

# EFFECTOS DE LA HARINA DE LOMBRIZ SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS DE LA PROTEÍNA C3 DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO E INMUNOGLOBULINA G EN RATONES

## Effects of the Earthworm Flour on Plasma Levels of C3 Protein Complement System and Immunoglobulin G in Mice

Lerida Borges<sup>1</sup>, Benibelks Albarrán<sup>2</sup>, Guillermo Bianchi<sup>3</sup>, Ana Luisa Medina<sup>2</sup> y José Angel Cova<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes. <sup>2</sup>Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Venezuela. <sup>3</sup>Facultad de Humanidades y Educación, Universidad de Los Andes.

\* Avenida 16 de Septiembre, edificio Louis Pasteur, al lado del IAHULA, Mérida-Mérida.

Teléfono: 58-274-2403199. Fax: 58-274-2403212. jacova@ula.ve

### RESUMEN

La harina de lombriz es una fuente de proteína no convencional que podría ayudar a resolver los problemas alimentarios de animales de engorde y domésticos, pero estas mismas proteínas podrían inducir cambios en ciertos parámetros inflamatorios, entre ellos los reactantes de fase aguda. El objetivo de este estudio fue evaluar los niveles séricos de dos de estos reactantes, C3 e IgG, en ratones NMRI recién destetados; después del consumo de dietas suplementadas con diferentes porcentajes de harina de la lombriz *Eisenia spp.* Se utilizaron tres grupos de ratones asignados como: GC alimentado con una dieta comercial, G1 alimentado con una dieta suplementada con 25% de harina de lombriz y G2 alimentado con una dieta suplementada con 50% de harina de lombriz. Después de 30 días de alimentación se extrajeron muestras de sangre para realizar la determinación de los niveles de C3 e IgG, mediante la técnica de inmunodifusión radial. Los niveles de C3 disminuyeron significativamente en los grupos experimentales. Los niveles de IgG total se incrementaron significativamente cuando se aumentó el porcentaje de harina de lombriz en la dieta. A pesar de estos cambios en las variables, no se observaron reacciones adversas, hipomotilidad y taquicardia, en los animales con las dietas suministradas y su peso al final del estudio fue similar al grupo control. Esta forma de suplementación alimentaria parece ser segura para la alimentación de animales de engorde y mascotas, pero nuevos estudios incluyendo otros parámetros inflamatorios son necesarios.

**Palabras clave:** Nutrición animal, harina de lombriz, C3, inmunoglobulina G.

### ABSTRACT

The earthworm meal is a source of non-conventional protein that could help solve the food problems of animals for fattening and domestic, but these same proteins could induce changes in certain inflammatory parameters, including the acute-phase reactants. The objective of this study was to evaluate the serum levels of two of these reactants, C3 and IgG, in newly weaned NMRI mice after the consumption of diets supplemented with different percentages of flour from the earthworm *Eisenia spp.* Three groups of mice were assigned as: GC supplied with a commercial diet, G1 fed with diet supplemented with 25% of earthworm meal and G2 fed with a diet supplemented with 50% of earthworm meal. After 30 days of feeding, blood samples were collected for the determination of the levels of C3 and IgG, using the radial immunodiffusion technique. The levels of C3 decreased significantly in the experimental groups. The total IgG levels increased significantly when the percentage of earthworm meal in the diet was augmented. In spite of these changes in the variables, no adverse reactions were observed, hypomotility and tachycardia, in animals with diets supplied and its weight at the end of the study was similar to the control group. This form of food supplementation appears to be safe for the animal feed for fattening and pets, but new studies including other inflammatory parameters are needed.

**Key words:** Animal nutrition, earthworm flour, C3, immunoglobulin G.

### INTRODUCCIÓN

La harina de lombriz (HL) ha sido considerada como una fuente de proteína no convencional de bajo costo, ya que

estos anélidos se alimentan de desechos orgánicos, crecen a una alta velocidad y se multiplican rápidamente [21]. HL se considera un complemento alimenticio 100% natural y orgánico, que posee un alto contenido de proteínas, aminoácidos y ácidos grasos esenciales importantes para la nutrición de animales y, tal vez, de humanos [5, 10, 17]. Además, posee una alta gama de vitaminas como: A, B6, B12, C y E; minerales tales como hierro, zinc, cobre, selenio y elementos trazas que actúan como cofactores de vías metabólicas, consideradas fundamentales para la integridad y el funcionamiento del organismo [14, 20]. Estas características colocan a la HL como un posible sustituto parcial de las dietas usadas en la alimentación de animales de engorde y mascotas, disminuyendo el uso de proteínas convencionales (harina de pescado) que, en los últimos años, ha disminuido en su oferta, por una merma de las reservas marinas.

Es bien conocido que ciertas sustancias ingeridas (principalmente las proteínas) actúan como antígenos exógenos y pueden inducir procesos inflamatorios. Durante la fase inicial de estos procesos inflamatorios se producen sustancias denominadas "reactantes de la fase aguda" que incluyen: la proteína C3 del Complemento (C3), la proteína C reactiva (PCR) y la proteína amiloide A (AAS); así como un incremento en los niveles séricos de las inmunoglobulinas [9]. En este sentido, determinar la participación de la HL en la alteración de estos reactantes es de gran importancia, ya que aportará nuevos conocimientos para la seguridad alimentaria.

Diversos estudios han demostrado que la harina obtenida de la lombriz *Eisenia* spp puede ser usada en la alimentación de diferentes especies, tales como: peces, roedores, pollos, entre otros [5,11,18]. De la lombriz *Eisenia* spp no sólo se obtiene una carne rica en proteínas, con un perfil de aminoácidos esenciales interesante, sino que también aporta un alto contenido de lisina, aminoácido que suele estar ausente en los alimentos básicos [21]. El contenido de este aminoácido en la HL es significativo (5,9% p/p) y podría satisfacer los requerimientos en los niños entre 2 a 5 años, exigidos por la Food and Agriculture Organization de la World Health Organization (FAO/WHO) [15]. Otros reportes señalan el uso de HL en preparaciones de salchicha y arepas con buena aceptación en los humanos que participaron en el estudio [3, 12].

En Venezuela, se ha evaluado el efecto de la suplementación con HL sobre el crecimiento, perfil lipídico y función hepática de roedores, encontrándose que el uso de esta harina solo modificó los niveles séricos de colesterol en los animales en estudio [5]. Igualmente, se han evaluado algunos efectos de la HL sobre el sistema inmunológico (SI); en este sentido dos estudios no encontraron alteraciones ni cambios histopatológicos a nivel hepático, intestinal, ni en la concentración de Inmunoglobulina E específica, responsable de las reacciones de hipersensibilidad inmediata [5, 13, 19].

Hasta ahora no se ha observado que la proteína de la lombriz produzca efectos adversos en ratones *Mus musculus*,

hasta una concentración de 65% en la dieta [19]. Como se mencionó, se han realizado estudios sobre los efectos de la HL en diferentes modelos de animales, pero se conoce muy poco sobre la participación de esta suplementación en los parámetros inflamatorios, especialmente en los antes citados. El objetivo del presente estudio consistió en medir las concentraciones séricas de dos reactantes de fase aguda -C3 e inmunoglobulina G (IgG)- en ratones alimentados con dietas suplementadas con HL (como fuente proteica no convencional), durante 30 días (d), y compararlo con ratones alimentados con la dieta estándar, con la finalidad de evaluar la participación de esta forma de alimentación en los niveles séricos de estos marcadores inflamatorios de los animales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de las dietas

Se prepararon dos dietas experimentales (G1 y G2) mezclando diferentes porcentajes de la HL -obtenida de la *Eisenia* spp- y completando el porcentaje faltante con harina de pescado artesanal (HPA), hasta llevarlas al tenor de proteína que se requería; ambas fueron preparadas en el departamento de Ciencia de los alimentos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, en la Universidad de Los Andes, Venezuela; constituyendo esta mezcla la fuente total proteica. Se adicionaron además: vitaminas, minerales y ácidos grasos para obtener dietas acordes con las necesidades de los animales.

La dieta estándar o control (GC) usada fue un producto comercial (Ratarina® granulada, Venezuela), adquirido en la localidad.

La dieta G1 contenía 25% de HL y 75% de HPA; la G2 tenía 50% de HL y 50% de HPA. Todas las dietas experimentales contenían los demás ingredientes mencionados arriba a las mismas concentraciones, para tener al final, dietas con 50,2 y 47,8% de proteínas (TABLA I).

Posterior a la preparación, las dietas fueron analizadas, para conocer sus componentes: humedad, cenizas, grasas y proteínas (TABLA II), siguiendo un protocolo previamente descrito por la Association of Official Analytical Chemistry [1]. El porcentaje de proteínas (método de Kjeldal) fue calculado a partir de 1 gr de cada muestra, mezclándose con 10 g de sulfato de potasio; 0,7 g de óxido de mercurio y 20 mL de ácido sulfúrico. Esta mezcla fue colocada en un digestor eléctrico (Vapodest, Gerhardt, Alemania) y sometida a ebullición. Posteriormente se añadieron 400 mL de agua destilada, 75 mL de sulfato de sodio y 80 mL de hidróxido de sodio al 40%; se destiló la solución y se determinó el nitrógeno. A partir de este valor se obtuvo la cantidad de proteína presente en la muestra [1].

Para la cuantificación de los lípidos (Método de Soxhlet) se usaron 5 gr de cada muestra que fueron colocadas en un dedal, luego se hace recircular la solución de éter, en un ex-

**TABLA I**  
**INGREDIENTES INCLUIDOS EN LA PREPARACIÓN DE LAS DIETAS**

Contenido	GC	G1	G2
Fuente proteica	Harina de ajonjolí, soja, pescado, leche en polvo, maíz y sorgo	Harina de pescado y harina de lombriz	Harina de pescado y harina de lombriz
Sales	Carbonato y fosfato de calcio, sal	Carbonato y fosfato de calcio, sal	Carbonato y fosfato de calcio, sal
Vitaminas	A, B1, B2, B12, D, E, niacina, biotina	A, B1, B2, B12, D, E, niacina, biotina	A, B1, B2, B12, D, E, niacina, biotina
Otros	Antioxidantes y antibióticos	Antioxidantes	Antioxidantes

GC: Grupo control, G1: 25% de harina de lombriz; G2: 50% de harina de lombriz.

**TABLA II**  
**ANÁLISIS PROXIMAL DEL ALIMENTO COMERCIAL Y LAS DIETAS EXPERIMENTALES**

Muestra	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasas (%)	Proteínas (%)
GC	9,62 ± 0,07	7,57 ± 0,19	2,05 ± 0,09	29,75 ± 0,35
G1	5,21 ± 0,02	8,66 ± 0,06	7,31 ± 0,22	50,23 ± 0,59
G2	13,14 ± 0,18	8,79 ± 0,03	9,53 ± 0,03	47,89 ± 0,40

GC: Grupo control, G1: 25% de harina de lombriz; G2: 50% de harina de lombriz.

tractor de grasa (extractor solvent SER 148, Velp Scientific, EUA), hasta el agotamiento total de la grasa. Una vez terminado el proceso se evaporó el solvente y por diferencia de peso se calculó la concentración de lípidos [1].

La ceniza se obtuvo a partir de calentar 1 gr de cada muestra en una mufla (Box fumace, Lindberg Blue, EUA) a 550°C durante varias horas. A partir del peso final e inicial se obtuvo el porcentaje de cenizas [1]. La Humedad se realizó en una estufa a 100°C hasta peso constante.

Una vez terminado el proceso de elaboración y análisis de las harinas, las mismas fueron empacadas y almacenadas a 4°C hasta su uso.

### Animales

Para este estudio fueron utilizados 24 ratones de la línea NMRI, de tres semanas de edad y recién destetados, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos de ocho ratones cada uno, para recibir las dietas - GC, G1 y G2- durante 30 d. Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Inmunología Clínica, de la Universidad de Los Andes, con una temperatura promedio de 22°C, ciclos alternos de luz-oscuridad de 12 horas (h) cada uno; recibiendo agua y alimentos *ad libitum* por el periodo de la investigación. El estudio fue aprobado por un comité local de ética animal de la Universidad de Los Andes.

Durante el estudio se llevó un registro diario de los efectos adversos: piloerección, temblor, disminución de la motilidad, diarrea; así como de la mortalidad en cada grupo. Al final, los ratones fueron anestesiados, usando ketamina (50 mgs/Kg) por vía intraperitoneal, y mediante punción cardíaca, se obtuvo una muestra de sangre de cada animal, para medir los niveles séricos de C3 e IgG total.

### Determinación de los niveles séricos de C3 e IgG por inmunodifusión radial

Los niveles séricos de C3 e IgG total, en cada grupo, fueron medidos mediante la técnica de inmunodifusión radial (IDR) usando placas calibradas de agar con anticuerpos anti C3 y anti IgG humana (LTA, Italia), según el caso, para capturar y determinar la cantidad de los analitos. Previa obtención de los sueros por centrifugación a 300 x g por 10 min, en una centrifuga Damon/IEC (División, EUA), se agregaron 5 µL de la muestra en cada pozo de la placa de agar para C3 y para IgG, respectivamente. Estas fueron cerradas e incubadas por un periodo de 72 h en cámara húmeda a 25°C. Finalizado este tiempo, se procedió a medir el anillo de difusión de la muestra usando un visor graduado. El diámetro del círculo de difusión, en mm, fue transformado en mg/dL de acuerdo a una curva de referencia del fabricante. Se tomaron como valores normales, en ambas mediciones, los valores obtenidos en el GC (ratones alimentados con la dieta estándar, que nunca consumieron la HL).

### Análisis de los resultados

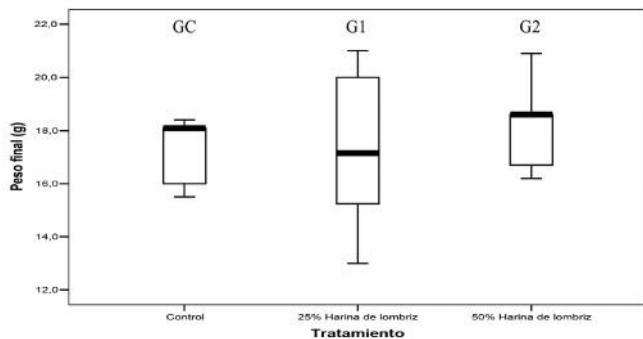
Mediante un análisis de varianza (ANOVA) se compararon los valores séricos de C3 e IgG en los ratones alimentados con las dietas y un valor de P<0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Se efectuó además una *prueba a posteriori* de Duncan [23]. El análisis estadístico de los resultados se efectuó usando el programa SPSS versión 13 [16].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ganancia de peso de los ratones en estudio

Después de alimentar durante 30 d a ratones NMRI con las dietas control y experimentales, no se encontraron diferen-

cias significativas en el peso promedio entre los grupos ( $P > 0,05$ ). Este hallazgo sugiere que las dietas suplementadas con HL aportaron los requerimientos nutricionales necesarios para el desarrollo del animal, de manera similar a la dieta comercial usada (FIG. 1). Esto podría deberse a que la HL de la especie *Eisenia* spp, de acuerdo a algunos análisis físico-químicos tiene una elevada concentración de proteínas y de aminoácidos esenciales, incluso mayor a otras especies de anélidos, favoreciendo así el desarrollo del animal [5, 6, 25]. La nutrición complementada con HL podría resultar útil en la alimentación de roedores, aves, peces, reptiles, anguilas, anfibios, mascotas domésticas y pequeños rumiantes [2, 6, 8, 11, 19, 21, 22]. Como se ha podido evidenciar en el presente estudio, los resultados en la variable peso, en cada tipo de especie alimentada con HL, dependerá de la clase de lombriz usada en la alimentación y del porcentaje de inclusión de su harina en la dieta.



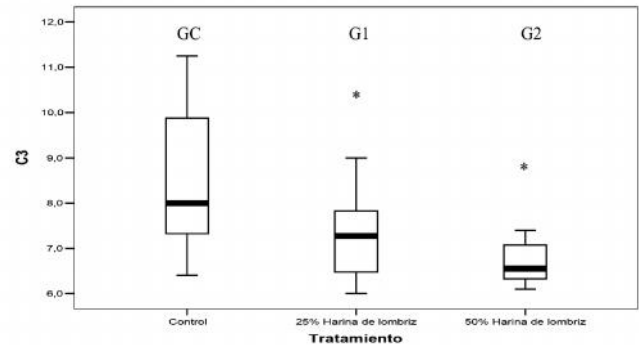
GC: Grupo control; G1: 25% de harina de lombriz; G2: 50% de harina de lombriz

**FIGURA 1. PESO AL FINAL DEL ESTUDIO DE LOS RATONES ALIMENTADOS CON UNA DIETA COMERCIAL (CONTROL) Y DISTINTAS SUSTITUCIONES DE HARINA DE LOMBRIZ (25 Y 50%) DURANTE 30 DÍAS.**

#### Niveles séricos de la proteína C3 en los ratones en estudio

Los niveles séricos de C3 fueron cuantificados mediante la técnica de inmunodifusión radial usando anticuerpos anti C3 humano. Previamente, se realizaron determinaciones de C3 en suero de ratones sanos para demostrar que, dada la homología entre el C3 de ambas especies, el anticuerpo anti-C3 humano captaría la proteína del ratón, como en efecto ocurrió (promedio y desviación estándar de 7,4 y  $\pm 1,1$  mg/dL, respectivamente).

Los niveles de C3 fueron estadísticamente más bajos en los grupos experimentales que en el control, tal como lo muestra la FIG. 2 ( $P < 0,05$ ). Una disminución en los niveles séricos de C3 puede indicar una reducción en la síntesis o un aumento en el consumo y éste último se puede demostrar por un aumento en los fragmentos degradados de C3 como iC3b, C3d y C3f [4, 7]. En este estudio no se cuantificaron los iC3b. Sin embargo, la proteína C3 es un reactante de la fase aguda de la inflamación y la activación de ella y de la vía del complemento induciría alteraciones físicas en el animal (hipomotilidad, taquicardia



GC: Grupo control; G1: 25% de harina de lombriz; G2: 50% de harina de lombriz.

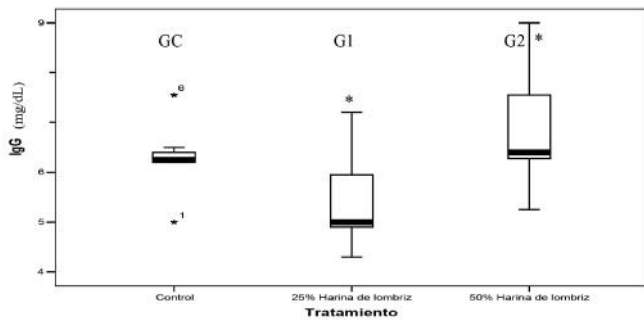
**FIGURA 2. NIVELES DE C3 DE LOS RATONES ALIMENTADOS CON DIETAS CON DIFERENTE CONTENIDO DE HARINA DE LOMBRIZ. \* $P < 0,05$ .**

y fiebre). No se observaron hipomotilidad ni taquicardia en los grupos estudiados, lo cual parece indicar que no hubo activación de la cascada del complemento, y que probablemente la HL indujo una reducción en la síntesis de C3. Otras mediciones serán necesarias para establecer, con certeza, la posible regulación de C3 y otras proteínas de fase aguda inflamatoria por la HL. Se observó una relación inversamente proporcional entre la concentración de C3 en suero y el porcentaje de harina de lombriz suministrada en la dieta (FIG. 2).

#### Niveles séricos de IgG total de los ratones en estudio

Los niveles de IgG total incrementaron significativamente cuando se aumentó el porcentaje de HL en la dieta ( $P < 0,05$ ). Así, los valores de IgG en los ratones alimentados con las dietas que contenían 25% de HL y 50% de HL fueron de 5,4 mgs/dL y 6,9 mgs/dL, respectivamente. Los animales alimentados con la dieta control presentaron valores intermedios de IgG de 6,3 mgs/dL (FIG 3). Este resultado es similar al reportado por Tsai y col. [19]; en el cual los valores de IgG también se elevaron cuando se aumentó el porcentaje de harina de lombriz [19]. Algunas diferencias entre los dos estudios merecen ser señaladas: se usaron diferentes porcentajes de harina de lombriz, el método de cuantificación en uno fue ELISA y en el otro la IDR, en aquel se midió la respuesta IgG antígeno- específica, mientras que en este estudio se midió la concentración de IgG total. Posiblemente, el aumento de la carga antigénica HL fue responsable del incremento dosis-dependiente de los niveles de IgG en los dos estudios.

Se ha reportado que el uso del aceite del fruto del granado (*Punica granatum L*) en la suplementación de dietas para ratones produce un aumento de la IgG e IgM, pero no de la inmunoglobulina A; esto es consecuencia de un incremento en la función de las células B -productoras de anticuerpos- y podría significar una mayor protección del animal [10, 24]. De acuerdo a esto, la HL podría también actuar como un modulador inmunológico, útil para el desarrollo del animal.



GC: Grupo control; G1: 25% de harina de lombriz; G2: 50% de harina de lombriz.

**FIGURA 3. NIVELES DE IgG DE LOS RATONES ALIMENTADOS CON DIETAS CON DIFERENTE CONTENIDO DE HARINA DE LOMBRIZ. \*P<0,05.**

## CONCLUSIONES

En primer lugar, todas las dietas permitieron una ganancia similar de peso en los animales, por lo tanto la HL en esos porcentajes de sustitución, puede ser utilizada. Además, se evidenció que las dietas suplementadas con HL de la especie *Eisenia* spp, disminuyen los niveles séricos del componente C3 del complemento así como incrementan los niveles de inmunoglobulina G y, por ende, la función de los linfocitos B, pudiendo actuar como un eficaz inmodulador frente a procesos inflamatorios. La HL podría ser una fuente segura en la formulación de dietas para animales. Nuevas investigaciones son necesarias, incluyendo otros parámetros (Proteína C reactiva, Amiloide A sérico, entre otros) que complementen los datos en relación con la seguridad alimentaria.

## AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) de la Universidad de Los Andes (Proyecto M-1003-10-03-B).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Official Methods of analysis of the A.O.A.C. 16 Ed. Arlington, VA, USA. Pp 17-43. 1999.

[2] BHORGIN, AJ.; UMA, K. Nutritional Evaluation of Earthworm Powder (*Lampito mauritii*). **J. App. Phar. Sci.** 3 (03):082-084. 2012.

[3] CAYOT, N.; CAYOT, P.; BOU-MAROUN, E.; LABOURE, H.; ABAD-ROMERO, B.; PERNIN, K.; SELLER-ALVAREZ, N.; HERNANDEZ, A.; MARQUEZ, E.; MED-

INA, A. Physico-chemical characterization of a non-conventional food protein source from earthworms and sensory impact in *arepas*. **Int. J. Food. Sci. Tech.** 35(3): 225-234. 2008.

[4] COVA, JA. El sistema de Complemento. 2004. Universidad de Los Andes. Venezuela. En Línea: <http://webdel-profesor.ula.ve/medicina/jacova/docencia/ELCOMPLEMENTO.pdf>. 22/07/13.

[5] COVA, JA.; MEDINA, A.; PETROSIMO, P.; BASTARDO, H.; BIANCHI, G.; RONDON, M.; BORGES, L. Efecto de dietas suplementadas con harina de lombriz (*Eisenia andrei*) en el crecimiento y los parámetros hepáticos de ratones. **Bol. Centro Invest. Biol.** 42 (1): 73-84. 2008.

[6] DEDEKE, G.; OWA, S.; OLURIN, K. Amino acid profile of four earthworms species from Nigeria. **Agric. Biol. J. N. Am.** 1(2):97-102. 2010.

[7] EHRNTHALLER, C.; IGNATIUS, A.; GEBHARD, F.; HUBER-LANG, M. New Insights of an Old Defense System: Structure, Function and Clinical Relevance of the Complement System. The Feinstein Institute for Medical Research. **Mol. Med.** 17 (3-4): 317-329. 2011.

[8] FERRUZZI, C. Comercialización. In: Ferruzzi, C., Buxade, C. (Eds). **Manual de lombricultura**. 1st Ed. Mundi-Prensa, Madrid. Pp 109-117. 1986.

[9] GONZALEZ, L.; MOLINA, J. Evaluación de la inflamación en el laboratorio. **Rev. Colomb. Reumatol.** 17(1):35-47. 2010.

[10] GRDISA, M.; GRSIC, K.; GRDISA, MD. Earthworms –role in soil fertility to the use in medicine and as a food. **ISJ.** 10:38-45. 2013.

[11] HASANUZZAMAN, A.; HOSSIAN, Z.; DAS, M. Nutritional potentiality of earthworm (*Perionyx excavatus*) for substituting fishmeal used in local feed company in Bangladesh. **Mesopot. J. Mar. Sci.** 25 (2): 134 – 139. 2010.

[12] HLEAP, J.; GONZÁLEZ, J.; MORA, M. Evaluación bromatológica, sensorial y microbiológica de salchichas de Tilapia Roja (*Oreochromis* spp.) con adición de harina de lombriz (*Eisenia foetida*). **Vitae.** 19(Supl.1): S210-S212. 2012. 21.

[13] MALET, A.; VALERO, A.; AMAT, P.; LIUCH, M.; SERRA, E. Manual de Alergia Alimentaria para atención primaria. 1995. Centro de Alergia e Inmunología Clínica AL-LERGO CENTRE. España. En Línea: <http://www.sepeap.org/archivos/libros/alergiaalimentaria/alergiaalimentaria.htm>. 18/07/13.

[14] NOVA, E.; MONTERO, A.; GÓMEZ, S.; MARCOS, A. La estrecha relación entre la nutrición y el sistema inmunario. 2013. Sociedad Española de Oncología Médica. España. En Línea: [237](http://www.seom.org/seomcms/ima-</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

- ges/stories/recursos/infopublico/publicaciones/soporte-Nutricional/pdf/cap\_01.pdf. 14/07/13.
- [15] PENNACCHIOTTI, I. Las proteínas: generalidades y su importancia en nutrición y en la industria de alimentos. 1998. Universidad de Chile. En línea: [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmacuticas/penacchiotii01/capitulo07/01.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmacuticas/penacchiotii01/capitulo07/01.html). 22/03/14.
- [16] STATISTICAL PACKAGE FOR THE SOCIAL SCIENCES (SPSS) Inc. Guía breve de SPSS. 2006. SPSS Inc. EUA. En línea: [http://www.um.es/ae/soloumu/pdfs/pdfs\\_manuales\\_spss/SPSS%20Brief%20Guide%2015.0.pdf](http://www.um.es/ae/soloumu/pdfs/pdfs_manuales_spss/SPSS%20Brief%20Guide%2015.0.pdf). 22/02/13.
- [17] STAFFORD, E.; TACON, A. The nutritional evaluation of dried earthworm meal (*Eisenia foetida*, Savigny, 1828) included at low levels in production diets for rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Aquacult. Fish. Manag.** 16:213-222. 1985.
- [18] TABOGA, L. The nutritional value of earthworms for chickens. **Br. Poul. Sci. Abington.** 21(5):405-410.1980.
- [19] TSAI, G.; BORGES, L.; PETROSINO, P.; BIANCHI, G.; MEDINA, A.; COVA, JA. Efectos del uso de la harina de lombriz *Eisenia* spp. sobre la respuesta inmune humoral específica y presencia de lesiones intestinales en ratones. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XXI (4): 298-304. 2011.
- [20] VELÁSQUEZ, L.; HERRERA, C.; IBÁÑEZ, I. Harina de lombriz I parte: Obtención, composición química, valor nutricional y calidad bacteriológica. **Aliment.** 11 (1): 15-21. 1986.
- [21] VIELMA, R.; OVALLES, JF.; LEÓN, L.; MEDINA, A. Nutritional value of earthworm flour (*Eisenia foetida*) as a source of amino acids and its quantitative estimation through reversed phase Chromatography (HPLC) and pre-column derivation with o phthalaldehyde (OPA). **Ars. Pharm.** 44 (1): 43-58. 2003.
- [22] VIELMA-RONDÓN, R.; CARRERA, P.; RONDÓN, C.; MEDINA, A. Contenido de minerales y elementos traza en harina de lombriz californiana *Eisenia foetida*. **Proc. LI Convención Anual de ASOVAC.** San Cristóbal, 11/18-23, Venezuela. 18 pp. 2001.
- [23] WONG-GONZALEZ, E. Después de una análisis de Variancia ...que? Ejemplos en Ciencia de Alimentos. **Agro. Meso.** 21:01-08. 2010.
- [24] YAMASAKI, M.; KITAGAWA, T.; KOYANAGI, N.; CHUJO, H.; MAEDA, H.; KOHNO-MURASE, J.; IMAMURA, J.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. **Nutrit.** 22(1):54-59. 2006.
- [25] ZHENJUN, S.; XIANCHUN, L.; LIHUI, S.; CHUNYANG, S. Earthworm as a potential protein resource. **Ecol. Food. Nutr.** 36:221-236. 1997.