

El índice de solubilidad de la caseína, HHL y HHSE,

fue ensayado en un rango de pH de 3,0 hasta 8,0. Esta metodología se realizó según protocolo de Medina (1992) pero con algunas modificaciones.

Para ello, se midió 1,5 mL de la solución madre de caseína (20 mg/mL), LHL y LHSE respectivamente y se transfirió en un vaso de precipitado con agitación constante. Para la muestra de caseína el pH se ajustó con una solución de HCl 0,1 N y una solución de NaOH 0,1 N a temperatura ambiente, desde pH 3,0 hasta 8,0 (con intervalos de 0,5 unidades de pH).

Las muestras del LHL y LHSE se colocaron en un baño de hielo y el pH se ajustó siguiendo la metodología descrita para la caseína.

Una vez ajustado el pH, todas las soluciones se transfirieron a un balón de 25 mL de capacidad y se llevaron a volumen con agua destilada, para obtener una concentración final de 1,2 mg/mL. Seguidamente, las muestras se agitaron (agitación magnética) durante una hora a temperatura ambiente (caseína) y a 7 °C aproximadamente (LHL y LHSE). Finalmente, todas las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 min.

La concentración proteica de los sobrenadantes se determinó de acuerdo a la siguiente metodología (Schacterjee y Pollack, 1973):

a.- Se prepararon ocho tubos de ensayos con 0; 10; 20; 40; 50; 60; 80 y 100 µL de albúmina de suero bovino y se completó a 0,5 mL con solución 1 % de dodecil sulfato de sodio (SDS). Se agitó en el vortex y se realizó el mismo procedimiento para todas las muestras problemas.

b.- A cada tubo se le agregó 0,5 mL del reactivo de cobre y se agitó en el vortex.

c.- Cada tubo se dejó reposar durante 10 min.

d.- Luego se agregó 2 mL de reactivo de Folin a cada tubo, se agitó en el vortex y se llevó a baño María a 55 °C durante 5 min. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5-7 minutos y se leyó la densidad óptica a 650 nm.

Para la determinación del índice de solubilidad se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de Solubilidad} = \frac{\text{Concentración proteica del sobrenadante (mg/mL)} \times 100}{\text{Concentración proteica de la muestra (mg/mL)}}$$

Análisis electroforético con geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la caseína y de los LHL y LHSE utilizadas para las pruebas de solubilidad

Para el análisis electroforético se utilizaron soluciones de caseína, LHL y LHSE con un rango de pH de 3,0 hasta 8,0 (cada intervalo de 0,5 unidades de pH). Para la preparación de los geles se siguió la metodología de Lammeli (1970).

La migración se realizó en un equipo de electroforesis vertical Bio-Rad, modelo N°. Mini-

PROTEAN II Cell, a 20 mA durante 1 hora en un buffer Tris-glicina-SDS a pH 8,3 y se utilizó un patrón de peso molecular de 14400-94000 daltons (Pharmacia Biotech-11-B-036-17). Para la coloración de los electroforogramas, se usó una solución de azul brillante Coomassie R-250 al 0,1 % (p/v) con ácido tricloroacético (TCA) y para la decoloración se siguió la metodología de Girardet (1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición Química de la HL Y HSE

Los resultados obtenidos en el análisis proximal de la HL y HSE (Tabla 1) indican que este tipo de alimento no convencional contiene los nutrientes esenciales en niveles satisfactorios para la alimentación tanto animal como humana, ya que fueron comparados con algunos alimentos tradicionales (Tabla 2) reportados en la Tabla de Composición de Alimentos del Instituto Nacional de Nutrición (2001).

TABLA 1
Composición química de la HL y HSE

Componente (%)	HL	HSE*
Humedad	11,6 ± 0,1	13,5 ± 0,1
Proteína bruta	62,3 ± 0,1	61,8 ± 0,2
Lípidos	7,9 ± 0,7	11,1 ± 0,2
Cenizas	7,9 ± 0,1	6,0 ± 0,8
<u>Carbohidratos totales</u>		
Fibra cruda	2,0 ± 0,3	3,7 ± 0,4
Carbohidratos solubles	8,3 ± 1,1	3,9 ± 0,3

*datos ya publicados por el mismo autor

TABLA 2
Composición química de diferentes alimentos tradicionales según el Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela (INN) (2001)

Componente (%)	Harina integral precocida	Harina de maíz tostado	Afrecho de (DNS)*	Arepa andina
Proteína	7,1	9,9	16,3	10,9
Grasa	3,8	4,6	4,5	2,6
Fibra	5,5	--	43,8	--
Cenizas	0,9	1,4	6,1	1,8
Humedad	9,8	10,8	13,2	25,0

*DarkNorthSpring

Por otro lado, la composición química de HL y HSE resultó ser semejante cuando se comparó con la de otros investigadores como Tacón (1983), Velásquez, et al. (1986a) y Medina (1999), quienes trabajaron con esta lombriz.

Análisis de solubilidad en la caseína, lisado de la harina de lombriz liofilizada (LHL) y lisado de la harina secada en estufa (LHSE)

Índice de solubilidad de la caseína.

La caseína presentó un mínimo de solubilidad a pH isoelectrico (pH 4,5) (Fig. 1). Como se sabe en este pH la carga neta de las proteínas es nula, lo que originó pérdida total de su solubilidad (Miller, 2001). El máximo de solubilidad fue en la región de pH 3 y 6-8. Estos resultados se corroboraron con los estudios electroforéticos (SDS-PAGE) (Fig. 2A y 2B), ya que la intensidad de las bandas proteicas α , β y κ de la caseína fue mínima a pH 4,5 y luego se incrementaron a medida que aumentó el pH.

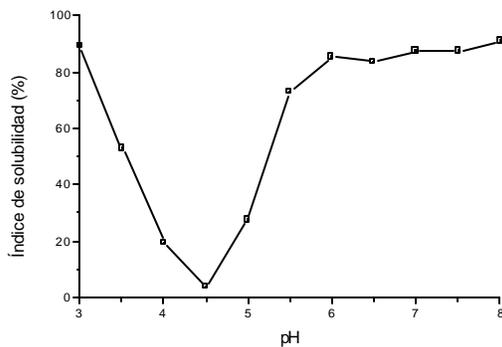


Fig. 1. Influencia del pH en la solubilidad de la caseína

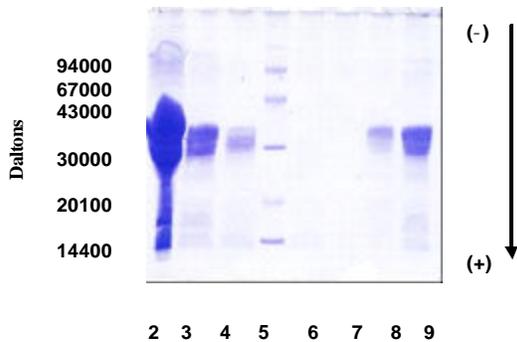


Fig. 2A. Efecto del pH sobre la caseína, en electroforesis SDS-PAGE. 2 (solución madre: 20 mg/mL); 3 (pH 3); 4 (pH 3,5); 5 (Patrón de peso molecular); 6 (pH 4); 7 (pH 4,5); 8 (pH 5); 9 (pH 5,5).

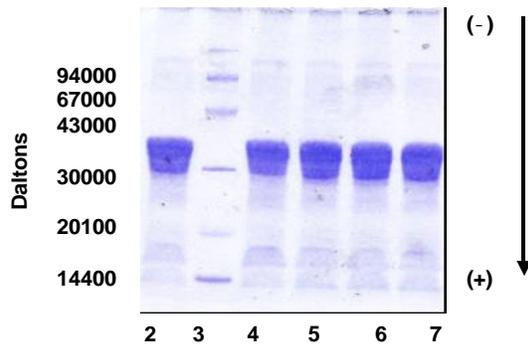


Fig. 2B. Efecto del pH sobre la caseína en electroforesis SDS-PAGE (continuación). 2 (pH 6); 3 (Patrón de peso molecular); 4 (pH 6,5); 5 (pH 7); 6 (pH 7,5); 7 (pH 8).

Índice de solubilidad del LHL

Los mínimos de solubilidad se obtuvieron a pH 3,5 y 4. Sin embargo, se observó mejor solubilidad en la región de pH 3, luego se obtuvo un incremento a partir de pH 4,5 hasta llegar a un máximo de solubilidad en la zona de pH 8 (Fig. 3). La diferencia en estos resultados, comparados con los de la caseína, se debe a que la harina de lombriz tiene un medio complejo con diferentes proteínas (Fig. 4A), por lo que no se pudo obtener una curva clásica de solubilidad. Además en los estudios electroforéticos, algunas bandas proteicas (Fig. 4A) desaparecieron por el efecto del pH (Fig. 4B y 4C), y se observó que la solubilidad fue más baja a partir de la región de pH 3,5. Esto indicó que las diferentes proteínas presentaron solubilidades características de cada fracción. Comportamientos similares se han reportado en trabajos llevados a cabo por investigadores con muestras de concentrados proteicos de pescado (Warrier y Ninjoor, 1981).

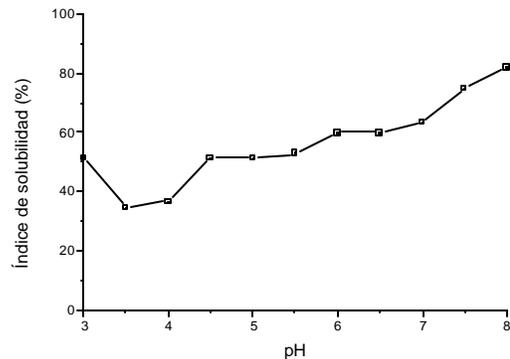


Fig. 3. Influencia del pH en la solubilidad de las proteínas del LHL

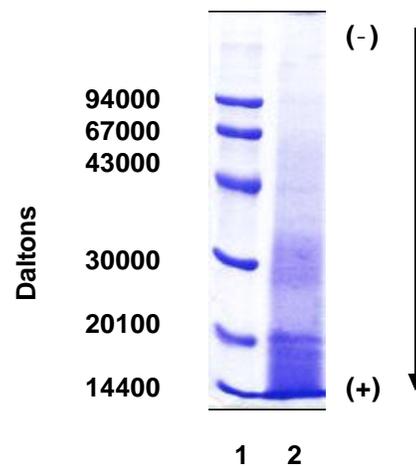


Fig. 4A. Electroforesis SDS-PAGE de la solución madre del LHL (20 mg/mL). 1 (patrón de peso molecular); 2 (solución madre del LHL).

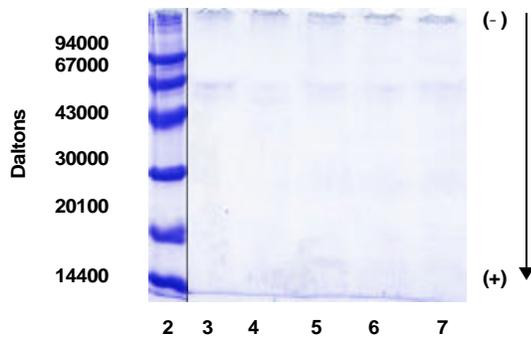


Fig. 4B. Efecto del pH en el lisado proteico, LHL por electroforesis SDS-PAGE. 2 (Patrón de peso molecular); 3 (pH 3); 4 (pH 3,5); 5 (pH 4); 6 (pH 4,5); 7 (pH 5).

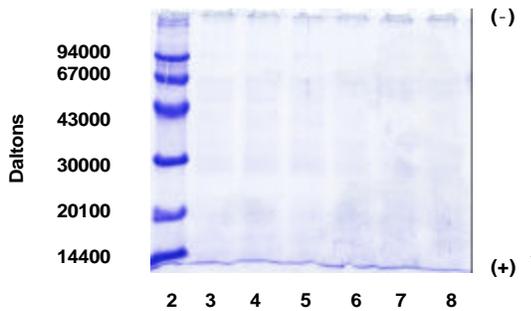


Fig. 4C: Efecto del pH en el lisado proteico, LHL por electroforesis SDS-PAGE (continuación). 2 (Patrón de peso molecular); 3 (pH 5,5); 4 (pH 6); 5 (pH 6,5); 6 (pH 7); 7 (pH 7,5) 8 (pH 8).

Índice de solubilidad del LHSE

Como puede observarse en la Fig. 5, el índice de solubilidad se mantuvo casi constante entre un pH de 3 y 8, sin embargo se pudo observar los máximos en el pH 5; 6,5 y 7,5 y los mínimos fueron entre 4,5 y 7,0. Al comparar las curvas de solubilidad, tanto de las proteínas del LHL (Fig. 4) como del LHSE (Fig. 5), pudo observarse un comportamiento de solubilidad muy diferente. Esto podría atribuirse al shock osmótico que se aplicó al LHSE, provocando de alguna manera desnaturalización de las proteínas.

En el análisis electroforético también se observó que algunas bandas proteicas de la solución madre del LHSE (Fig. 6A) desaparecieron a diferentes rangos de pH, (Fig. 6B y 6C). Estos resultados demostraron que su solubilidad es muy similar en el rango de pH estudiado (pH 3-8) (Fig. 5).

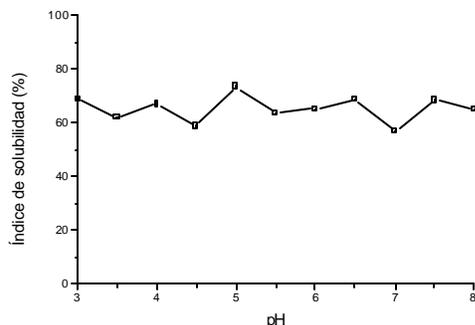


Fig. 5. Influencia del pH en la solubilidad de las proteínas del LHSE

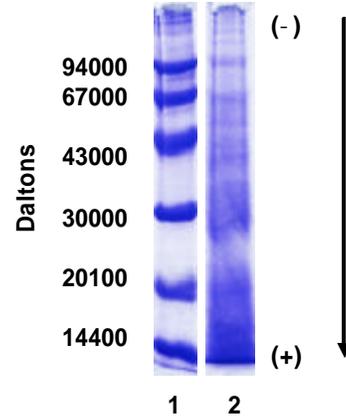


Fig. 6A. Electroforesis SDS-PAGE de la solución madre del LHSE: 20 mg/mL. 1 (patrón de peso molecular); 2 (solución madre del LHSE).

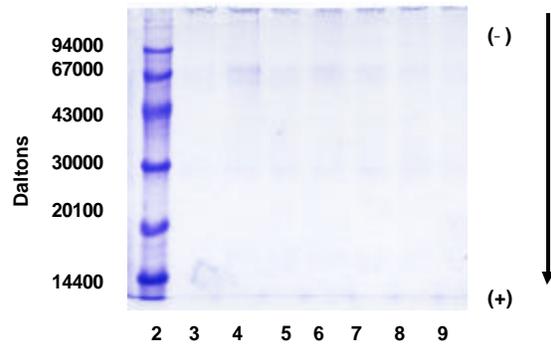


Fig. 6B. Efecto del pH en las proteínas del LHSE con electroforesis SDS-PAGE. 2 (Patrón de peso molecular); 3 (pH 3); 4 (pH 3,5); 5 (pH 4); 6 (pH 4,5); 7 (pH 5); 8 (pH 5,5); 9 (pH 6).

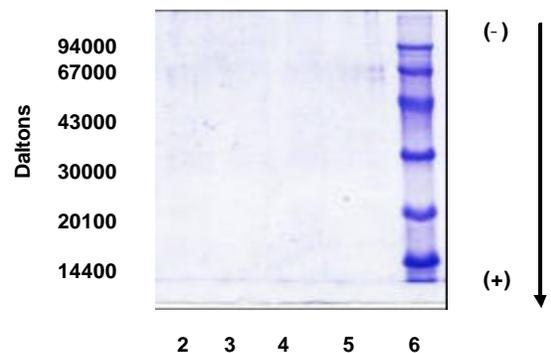


Fig. 6C. Efecto del pH en el lisado proteico LHSE con electroforesis SDS-PAGE (continuación). 2 (pH 6,5); 3 (pH 7); 4 (pH 7,5); 5 (pH 8); 6 (Patrón de peso molecular).

La importancia que se le ha dado a los estudios de solubilidad de las proteínas, es que depende de esta propiedad la aplicabilidad como agente enriquecedor de las fórmulas alimenticias. La solubilidad puede ser alterada por tratamientos ácidos o básicos del entorno donde se encuentran las proteínas (Abtahi y Aminlari, 1997).

Anteriormente se ha discutido que las proteínas alcanzan su punto isoeléctrico cuando estas se asocian y forman geles o precipitados. Sin embargo, en el análisis de solubilidad de las proteínas de la harina de la lombriz *Eisenia foetida* no se observó formación de precipitados como los observados con las prueba de

solubilidad de la caseína. Esto permitió inferir que, en esta harina existen varias proteínas con comportamientos diferentes en los rangos de pH estudiados, los cuales fueron demostrados en los ensayos electroforéticos. Es por ello, que en algunos de estos rangos de pH se observó mejor solubilidad que en otros, lo que produjo variaciones características en la solubilidad de este tipo de proteínas.

Por otro lado, se observó que la solubilidad de las proteínas pudo ser afectada por el uso de tratamientos térmicos durante el secado, provocando disminución de esta propiedad (Linden y Lorient, 1994) por desnaturalización de las proteínas (Lawhon et al., 1972; Ahenkora et al., 1999) y Wang y Johnson 2001). Tal fue el caso de la solubilidad del LHSE, la cual fue más baja que la del LHL.

Es importante destacar, que los estudios de solubilidad de las proteínas en la harina de lombriz *Eisenia foetida* fueron también estudiados por (Velásquez et al., 1990) y (Medina y Araque, 1999), quienes obtuvieron buena solubilidad en estas proteínas.

CONCLUSIONES

La composición química de la harina de lombriz en términos porcentuales fue satisfactoria, ya que algunos de estos valores fueron superiores a los reportados en la Tabla de Composición del INN para algunos alimentos tradicionales y a los reportados por investigadores que han trabajado con este tipo de lombriz. Por lo tanto se puede decir, que este recurso no convencional provee una excelente fuente de nutrientes en la alimentación humana y animal.

No se obtuvo una curva clásica de solubilidad, sin embargo en todo el rango de pH estudiado se obtuvieron fracciones que fueron más solubles que otras, lo que permite inferir que para la formulación de alimentos concentrados para animales donde el manejo del pH de la fórmula será en un rango no ácido, se puede tener parte de las fracciones de la harina de lombriz disponible.

Los resultados obtenidos en este trabajo aunados a los reportados por otros autores que han trabajado con la lombriz *Eisenia foetida*, constituyen un aspecto importante a considerar, reconociendo que muchas propiedades tecnofuncionales de las proteínas dependen de su solubilidad, ésta determina el campo de aplicación que las proteínas puedan tener en el mercado alimenticio así como también si un ingrediente proteínico nuevo será competitivo en el mismo.

AGRADECIMIENTO

A FONACIT, por el financiamiento de la beca doctoral a Rosa Alba Vielma Rondón.

Al Profesor Juan Luis Concepción (Laboratorio de Enzimología, Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abtahi, S. y Aminlari, M. 1997. **Effect of sodium sulfite, sodium bisulfite, cysteine, and pH on protein solubility and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of soybean milk base.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 45: 4768-4772.

Ahenkora, K., Dadzie, M y Osei-Bonsu, P. 1999. **Composition and functional properties of raw and heat processed velvet bean (*Mucuna pruriens* (L) DC. Var utilis) flours.** International Journal of Food Science and Technology. Vol. 34: 131-135.

Association of Official Analytical Chemists. (AOAC). 1986. **Official Methods of Analysis.** Arlington. Virginia. USA. (14^a Edición).

Girardet, J. M., Sanogo, T., Etienne, L. y Linden, G. 1991. **Fast protein liquid chromatography purification of hydrophobic fraction of bovine milk protease-peptone and characterization by bidimensional electrophoresis.** Journal of Dairy Research. Vol. 58: 85-98.

Lammeli, U. K. 1970. **Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis.** Nature. Vol. 222: 680-685.

Lawhon, J. T., Cater, C. M. y Mattil, K. F. 1972. **A whippable extract from gladness cottonseed flour.** Journal Food Science. Vol. 37: 317-321.

Linden, G y Lorient, D. 1994. **Solubilidad, Productos cárnicos.** Bioquímica agroindustrial (1era edición), Acribia (Ed.), Zaragoza-España P. 23-181.

Medina, A.L. 1992. **Influence de la phosphorylation chimique sur la structure et les propriétés technofonctionnelles de la caseina bovine.** Tesis de Doctorado. Universidad de Bourgogne L'ENSBANA, Dijon-Francia.

Medina, A. y Araque, J. 1999. **Obtención, composición química, funcional, perfiles electroforéticos y calidad bacteriológica de la carne de lombriz, *Eisenia foetida*.** Revista de la Facultad de Farmacia (Universidad de Los Andes). Vol. 37: 31-38.

Miller, D. 2001. **Propiedades funcionales de las proteínas.** En: **Química de Alimentos.** Manual de Laboratorio. Departamento de Ciencias de los

Alimentos, Corneel University, Ithaca, Nueva -York (1era ed.), Limusa (Ed.), D.F., México P. 46-48.

Ortega, M., Reyes, A. y Mendoza, G 1996. **Composición química de ensilados de lombrices terrestres (*Eisenia fetida* y *Lumbricus rubellus*).** Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 46 (4): 325-328.

Pharmacia Biotech. Calibration Kits For Molecular Weight Determination Using Electrophoresis. 11-B-036-17. Rev. 2. U.S.A.

Quintero, F. 1994. **Manual de Práctica de Laboratorio de Ciencia de los Alimentos.** Departamento de Ciencia de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela.

Salazar, E. y Rojas C. 1992. **Conferencias Curso fundamental de lombricultura. Aspectos Generales-Teoría.** Asociación Colombiana de Lombricultores, Asolombriz. Grupo CorpoAndes. Mérida, Venezuela. P. 88.

Schacterjee, G.R. y Pollack, R.L. 1973. **A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein biologic material.** Anal. Biochem. Vol. 51: 654-655.

Tabla de composición de alimentos para uso práctico. 2001. Instituto Nacional de Nutrición. Publicación No 52, serie de cuadernos azules. Caracas, Venezuela.

Tacon, A. G. J., Stafford, E. A. y Edwards, C. A. 1983. **A preliminary investigation of the nutritive value of three terrestrial lumbricid worms for rainbow trout.** Aquaculture. Vol. 35: 187-199.

Velásquez, L., Herrera, C., Ibañez, I. Harina de lombriz. 1986a. **Obtención, composición química, valor**

nutricional y calidad bacteriológica. Alimentos. Vol. 11 (1): 15-21.

Velásquez, L., Herrera, C. e Ibañez, I. 1986b. Harina de lombriz. II Parte: **Composición de ácidos grasos, factores antinutricionales y tratamiento térmico para control bacterial.** Alimentos. Vol. 11 (4): 9-13.

Velásquez, L., Barriga, R., Herrera, C e Ibañez, I. 1990. **Harina de lombriz. III parte: Propiedades funcionales.** Alimentos. Vol.15 (4): 13-16.

Vielma, R.A., Ovalles, J., León, A. y Medina A. 2003a. **Valor nutritivo de la harina de lombriz (*Eisenia foetida*) como fuente de aminoácidos y su estimación cuantitativa mediante cromatografía en fase reversa (HPLC) y derivatización precolumna con o-ftalaldehído (OPA).** Ars Pharmaceutica. Vol. 44 (1): 43-48.

Vielma, R.A., Usubillaga, A y Medina, A. 2003b. **Estudio preliminar de los niveles de ácidos grasos de la harina de lombriz (*Eisenia foetida*) mediante cromatografía de gases acoplada a masas.** Revista de la Facultad de Farmacia (Universidad de Los Andes). Vol. 45 (2):39-44.

Vielma, R.A., Carrero, P., Rondón, C. y Medina, A. **Contenido de minerales y elementos trazas en la harina de lombriz de tierra (*Eisenia foetida*).** Saber. Vol. 19 (1), 2007. impress.

Wang, C. y Johnson, L. 2001. **Functional properties of hydrothermally cooked soy proteins products.** Journal of the American Oil Chemists Society. Vol. 78 (2): 189-195.

Warrier, S. B. y Ninjoor, V. 1981. **Fish protein concentrate (FPC) from Bombay duck isolated by radiation-heat combination procedure: functional and nutritional properties.** Journal Food Science. Vol. 46: 234-238.