

Estudio preliminar de los niveles de ácidos grasos de la harina de lombriz (*Eisenia foetida*) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

ROSA ALBA VIELMA RONDÓN¹, ALFREDO USUBILLAGA,² Y ANA LUISA MEDINA G.^{1,3}

¹ Dpto. de Ciencias de los Alimentos. ² Instituto de Investigaciones. Facultad de Farmacia.

³ Laboratorio FIRP. Facultad de Ingeniería. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

E-mail: rosavvefr@yahoo.com.

RESUMEN

Las lombrices terrestres (*Eisenia foetida*), son de interés nutricional ya que son una fuente rica en proteínas (> 60% p/p, base seca), minerales y ácidos grasos. El objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de ácidos grasos en muestras de lombrices convertidas previamente en harina. La composición de ácidos grasos fue determinada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas previa esterificación de los mismos. La harina de lombriz se caracterizó por presentar algunos ácidos grasos tales como el linoleico y araquidónico conocidos como ω -6, los cuales son esenciales en la nutrición humana. La lombriz roja californiana podría contribuir a solucionar los problemas nutricionales y ecológicos de algunos países en vías de desarrollo.

ABSTRACT

The earthworms (*Eisenia foetida*) are of nutritional interest since they are a rich source of proteins (> 60% w/w), minerals and fatty acids. The aim of this work was to determine the content of fatty acids in samples of flour obtained from *Eisenia foetida*. The fatty acid composition was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The earthworm flour was found to contain linoleic and arachidonic acids, known as ω -6 acids, which are essential to human nutrition. Red californian earthworms could contribute to solve the nutritional and ecological problems in some developing countries.

PALABRAS CLAVE

Lombriz de tierra, *Eisenia foetida*, ácidos grasos, cromatografía de gases.

AGRADECIMIENTO

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT), Venezuela por beca a R. A. V. R 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. Al Ingeniero Juan Carmona y demás miembros del personal del herbario MERF "Dr. Luis Ruiz Terán" de la Facultad de Farmacia de la ULA.

INTRODUCCIÓN

La lombricultura ha despertado en los últimos años una gran atención por su repercusión en el ámbito nutricional y ecológico. Esta biotecnología utiliza la lombriz roja californiana *Eisenia foetida* como una alternativa de reciclaje de desechos orgánicos de diferentes orígenes y como una fuente no convencional de proteínas y otros nutrientes a bajo costo (Velásquez et al. 1986 I parte; Medina y Araque, 1999).

La harina de lombriz, además de contener aminoácidos esenciales (Velásquez et al. 1986 II parte; Salazar y Rojas, 1992; Vielma et al. 2003) y minerales (Vielma et al. 2001) también contiene ácidos grasos esenciales en la nutrición humana. La composición de ácidos grasos en la lombriz *Eisenia foetida*, fue estudiada por Tacon et al. (1983), Velásquez et al. (1986 II parte) y Salazar y Rojas (1992) reportando la presencia de ácido linoleico y linolénico.

Estos antecedentes indican la importancia de estudiar los niveles de ácidos grasos en la harina de lombriz *Eisenia foetida*, criada bajo las condiciones claramente establecidas. Es de resaltar que, este recurso no convencional se podría utilizar como una alternativa nutricional, dado que contiene los nutrientes esenciales para la alimentación humana así como para la

formulación de alimentos balanceados para animales, especialmente los peces de agua fría.

Uno de los problemas principales que no han permitido su utilización oficial en el campo alimenticio humano es el prejuicio cultural y la falta de información de los beneficios que presenta esta lombriz. Sin embargo, en algunos países orientales como China y Japón se ha incorporado este recurso nutritivo al consumo humano (Velásquez et al. 1986 I parte). El Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes, está estudiando la factibilidad de incluir este alimento no convencional en algunos programas dependientes del IAAEM (Instituto Autónomo de Alimentación y Nutrición del Estado Mérida) tales como comedores escolares, meriendas etc. Estas son las razones que motivaron la realización de este estudio.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la composición de ácidos grasos de la harina de lombriz, utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Cabe señalar que debido a la importancia nutricional que podría representar este alimento no tradicional, deberá ser considerado como un recurso biotecnológico de gran utilidad en un futuro cercano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Muestras de lombrices: Las muestras fueron obtenidas 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 (Lombricultivo del herbario "Luis Ruiz Terán" de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela). Las lombrices fueron alimentadas a base de un compostaje de desechos orgánicos obtenidos de la cocina 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. No se utilizó los residuos de los platos a fin evitar cualquier contaminación de origen humano.

Pre-Tratamiento de las muestras

Muestra de harina de lombriz obtenida por liofilización (HL): Las lombrices (n = 300) se lavaron profusamente y luego se conservaron durante 24 horas en un recipiente contentivo de agua e insuflación de aire (Velásquez et al. 1986 I parte). Finalizado este proceso, las lombrices fueron lavadas, congeladas (nitrógeno líquido) y colocadas en un liofilizador a -40°C durante 24 horas. Finalmente se sometieron a una molienda hasta el grado de un producto harinoso (Vielma et al. 2003) con

humedad del 11,6 % (Vielma, 2003).

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

Se siguió la misma metodología descrita para obtener HL hasta el proceso de insuflación de aire. Las lombrices previamente lavadas, fueron sometidas a un shock osmótico con una solución de cloruro de sodio al 4% (Velásquez et al. 1986 I parte). Después del beneficio se lavaron con abundante agua para eliminar la sal y luego se colocaron en una estufa a 60°C durante 9 horas. Finalmente se aplicó el mismo proceso de molienda y se le determinó la humedad, la cual fue de 13,5 % (Vielma, 2003).

Los dos métodos de obtención de la harina (HL y HSE) propuestos no presentaron diferencias en cuanto a la composición y porcentajes de ácidos grasos por lo que se limitó a presentar ambos resultados.

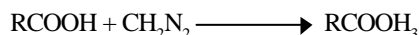
Desgrasado de las muestras: Se pesaron por duplicado 3 gramos de HL y 3 gramos de HSE, luego la harina fue desgrasada por el método de Soxhlet (AOAC, 1986). La grasa obtenida se diluyó en 10 mL de éter de petróleo y se transfirió a un frasco color ámbar de 25 mL de capacidad.

Análisis e identificación de los ácidos grasos

Reactivos: Éter de petróleo Riedel-de Haën extra puro 24004. Éter etílico Riedel-de Haën extra puro 24587. Heptano HPLC Mallinckrodt 5139. Ester etílico del ácido palmítico (patrón interno) Alltech N° 0355.

Equipos: Cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard modelo 6890 Plus equipado con detector selectivo de masas modelo HP-5973. Se utilizó una columna cromatográfica Hewlett Packard de 30 metros de largo, 0,25 mm de diámetro y 0,25 m de espesor de película. Para la identificación de los ácidos grasos de las muestras de harina de lombriz, se utilizó la base de datos Wiley (6ª Ed.).

Derivatización: Debido a su baja volatilidad, los ácidos grasos, se convirtieron previamente en sus ésteres metílicos a través de una reacción de esterificación con diazometano (Blatt, 1957) que se detalla a continuación:



Reacción de esterificación del ácido graso con diazometano (March, 1977).

Para ello se colocaron 500 mL de la grasa diluida en éter de petróleo en un erlenmeyer de 50 mL de capacidad previamente pesado, se les agregó 17 mL de solución de diazometano y se tapó la boca del erlenmeyer con un trozo de papel de aluminio provisto de algunos orificios para facilitar la volatilización del

éter etílico. Posteriormente la reacción se dejó transcurrir durante 24 horas a temperatura ambiente y los ácidos grasos esterificados se obtuvieron por diferencia de peso.

Es importante señalar, que la metilación anteriormente descrita fue elegida, debido a que se ensayó el método de esterificación de Beschart et al. (1975) y los resultados obtenidos fueron infructuosos por lo que se utilizó el método de esterificación con diazometano (Viloria, 1997).

Preparación de la solución patrón: Se transfirieron 100 mg de patrón del éster etílico del ácido palmítico a un vial de 5 mL de capacidad y se le agregaron 2 mL de heptano grado HPLC. La concentración final del patrón fue estimada en 50 mg/mL (Eltre, 1973). La adición de este patrón interno a las muestras de harinas de lombriz permitió la cuantificación de los ácidos grasos. Este compuesto se encontraba ausente de la mezcla problema y su pico estaba completamente resuelto con relación a los ácidos grasos de las muestras.

Preparación de la muestra derivatizada a analizar: Los ácidos grasos esterificados fueron disueltos en 4 mL de heptano grado HPLC y finalmente se les adicionó 10 mL de la solución patrón. 1 mL de esta mezcla se transfirió a un vial de 2 mL de capacidad y se colocó en el bloque de inyección del cromatógrafo para el análisis correspondiente.

Condiciones cromatográficas: Gas portador: He; Velocidad de flujo: 0,9 mL/min; Inyección: 1.0 mL. Modo Split: 1:100; Temperatura del inyector: 200 °C; Programación de temperatura del horno: temperatura inicial: 250 °C, aumento de temperatura 5 °C/min hasta 275 °C; Temperatura de la Interfase: 250 °C; Modo Scan de barrido: cromatograma de iones totales; Voltaje: 70 EV (electrón voltios); Tiempo de análisis: 32 minutos. Las condiciones de operación del GC-MS se mantuvieron constantes para todas las corridas cromatográficas.

Cuantificación de los ácidos grasos en las muestras de harina de lombriz: Los ácidos grasos fueron cuantificados tomando en consideración el porcentaje de área de cada ácido graso presente en la muestra y el porcentaje de área del patrón interno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras de harinas de lombriz *Eisenia foetida* obtenidas por liofilización (HL) y secado en estufa (HSE), se caracterizaron por presentar dieciséis ácidos grasos los cuales fueron identificados por

cromatografía de gases, mediante comparación de sus espectros de masas con los espectros de la librería Wiley (6ª Ed.) (Fig. 1 y 2). Sin embargo, sólo diez ácidos grasos fueron cuantificados (Tabla 1), ya que los demás ácidos estaban presentes en cantidades muy pequeñas lo que no permitió su cuantificación a pesar de que el ensayo se realizó tres veces. La resolución obtenida para algunos de estos ácidos grasos esterificados fue satisfactoria. Los ácidos grasos undecílico, pentadecílico, undecenoico, palmitoleico, ecosatrienoico y araquidónico fueron identificados pero no cuantificados. El contenido de ácido láurico, tridecílico, mirístico se aproxima a los valores reportados por Velásquez et al (1986 II parte), sin embargo otros ácidos tales como el ácido palmítico, esteárico, oleico, eicosenoico y linoleico resultaron bajos si se comparan con los reportados por dicho autor. Igualmente, estos resultados no concuerdan con los valores reportados por Salazar y Rojas (1992) y Tacon et al (1983) (Tabla 2).

Es importante resaltar, que se logró identificar el ácido araquidónico conocido como ω -6, el cual es considerado un ácido graso esencial porque el doble enlace ubicado en el carbono 6 del metilo terminal es una posición estratégica para la actividad de algunas enzimas (Delfino y Sarno, 2002). Este ácido no ha sido identificado en este tipo de muestras por los investigadores señalados anteriormente.

La composición de los ácidos grasos totales en términos porcentuales tanto para la HL y HSE fue: saturados (5,11 y 5,11); monoinsaturados (2,80 y 3,14); polinsaturados (0,93 y 0,92).

Por otra parte, el contenido de ácido mirístico, estearico, eicosenoico y linoleico fue mayor que el encontrado en alimentos tradicionales tales como pescado azul y carne. Para otros ácidos como el palmítico, el contenido fue más alto que lo reportado para el pescado azul (Tabla 2).

Aunque la harina de lombriz liofilizada (HL) y secada en estufa (HSE) aporta baja cantidad del ácido linoleico (0,93 y 0,92 % respectivamente), este recurso no convencional resulta muy interesante para la formulación de alimentos no tradicionales, dado que el ácido linoleico junto con el ácido araquidónico son importantes en la nutrición humana y deben ser incluidos en la dieta.

Debido a la presencia de ácidos grasos insaturados se recomienda el uso de antioxidantes en la preparación de la harina de lombriz *Eisenia foetida*, para preservar sus cualidades y evitar el enranciamiento. Este hecho también explica el olor característico de este tipo de harina (Velásquez et al. 1986 II).

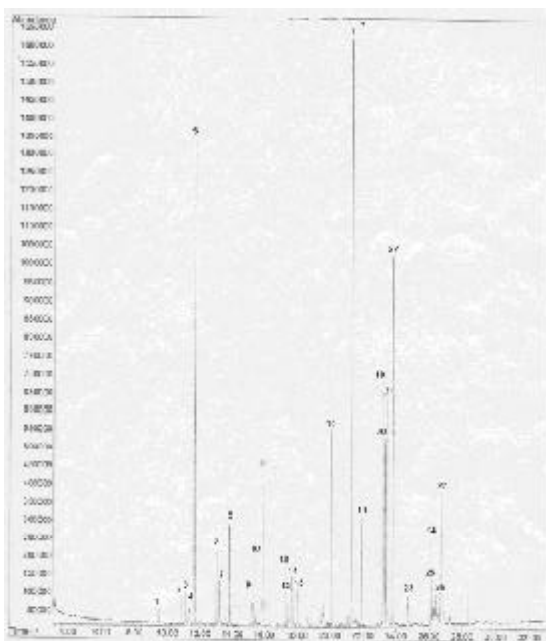


Figura 1. Cromatograma (CG-MS) representativo de los ácidos grasos metilados con diazometano de una muestra de harina de lombriz *Eisenia foetida* (HL)

Identificación: 1-2 = NI; éster del: 3 = ac. undecenoico; 4 = NI; 5 = ac. laurico; 6 = NI; 7 = ac. undecanoico; 8 = ac. tridecílico; 9-10 = NI; 11 = ac. mirístico; 12 = ac. pentadecanoico; 13=NI; 14 = NI; 15=ac. palmitoleico 16=ac. palmítico; 17= éster etílico del ácido palmítico (patrón); 18= ac. margárico; 19 = ac. linoleico; 20 = ac. oleico; 21 = ac. eláidico; 22 = ac. estearico; 23 = NI; 24 = ac. araquidónico; 25 = NI; 26 = ac. eicosatrienoico; 27 = ac. 11-eicosenoico.

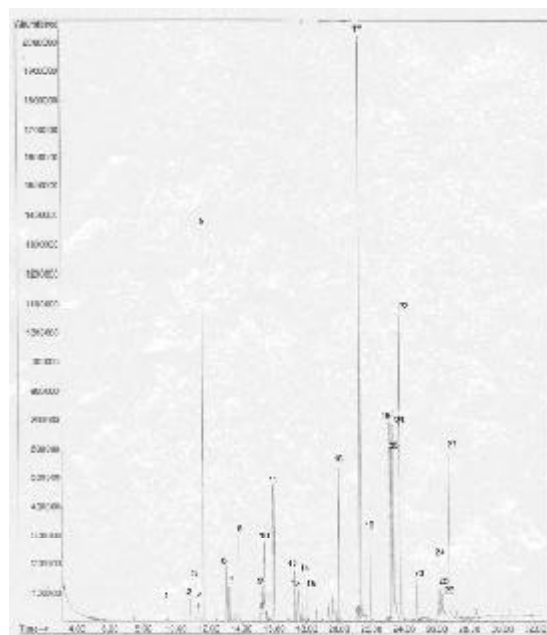


Figura 2. Cromatograma (CG-MS) representativo de los ácidos grasos metilados con diazometano de una muestra de harina de lombriz *Eisenia foetida* (HSE)

Identificación: 1-2 = NI; éster del: 3 = ac. undecenoico; 5 = ac. laurico; 6 = NI; 7 = ac. undecanoico; 8 = ac. tridecílico; 9-10 = NI; 11 = ac. mirístico; 12 = ac. pentadecanoico; 13=NI; 15=ac. palmitoleico 16=ac. palmítico; 17= éster etílico del ácido palmítico (patrón); 18= ac. margárico; 19 = ac. linoleico; 20 = ac. oleico; 21 = ac. eláidico; 22 = ac. estearico; 23 = NI; 24 = ac. araquidónico; 25 = NI; 26 = ac. eicosatrienoico; 27 = ac. 11-eicosenoico.

Tabla 1. Contenido de ácidos grasos en la harina de lombriz obtenidos por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

Harina de lombriz (g/100 g)		
Ácido graso	HL	HSE
Saturados		
Undecílico (C11:0)	NC	NC
Laurico (C12:0)	1,58 ± 0,06	1,62 ± 0,05
Tridecílico (C13:0)	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,01
Mirístico (C14:0)	0,55 ± 0,02	0,58 ± 0,02
Pentadecílico (C15:0)	NC	NC
Palmitico (C16:0)	0,72 ± 0,02	0,70 ± 0,03
Margárico (C17:0)	0,45 ± 0,02	0,41 ± 0,01
Estearico (C18:0)	1,44 ± 0,06	1,43 ± 0,04
Total de saturados	5,11	5,11
Monoinsaturados		
Undecenoico (C11:1)	NC	NC
Palmitoleico (C16:1)	NC	NC
Oleico (C18:1)	0,98 ± 0,03	0,98 ± 0,03
Eláidico (C18:1)*	0,84 ± 0,03	0,89 ± 0,04
Gadoleico (C20:1)	0,94 ± 0,03	1,27 ± 0,04
Total de monosaturados	2,80	3,14
Polinsaturados		
Linoleico (C18:2) ¹	0,93 ± 0,03	0,92 ± 0,04
Eicosatrienoico (C20:3)	NC	NC
Araquidónico (C20:4) ¹	NC	NC
Total de polinsaturados	0,93	0,92

Nota: Todos los dobles enlaces de los ácidos grasos están en configuración cis excepto el ácido eláidico* que es trans. ¹Ácidos grasos esenciales. NC: no cuantificados

Tabla 2. Cuadro comparativo de ácidos grasos obtenidos de diferentes fuentes

Ácido graso	Contenido de ácidos grasos (g/100 g)					
	Harina de lombriz ^a	Harina de lombriz ^b	Harina de lombriz ^c	Lombriz <i>Eisenia foetida</i> ^d	Pescado azul ^e	Carne ^e
Saturados						
Caproico (C6:0)	---	1,74	---	---	---	---
Cáprico (C10:0)	---	0,49	---	---	---	---
Undecílico (C11:0)	NC	0,61	---	7,87	---	---
Laurico (C12:0)	1,58 / 1,62	2,10	14,50	11,88	---	---
Tridecílico (C13:0)	0,37 / 0,37	0,67	---	2,70	---	---
Mirístico (C14:0)	0,55 / 0,58	1,04	14,50	2,63	0,064	0,17
Pentadecílico (C15:0)	NC	3,33	---	1,21	---	---
Palmitico (C16:0)	0,72 / 0,70	3,95	13,70	5,07	0,491	1,42
Margárico (C17:0)	0,45 / 0,41	---	---	2,29	---	---
Esteárico (C18:0)	1,44 / 1,43	6,74	34,40	7,36	0,151	0,74
Total de saturados	5,11/5,11	20,67	77,1	41,01	0,706	2,33
Monoinsaturados						
Undecenoico (C11:1)	NC	---	---	---	---	---
Miristoleico (C14:1)	---	---	0,90	4,81	---	---
Palmitoleico (C16:1)	NC	4,07	0,90	---	0,166	0,24
Oleico (C18:1)	0,98 / 0,98	9,18	4,70	10,62	0,346	2,40
Eláidico (C18:1)*	0,84 / 0,89	---	---	---	---	---
Eicosenoico (C20:1)	0,94 / 1,27	24,52	5,30	---	0,035	---
Cetoleico (C22:1)	---	6,54	---	---	---	---
Nervónico (C24:1)	---	0,43	---	---	---	---
Total de Monoinsaturados	2,76/3,14	44,74	11,80	15,43	0,547	2,64
Polinsaturados						
Linoleico (C18:2)	0,93 / 0,92	4,07	4,60	6,44	0,039	0,20
Linolénico (C18:3)	---	---	6,20	---	---	0,01
Eicosadienoico (C20:2)	---	1,24	---	---	---	---
Eicosatrienoico (C20:3)	---	3,13	---	---	---	---
Araquidónico (C20:4) ¹	NC	---	---	---	0,033	0,03
Eicosapentaenoico (C20:5)	---	12,54	---	---	0,083	---
Docosadienoico (C22:2)	---	1,15	---	---	---	---
Docosapentaenoico (C25:2)	---	0,21	---	---	---	---
Total de polinsaturados	0,93 / 0,92	22,34	10,80	6,44	0,155	0,24

a: HL/HSE; b: Velásquez et al (1986 II); c: Salazar y Rojas (1992); d: Tacon et al (1983) e: Ching (1992)

CONCLUSIONES

1.- El método analítico utilizado (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas) se podría considerar como una herramienta útil para el análisis de ácidos grasos en muestras de harinas de lombriz (*Eisenia foetida*), ya que esta técnica no ha sido usada con este fin en este tipo de matriz. Sin embargo se recomienda continuar este estudio para mejorar los resultados en términos de cuantificación.

2.- La harina de lombriz constituye una fuente no convencional importante de ácidos grasos esenciales (ácido linoleico y araquidónico), por lo que debería considerarse como una alternativa nutricional en el campo alimenticio humano sobre todo en las poblaciones menos favorecidas.

3.- Los resultados obtenidos en esta investigación conjuntamente con los derivados de los mismos autores en trabajos previos sobre el contenido de minerales y aminoácidos junto con la calidad

bacteriológica, permiten inferir que la harina de lombriz *Eisenia foetida* podría contribuir a solucionar unos de los problemas nutricionales existentes en el país.

4.- Utilizando este recurso no convencional, se abre un interesante campo de investigación en lo que se refiere al enriquecimiento de alimentos con este tipo de harina no tradicional.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AOAC. 1986. **Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists.** Arlington. Virginia. USA. XXIV Ed.

Beschart, A.A., Saunders, R.M., Mon, T.R. y Kohler, G.O. 1975. **Variations in the fatty acid composition of stored wheat protein concentrates prepared by wet and dry milling.** Cereal Chemistry. Vol. 52 (4): 439-450.

Blatt, A.H. 1957. **Synthesis Organic.** Vol. II. Editorial John Wiley & SONS, INC, New-York. USA. P. 165-654.

Ching, C. 1992. **Fatty Acids in Foods and their health implications.** University of Kentucky, Lexington, Kentucky. Editorial Board. New York. Basel. P. 73-74.

March, J. 1977. **Advanced Organic Chemistry.** McGraw-Hill Book Company. New-York. USA. 2da Ed. P. 369.

Delfino, M. y Sarno, M. 2002. **Perfil de ácidos grasos de algunos alimentos autóctonos de origen animal.** Cátedra de Análisis instrumental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UNNE., en: <http://www.unne.edu.ar/cyt/exactas/e-044.pdf>

Eltre, L.S. 1973. **Practical Gas Chromatography,** Perkin Elmer Corp. Norrodk, USA.

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. Venezuela). Vol. 37. 31-38.

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.

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, Ibáñez I. 1986. **Harina de lombriz. I Parte: Obtención, composición química, valor nutricional y calidad bacteriológica.** Alimentos. Vol. 11 (1): 15-21.

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

Vielma R, Carrero P, Rondón C, Medina A. 2001. **Contenido de minerales y elementos trazas en la harina de lombriz californiana (*Eisenia foetida*).** LI Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia (AsoVAC). Nov 16-21. Universidad Nacional Experimental del Táchira. Táchira. Venezuela.

Vielma, R., Ovalles, J. León, A. y 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. Vol. 44 (1): 43-48.

Vielma, R. 2003. **Estudio físico-químico y funcional de las proteínas de la lombriz *Eisenia foetida*.** Datos no publicados.

Viloria, E., Rojas, L. y Usubillaga, A. 1997. **Analysis of Kameric Acid Methyl Esters by Gas Chromatography.** Journal of High Resolution Chromatography. Vol. 20, 50-51.