

COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE MINERALES Y ELEMENTOS TRAZAS EN LA HARINA DE LOMBRIZ DE TIERRA (*Eisenia foetida*) UTILIZANDO DOS MÉTODOS DE SECADO

COMPARISON OF THE CONTENT OF MINERALS AND TRACE-ELEMENTS IN FLOUR OF EARTHWORM (*Eisenia foetida*) USING TWO DRYING PROCEDURES)

ROSA ALBA VIELMA¹; PABLO CARRERO ^{2*}; CARLOS RONDÓN ²; ANA LUISA MEDINA ^{1,3}

Universidad de Los Andes, ¹Departamento de Ciencia de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Sector Campo de Oro, detrás del IAHULA, ²Facultad de Ciencias, Departamento de Química

³Facultad de Ingeniería, Escuela de Ing. Química, Laboratorio FIRP

IPOSTEL La Hechicera P.O. Box 68, Mérida 5101-A, Venezuela / pcarrero@ula.ve, Fax: 58-274-2401286

RESUMEN

Se determinó el contenido de minerales y elementos trazas en muestras de lombrices terrestres *Eisenia foetida*, convertidas previamente en harina a través de dos métodos de secado: i) liofilización y ii) secado en estufa a 60 °C por 9 horas. Los niveles de Na, K, Ca, Fe, Mg, Zn, Cu, Mn, Li, Hg, se determinaron por espectroscopia de absorción atómica (EAA) previa digestión de la muestra con HNO₃:H₂O₂, mientras que para Pb sólo se usó HNO₃ ultra puro para su ulterior determinación mediante espectroscopia de absorción atómica electrotérmica (ETAAS). El Hg se determinó mediante espectroscopia de absorción atómica con generación de vapor frío (CV-AAS). Para el análisis de fósforo las muestras fueron convertidas en cenizas, seguida de la disolución de las mismas en HCl 10 % v/v y la determinación se realizó por espectrofotometría UV/visible. El efecto del método de secado se determinó aplicando pruebas de igualdad de medias (Test t de Student) a los niveles de cada elemento (excepto Hg, Pb y P) obtenidos por ambos métodos, observándose efectos del mismo en algunos casos. La harina de lombriz se caracterizó por presentar elementos como Na, K, Ca, Fe, Mg, Zn, Cu, Mn, Li y P que son esenciales en la nutrición. Finalmente, los niveles de Pb y Hg encontrados, fueron bajos con respecto a las cantidades de estos elementos aceptadas para algunos alimentos tradicionales. Estos resultados demostraron que esta harina es una fuente potencial de minerales para la fortificación de alimentos, para consumo humano.

PALABRAS CLAVE: *Eisenia foetida*, compostaje, enriquecimiento, minerales, metales pesados, elementos traza

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the content of some minerals and trace elements in samples of earth worm *Eisenia foetida*, previously transformed into flour through two drying methods: i) liophylization and ii) drying in stove at temperatures at 60 °C for 9 hours. The levels of Na, K, Ca, Fe, Mg, Zn, Cu, Mn, and Li were determined by means of atomic absorption spectroscopy (FAAS) previous digestion of the sample with HNO₃:H₂O₂. Using only ultra pure HNO₃, the levels of Pb were determined by means of electro thermal atomic absorption spectroscopy (ETAAS). Hg was determined by atomic absorption spectroscopy with generation of cold vapor (CV-AAS). For the analysis of P the samples were burned to ashes and these were dissolved in 10 % v/v HCl for the spectrophotometric detection of the element. The effect of the drying procedure was determined using tests of means comparison (Student's t test) to the levels of each element (except Hg, Pb and P) obtained by both methods, observing the effects in some cases. The concentration of the elements Na, K, Ca, Fe, Mg, Zn, Cu, Mn, Li and P in the worm flour were in agreement with the nutritional requirements. Finally, the concentrations of Pb and Hg found were bellow of the toxic levels accepted in foods. The results demonstrated that this flour is a potential source of minerals in the fortification of foods, for human consumption.

KEY WORDS: *Eisenia foetida*, compost, enrichment, minerals, trace elements, heavy metals.

INTRODUCCIÓN

El poder utilizar la lombriz roja californiana *Eisenia foetida* como fuente nutritiva para el consumo animal y humano, se debe a su alto contenido en proteínas (50-75 %) (Velásquez *et al.* 1986; Dash y Dash, 1990; Medina y Araque, 1999; Vielma *et al.* 2003). Es por ello, que actualmente es considerado como un recurso biotecnológico de elevado interés nutricional y ecológico (Velásquez *et al.* 1986).

Los minerales son micronutrientes indispensables para el funcionamiento óptimo del organismo y están disponibles a través de los alimentos. Algunos como el Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo (como molibdato), K, Se (como selenato), Na y Zn, Crews, (1998) participan en procesos bioquímicos y fisiológicos. La composición química, específicamente el perfil mineral, de la harina de lombriz fue estudiada por Salazar y Rojas (1992), Segovia (1996) y Gonzalvo *et al.* (2001) reportando la presencia de Al, Ca, Mg, Fe, Cu, Na, K y P.

Tomando en cuenta lo descrito anteriormente, la harina de lombriz *Eisenia foetida* podría representar un aporte mineral importante en el campo nutricional. Sin embargo, la lombriz presenta un nivel de organización característicos de los invertebrados, pertenece al reino animal, subreino metazoaos, división vermes y subdivisión anélidos, tiene la capacidad de bio-concentrar algunos elementos (metales), lo que ha permitido utilizarla como detector de contaminación química (Edwards *et al.* 1998; Spurgeon y Hopkin, 1999; Gruber *et al.* 2000). En tal sentido, se hace imprescindible la determinación de metales pesados (Hg y Pb) si se quiere utilizar la harina de lombriz para alimentación humana.

Para el consumo de la carne de lombriz como fuente de enriquecimiento no convencional de formulaciones alimentarias, se hace necesario convertir este material biológico en harina, mediante procesos de secado (liofilización y secado en estufa) y posterior molienda. Esta harina se podría utilizar en poblaciones que tienen riesgo de malnutrición.

El presente trabajo tuvo como objetivo, comparar dos métodos de secado (liofilización y secado en estufa) para la obtención de harina de lombriz *Eisenia foetida* y así poder determinar los niveles nutricionales (Na, K, Ca, Fe, Mg, Zn, Cu, Mn, Li y P) y los posibles contaminantes como algunos metales pesados (Hg y Pb) para establecer su importancia nutricional en el consumo humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras:

Muestras de lombrices sin tratamiento

Las muestras de la lombriz *Eisenia foetida* en estado adulto (3 meses), con una longitud y peso promedio de 8,5 cm y 0,45 gramos respectivamente, fueron obtenidas del Lumbricultivo del herbario “Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes. Se alimentaron a base de un compostaje de desechos orgánicos 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.

Pre-tratamiento de las muestras

Muestra de harina de lombriz obtenida por liofilización (HL)

Se seleccionaron aleatoriamente 300 lombrices, las cuales fueron lavadas profusamente con agua potable con el fin de limpiarlas exteriormente. Luego se dejaron durante 24 horas en un recipiente contentivo de agua potable e insuflación de aire, con el objeto de evacuar el intestino de las lombrices (Velásquez, *et al.* 1986). Finalizado este proceso, se congelaron (nitrógeno líquido), se liofilizaron a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas y se sometieron a una molienda hasta el grado de un producto harinoso homogéneo.

Muestra de harina de lombriz obtenida por secado en estufa (HSE)

Se siguió la misma metodología descrita para obtener la HL hasta el proceso de lavado. Las lombrices previamente tratadas como se especificó en el párrafo anterior, fueron sacrificadas con una solución de NaCl al 4 % (Velásquez, *et al.* 1986). Después del beneficio se lavaron con abundante agua y luego se colocaron en una estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 9 horas. Finalmente se aplicó el mismo proceso de molienda.

Equipos

Se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer equipado con una unidad FIAS 200 para la determinación de Na, K, Fe, Li, Mn, Zn, Cu, Mg, Ca y Hg. Para la determinación de Pb se usó un espectrofotómetro de absorción atómica 2100 Perkin Elmer con atomizador electrotérmico,

mientras que para la determinación de P se utilizó un espectrofotómetro UV/visible Perkin Elmer Lambda 11.

Digestión de la muestra

Para la determinación de Na, K, Fe, Ca, Zn, Mg, Mn, Cu, Li, Hg y Pb se pesaron 0,5 g de muestra (HL o HSE) por triplicado y se digirieron siguiendo el método de Adeloju (1994), ligeramente modificado. Para ello se agregaron 15 mL de ácido nítrico concentrado y se calentó a 150 °C durante 1 h: 15 min, luego se agregaron 2 mL de peróxido de hidrógeno 30 % (w/v) y la digestión se completó hasta 1 h: 20 min.

Para la determinación de Hg se utilizó el mismo tratamiento de digestión descrito anteriormente pero a una temperatura de 60 °C para evitar la volatilización del Hg. Para la determinación de Pb, la muestra fue digerida utilizando ácido nítrico suprapuro a 60 °C durante 1h: 45 min. Finalmente todas las muestras fueron filtradas usando papel de filtro Whatman 42 y se llevaron hasta volumen de 25 mL con agua desionizada (18 MΩ de resistividad).

Para la determinación de fósforo (P), se pesaron por duplicado 2 g de HL y HSE respectivamente. Estas muestras fueron colocadas en crisoles de porcelana de 50 mL de capacidad y luego llevadas a una mufla a 550 °C durante 24 horas (AOAC, 1986). Las cenizas obtenidas se disolvieron con 10 mL de ácido clorhídrico al 50 % enseguida se calentó hasta obtener un volumen final de 2 mL, luego se agregó 10 mL de ácido clorhídrico al 10 % y se trató de igual manera a la descrita anteriormente, finalmente se adicionó 10 mL de agua desionizada repitiendo el tratamiento anterior. Posteriormente el residuo, fue retomado con 25 mL de agua desionizada, filtrado en papel Whatman N° 42 y el filtrado fue llevado hasta volumen en un balón de 50 mL agua desionizada. De esta solución se tomaron 3 mL y se llevaron hasta volumen de 100 mL agua desionizada. Finalmente a 5 mL de esta solución, se le agregaron 5 mL de una solución de molibdato de amonio y 2 mL de solución de ácido amino naftol sulfónico (ANSA) y luego se enrasó hasta 50 mL agua desionizada (Boscan, 1977).

Determinación analítica de los elementos

Los niveles de Ca, Mg, Na, K, Fe, Li, Mn, Zn y Cu fueron determinados usando el método de Análisis por Inyección de Flujo-Espectrometría de Absorción Atómica (FIA-EAA) (Burguera *et al.* 1986; León *et al.* 1986; Burguera *et al.* 1990). La determinación de Hg fue realizada por Generación de Vapor Frío con detección por

Espectroscopia de Absorción Atómica y la de Pb fue por Espectroscopia de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica (ETAAS). El contenido de P fue analizado por espectroscopia UV/visible siguiendo la metodología de (Boscán 1977; Rodier 1990). Para la elaboración de la curva de calibración se prepararon patrones acuosos de concentración apropiada para cada elemento. La longitud de onda (nm) utilizada para los análisis de cada elemento fue la siguiente: (Na: 589,0; K: 766,5; Ca: 422,7; Fe: 248,3; Mg: 285,2; Zn: 213,9; Cu: 324,8; Mn: 279,0; Li: 670,8; P: 700,0; Pb: 283,3; Hg: 253,7 nm).

Estudio estadístico

Se calcularon los parámetros estadísticos de los contenidos analizados (Na, K, Ca, Fe, Mg, Zn, Cu, Mn, Li y Hg) y se determinó el intervalo de confianza de la media para un 95 % de confianza. Para las pruebas de igualdad de medias (Test t de Student) en todos los casos analizados se planteó la hipótesis nula, $H_0: \mu_1 = \mu_2$, contra la hipótesis alterna, $H_a: \mu_1 \neq \mu_2$, para un 95 % de confianza. Por lo tanto la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando ésta fue verdadera, fue de 0,05. El estadístico utilizado fue: si t_0 es mayor al valor de referencia (2,776). Este valor fue obtenido de la Tabla de distribución de Student con grados de libertad (4) y $\alpha = 0,025$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del perfil mineral de la harina de lombriz *Eisenia foetida*

Los resultados obtenidos en el análisis de minerales (Tabla 1) se refieren tanto a la harina de lombriz liofilizada (HL) como a la harina de lombriz secada en estufa (HSE). Se detectó diferencias significativas entre las concentraciones medias de Na, K, Ca y Mn para los dos tipos de harinas, mientras que para el Mg, Zn y Cu no se encontraron diferencias significativas. Las diferencias en cuanto al contenido de Na en la HSE, se podrían atribuir a que las lombrices fueron sacrificadas a través de un shock osmótico con una solución de NaCl al 4 % durante el proceso de secado en estufa. Sin embargo las diferencias conseguidas tanto en la HL como en la HSE para los elementos K, Ca y Mn no existe una razón aparente que justifique dicho resultado.

Los valores de Na y K en estas harinas son comparables a los reportados por Gonzalvo *et al.*, (2001) en harina de lombriz *Eisenia foetida* de 930 y 1150 mg/100g respectivamente.

Con respecto a los elementos Ca, Fe, Mg, Zn, Cu, Mn y Li (Tabla 1) encontrados en estas harinas, estos resultaron fueron satisfactorios cuando se les compara con los resultados publicados por otros investigadores. Las concentraciones de Ca fueron similares al reportado por Salazar y Rojas (1992), de 280,0 mg/100 g y mayor a la reportada por Segovia (1996) que fue de 72,29 mg/100 g. Los niveles de Ca en los dos tipos de muestras analizadas podría representar una importante fuente de éste elemento en la alimentación humana, siendo los valores obtenidos en esta investigación, inclusive mayor en algunos casos, a los valores conseguidos en alimentos cárnicos tradicionales, tales como hígado y bazo vacuno (Segovia, 1996).

En cuanto al contenido de Fe, este resultó elevado si se compara con los valores señalados por Salazar y Rojas (1992) y Segovia (1996) que fueron de 41,43 y 38,6 mg/100 g respectivamente. El nivel de Mg encontrado fue menor de 140,0 mg/100 g, valor reportado por Salazar y Rojas (1992). La razón de esta diferencia cuantitativa, podría ser originada por los tipos de residuos orgánicos utilizados para la alimentación de las lombrices. Los niveles de Cu obtenidos en estas harinas, superan al reportado por Salazar y Rojas (1992) que fue de 1,43 mg/100 g. Es importante resaltar, que la cuantificación de Zn, Mn y Li en esta especie de lombriz, aun no ha sido reportada por otros autores, por lo que podría constituir un aporte importante en lo que se refiere al estudio analítico de estos componentes.

Tabla 1. Contenido de Na, K, Ca, Fe Mg, Zn, Cu, Mn, y Li en la HL y HSE de la lombriz *Eisenia foetida*

| Elemento | HL (mg/100 g) | HSE (mg/100 g) |
|-----------------|----------------|-----------------|
| Na ¹ | 631,67 ± 25,29 | 1070,83 ± 41,28 |
| K ¹ | 941,67 ± 7,22 | 654,17 ± 26,02 |
| Ca ² | 211,26 ± 1,26 | 202,44 ± 1,26 |
| Fe ² | 104,99 ± 1,53 | 103,83 ± 1,18 |
| Mg ² | 91,70 ± 4,23 | 92,32 ± 8,99 |
| Zn ² | 4,39 ± 0,02 | 4,35 ± 0,38 |
| Cu ² | 1,90 ± 0,00 | 2,02 ± 0,15 |
| Mn ² | 4,92 ± 0,04 | 5,35 ± 0,04 |
| Li ² | 0,67 ± 0,07 | 0,72 ± 0,05 |

¹Electrolitos esenciales; ²Elementos químicos esenciales; n = 3

Los niveles de Fósforo (P) en la HL y HSE, fueron de 1075,59 ± 30,29 y 929,80 ± 25,99 mg/100 g respectivamente, valores menores a los reportados por Segovia (1996) y Gonzalvo *et al* (2001) para sus harinas de lombriz, con valores de 1723,72 y 1410 mg/100 g respectivamente. Esto se podría atribuir a que estos investigadores, utilizaron una alimentación para lombrices a base de un compostaje de estiércol de vacuno, el cual pudo repercutir en la diferencia encontrada.

La Tabla de Composición de Alimentos del Instituto Nacional de Nutrición (2001), para algunos alimentos tradicionales tales como harina de maíz tostado y harina de maíz precocida enriquecida reporta valores de Ca, P y Fe de 20; 307 y 4,2 y de 12; 64 y 5,0 mg/100 g respectivamente. Cuando se compararon los valores de los alimentos tradicionales a los encontrados en las HL

y HSE resultaron los primeros ser menores, por lo tanto, el contenido de estos elementos en la harina de lombriz, resulta ser muy atractivo, ya que esta materia prima podría convertirse en una buena fuente de estos elementos, para la alimentación humana.

Por otro lado, Madruga y Camara (2000), han reportado valores de K, P, Na, Fe y Zn de 532; 509; 7,91; 4,79 y 3,29 mg/100 g respectivamente en la mezcla alimenticia "Multimistura". Este suplemento alimenticio utilizado en Brasil, contiene valores más bajos de estos elementos, que los encontrados en la harina de lombriz.

Considerando el aporte mineral (Ca, P, Mg, Fe y Zn) diario estipulado por Raciones Dietéticas Recomendadas de Estados Unidos (RDA USA) y el grupo de expertos de la FAO/OMS (<http://www.portalfitness.com/nutricion/>

Tabla_minerales.htm) la harina de lombriz podría contribuir con un aporte mineral aceptable para satisfacer las necesidades de estos elementos en la nutrición humana.

Análisis de metales pesados (Pb y Hg)

Los valores de Pb y Hg en las HL y HSE se recogen en la Tabla 2. Se observó que los niveles de estos elementos en estas harinas se podrían considerar satisfactorios, si se comparan con los establecidos en las normas COVENIN (1995) para algunos alimentos tradicionales como el atún en conserva, el cual acepta un límite máximo de 2 y 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el Pb y Hg respectivamente. Para alimentos

como sardina en conserva, los límites establecidos por las normas COVENIN (1998) para el Pb son 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ y para el Hg de 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$. Es importante resaltar, que no existen referencias de los niveles de Pb y Hg en harinas no tradicionales para establecer una comparación exhaustiva de dichos resultados. Es por ello, que los mismos fueron comparados con los de las Normas COVENIN. Por otro lado cabe destacar, que la utilización de las harinas de lombriz *Eisenia foetida* sería como suplemento alimentario, con un máximo de sustitución de 15 %, por lo que la adición de estas harinas, no representa ningún riesgo toxicológico, por contaminación de metales pesados.

Tabla 2. Contenido de Hg y Pb en HL y HSE

| Muestra | Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$) |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|
| HL | 0,165 \pm 0,054 | 1,9 \pm 0,01 |
| HSE | 0,158 \pm 0,034 | 2,5 \pm 0,50 |

CONCLUSIONES

En los métodos de obtención de las harinas, no se observó una tendencia general favorable o desfavorable hacia ninguno de los dos métodos, para la determinación de los diferentes elementos. Además, no se dispone de materiales certificados de harina de lombriz *Eisenia foetida*, que permitan establecer de una manera más precisa el método de secado más conveniente.

Tomando en cuenta que estos métodos de secado, aun no han sido reportados, se sugiere continuar realizando estudios de recuperación de cada elemento para poder determinar el método ideal para dicho análisis.

La harina de lombriz *Eisenia foetida* constituye una fuente no convencional importante de minerales esenciales, por lo que debería considerarse como una alternativa nutricional en el campo alimenticio humano sobre todo en las poblaciones menos favorecidas.

Desde el punto de vista toxicológico, la harina de lombriz no representa ningún riesgo, en su utilización nutricional, dado que la cantidad de elementos contaminantes Hg y Pb son mínimos.

AGRADECIMIENTO

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT), Venezuela por el financiamiento, a Rosa Alba Vielma Rondón para la realización del Doctorado y al CDCHT-ULA por el financiamiento de los proyectos de investigación FA-260-01-03-B y FA-242-00-03-Ed.

A la profesora Isabel Flórez de la Facultad de Ingeniería (ULA), por el asesoramiento en el análisis e interpretación estadística.

Al Ingeniero Juan Carmona y demás miembros del personal del herbario MERF "Dr. Luis Ruiz Terán" de la Facultad de Farmacia de la ULA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELOJU, S.B.; DHINDSA, H.S.; TANDON, R.K. 1994. Evaluation of some wet decomposition methods for mercury determination in biological and environmental materials by cold vapors atomic absorption spectroscopy. Anal. Chim. Acta. 285: 359-364.

- AOAC. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists. 1986. XXIV Ed. Arlington. Virginia. USA.
- BOSCAN L.A. 1977. Manual de prácticas de laboratorio (Control de calidad de la leche), Universidad Simón Bolívar, División de Ciencias Biológicas, Departamento de Biotecnología, Caracas, Venezuela.
- BURGUERA M.; BURGUERA J.L.; RIVAS C.; ALARCÓN O. M. 1986. Determination of cooper, zinc and iron in parotid saliva by flow injection with flame atomic absorbtion spectrophotometry. *At. Spectros.* 7: 79-81.
- BURGUERA J.L.; BURGUERA M.; RIVAS C.; DE LA GUARDIA M.; SALVADOR A.; CARBONELL, V. 1990. A variable volume injector applied to the atomic absorption determination of sodium, potassium, calcium and magnesium in blood serum by flow injection analysis. *J. Flow Inj.* 7: 11-18.
- CREWS, H. M. 1998. Speciation of trace elements in foods, with special reference to cadmium and selenium: is it necessary? *Spectroch. Acta. Part B*: 213-219.
- DASH AK.; DASH M.C. 1990. Earthworm meal as a protein concentrate for broilers, *Trop. Agric. (Trinidad)*. 67: 342-344.
- EDWARDS, S., MACLEOD, C.; LESTER, J. 1998. The bioavailability of cooper and mercury to the common nettle *Urtica dioica* and the earthworm *Eisenia fetida* from contaminated dredge spoil. *Water, Air, and Soil Pollution*. 102: 75-90.
- GONZALVO, S.; NIEVES, D.; LY J., MACÍAS M., CARON, M.; MARTÍNEZ, V. 2001. Algunos aspectos del valor nutritivo de alimentos venezolanos destinados a animales monogástricos. *Livestock Research for Rural Development*. 13 (2). [Revista en línea]. Se consigue <http://www.ciprav.org.co/lrrd/lrrd13/2/gonz132.htm>.
- GRUBER, C.; STÜRZENBAUM, S.; GEHRIG, P.; SACK, R., HUNZIKER, P.; BERGER, B.; DALLIGER, R. 2000. Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein (Cd)-Metallothionein from *Eisenia foetida*. *Eur. J. Biochem.* 267: 573-582.
- LEÓN N., BURGUERA J.L., BURGUERA M.; ALARCÓN O. M. 1986. Determination of cobalt and manganese in blood serum by flow injection analysis and atomic absorption spectroscopy. *Rev. Roum. Chim.* 31: 353-360.
- MADRUGA M.; CAMARA F. 2000. The chemical composition of "Multimiistura" as a food supplement. *Food Chemistry*. 68: 41-44.
- MEDINA A.; 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. Venezuela)*. 37: 31-38.
- NORMA VENEZOLANA COVENIN. Atún en conserva. 3era. Revisión (1766). 1995. República Bolivariana de Venezuela, Ministerio de Desarrollo Social. Gerencia Sectorial de Registro y Control. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rángel" Sección de Productos Cárnicos. Caracas, Venezuela.
- NORMA VENEZOLANA COVENIN. Sardinias en conservas. 5ta. Revisión (1087). 1998. República Bolivariana de Venezuela, Ministerio de Desarrollo Social. Gerencia Sectorial de Registro y Control. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" Sección de Productos Cárnicos. Caracas, Venezuela.
- RODIER J. 1990. Análisis de aguas naturales, aguas residuales, agua de mar. Barcelona, España: Omega S.A. pp. 150-187.
- SALAZAR E., ROJAS C. 1992. Conferencias curso fundamental de lombricultura, Aspectos generales-Teoría, Asociación Colombiana de lombricultores, Asolombriz. Santa Fé de Bogotá.
- SEGOVIA, M. 1996. Análisis físico químico de la harina de lombriz *Eisenia foetida*, [Tesis de Ingeniería]. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad La Molina, Lima, Perú.
- SPURGEON, D.J.; HOPKIN, S.P. 1999. The development of genetically inherited resistanse to zinc in laboratory-selected generation of the earthworm *Eisenia fetida*. *Environm. Pollution* 109 :193-201

TABLA DE REQUERIMIENTOS DIARIOS DE MINERALES.
Recomendaciones RDA. [Documento en línea].
Se consigue en: http://www.portalfitness.com/nutricion/Tabla_minerales.htm.

TABLA DE COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS PARA USO PRÁCTICO.
2001. Instituto Nacional de Nutrición. Publicación
No 52, serie de cuadernos azules. Caracas,
Venezuela. pp. 18-20.

VELÁSQUEZ L., HERRERA C.; IBAÑEZ I. Harina de lombriz.

1986. Obtención, composición química, valor
nutricional y calidad bacteriológica. Alimentos.
11 (1): 15-21.

VIELMA R. A., OVALLES J., LEÓN A.; MEDINA A. 2003. 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* 44 (1):
43-48.