

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)

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)

VIELMA-RONDÓN R¹, OVALLES-DURÁN JF², LEÓN-LEAL A² Y MEDINA A¹

¹ Dpto. de Ciencias de los Alimentos. ² Dpto. de Análisis y Control. Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes. Mérida 2P 5101. República Bolivariana de Venezuela. E-mail: rosavvefr@yahoo.com.

RESUMEN

Las lombrices terrestres del género *Eisenia foetida*, son de interés nutricional ya que son una fuente rica en proteínas (> 60% p/p, base seca). El objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de aminoácidos proteicos en muestras de lombrices convertidas previamente en harina. La determinación analítica requirió el diseño y validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa y derivatización precolumna con o-ftalaldehído. El método resultó ser preciso, lineal y reproducible con una exactitud satisfactoria, en el intervalo de concentración ensayado (2 – 32 µM). La harina de lombriz se caracterizó por un contenido representativo de algunos aminoácidos esenciales, tales como: fenilalanina, leucina, lisina, isoleucina, metionina y valina (> 3% p/p). La lombriz roja californiana podría constituir una solución a los problemas nutricionales y ecológicos de algunos países en vías de desarrollo. Los resultados obtenidos concuerdan significativamente con los reportados por otros autores, razón por la cual se propone el método analítico descrito.

PALABRAS CLAVE: Lombriz de tierra. *Eisenia foetida*. Aminoácidos. Cromatografía líquida. CLAR. O-ftalaldehído. OPA.

ABSTRACT

Earthworms (Eisenia foetida) are of nutritional interest since they are a rich source of protein (> 60% w/w). The aim of this work was to determine amino acid content in proteins from samples of earthworm flour. The amino acids were separated by reversed phase high performance liquid chromatography and detected through molecular fluorescence subsequent to derivatization with o-phthalaldehyde. The accuracy and precision of the method developed were satisfactory, and a linear response within the concentration range of 2 - 32 µM was observed. The earthworm flour was characterized by evaluating the content of some essential amino acids, such as: phenylalanine, leucine, lysine, isoleucine, methionine and valine (> 3% w/w). The findings from this work are in agreement with those from earlier studies indicating that the analytical method described in this paper may be adopted for amino acid analysis of earthworm flour samples. This species could provide an answer to the nutritional and ecological problems of some developing countries.

KEY WORDS: Earthworm. *Eisenia foetida*. Amino acids. HPLC. O-phthalaldehyde (OPA).

INTRODUCCIÓN

Actualmente se reconoce que la lombricultura es un recurso biotecnológico de elevado interés ecológico y nutricional. Esta biotecnología utiliza una especie de lombriz domesticada denominada *Eisenia foetida* (Lumbricidae), con dos objetivos principales, primero como una alternativa de reciclaje de desechos orgánicos de diferentes fuentes, y segundo como una fuente de proteína no convencional de bajo costo. La harina de lombriz se caracteriza por un elevado contenido de proteínas (> 60% p/p, base seca) de interés nutricional ya que proporciona aminoácidos esenciales para la dieta humana¹. La obtención a un bajo costo de la harina de lombriz rica en proteínas se debe a que las lombrices se alimentan de desechos orgánicos, crecen a una alta velocidad y se multiplican rápidamente. Es importante resaltar, que el prejuicio cultural y la falta de información de los beneficios que presenta esta lombriz, son los que no han permitido su utilización oficial en el campo alimenticio humano. Sin embargo, algunos países orientales tales como China, Japón, Filipinas, Taiwán, etc., la han incorporado al consumo humano¹. De la lombriz roja californiana, no sólo se obtiene carne rica en proteínas, sino también los aminoácidos esenciales, entre ellos es importante mencionar a la lisina, aminoácido que suele estar ausente en los alimentos básicos². El contenido de este aminoácido en la harina de lombriz es significativo (5,9% p/p), ya que satisface los requerimientos para niños entre 2-5 años exigidos por la FAO/OMS³.

El Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes de Venezuela, está estudiando la factibilidad de incluir este alimento no convencional en los comedores escolares y universitarios, razón por la cual se emprendió un estudio preliminar para determinar el contenido de proteínas y aminoácidos de la harina de lombriz obtenida a partir de un lombricultivo de la región. Por otra parte la Universidad de Los Andes intenta demostrar que sí es posible solucionar el problema de la disposición final de la basura orgánica, convirtiéndola en algo útil para la agricultura⁴, a través de la Estación piloto de Compostaje y Lombricultura para el Manejo Integral de los Desechos (Ciulamide).

INTRODUCTION

Earthworm culturing is currently a recognised biotechnological source of ecological and nutritional interest. This form of biotechnology uses a species of domesticated earthworm known as *Eisenia foetida* (Lumbricidae), with two main objectives, firstly as an alternative to the recycling of organic waste products from differing sources, and secondly as a source of low cost, unconventional protein. Earthworm flour is characterised by its high content in proteins (> 60% w/w, dry base). It is of nutritional interest due to the essential amino acids that it provides for the human diet¹. Protein rich earthworm flour can be produced at a low cost, given that earthworms are fed from organic waste, and grow and multiply at a rapid rate. It is important to point out that it is cultural prejudice and a general unawareness of the benefits that this earthworm may provide that have prevented their official use in human diet. However, in some Asian countries such as China, Japan, the Philippines, Taiwan, etc., these worms are consumed by humans¹. From Californian red earthworms, not only is it possible to obtain a protein rich source of meat, but also a source of essential amino acids, among which lysine should be mentioned, given that this amino acid is often absent in basic foodstuffs². The content of this amino acid in earthworm flour is significant (5.9% w/w), representing according to WHO/FAO, the daily requirement for children between two and five³.

The Department of Foodstuff Sciences at the Faculty of Pharmacy, University of the Andes of Venezuela, is studying the feasibility of including this non-conventional foodstuff in school and university canteens. For this reason a preliminary study was carried out in order to determine the protein and amino acid content of earthworm flour obtained from a culture in the region. Additionally, the University of the Andes has made an attempt to demonstrate that it is indeed possible to solve organic rubbish disposal problems by transforming this waste into a useful product for agricultural purposes in accordance⁴. The work was carried out at a pilot compost and earthworm culturing station for the management of waste products (Ciulamide).

The objective of the present work is to apply High resolution liquid chromatography (reversed phase HPLC), pre-column derivatization with

El objetivo del presente trabajo es aplicar la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR, en fase reversa) y la derivatización precolumna con orto-ftalaldehído (OPA) seguida de detección fluorescente, a la determinación de los niveles de aminoácidos proteicos en harina de lombriz (*Eisenia foetida*). Aunado a la optimización y aplicabilidad del método se exponen algunos argumentos relacionados con la utilidad de la harina de lombriz como un recurso nutricional no convencional.

MATERIAL Y MÉTODOS

REACTIVOS: Agente derivatizante o-ftalaldehído (OPA), especialmente formulado para usar sin preparación previa (contiene Brij 35, metanol, 2-mercaptoetanol, hidróxido de potasio y ácido bórico, pH 10,4) lote N° P-0532 (Sigma, St. Louis, MO, EE UU). 2-mercaptoetanol, M-6250 (Sigma, St. Louis, MO, EE UU). Solución estándar de aminoácidos y aminoácidos individuales (Sigma, St. Louis, MO, EE UU). Reactivos secundarios (Riedel-deHaën, Alemania). Metanol grado HPLC (Mallinckrodt, St. Louis, MO, EE UU). Agua destilada Milli-Q.

EQUIPOS: Cromatógrafo para fase líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de fluorescencia modelo 470 (Water, EE UU). Columna cromatográfica de 100 x 4,6 mm, Adsorbosphere OPA-SH, 5 μ , Lote N° 2521 (Alltech Associates Inc, EE UU). Columna C18, Bondapak TM 3,9 μ x 300 mm (Water P/N 27324). Liofilizador (Labconco, EE UU).

MUESTRAS: Muestra de lombrices sin tratamiento: 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 (Lombri-cultivo 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 del comedor universitario de la región. A este compostaje se le controló la temperatura, humedad y pH, para garantizar el óptimo crecimiento de las lombrices. **Muestra de harina de lombriz obtenida por liofilización (HL):** Las lombrices (n = 300)

orto-phthalaldehyde (OPA), followed by fluorescent detection, and the determination of amino acid protein levels in earthworm (*Eisenia foetida*) flour. After combining the optimisation and applicability of the method, the utility of earthworm flour as a non-conventional source of nutrition is discussed.

MATERIALS AND METHODS

REAGENTS: The derivatizing agent o-phthalaldehyde (OPA) was specially formulated to be used without previous preparation (containing Brij 35, methanol, 2-mercapthoethanol, potassium hydroxide and boric acid, pH 10.4) batch N° P-0532 (Sigma, St. Louis, MO, USA). 2-mercapthoethanol, M-6250 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Standard amino acid solution and individual amino acids (Sigma, St. Louis, MO, USA). Secondary reagents (Riedel-deHaën, Germany). Methanol HPLC grade (Mallinckrodt, St. Louis, MO, USA). Distilled water Milli-Q.

EQUIPMENT: High performance liquid Chromatograph (HPLC) with fluorescence detector, model 470 (Water, USA). Chromatographic column 100 x 4,6 mm, Adsorbosphere OPA-SH, 5 μ , batch N° 2521 (Alltech Associates Inc, USA). Column C18, Bondapak TM 3,9 μ x 300 mm (Water P/N 27324). Lyophilizer (Labconco USA).

SAMPLES: Untreated earthworm sample: The samples were obtained from the species *Eisenia foetida* at an adult stage of development (3 months), with an average length and weight of 8.5 cm and 0.45 grms respectively, (earthworm cultures from "Luis Ruiz Terán" Herbarium at the Faculty of Pharmacy, University of the Andes, Mérida-Venezuela). The earthworms were fed on a diet of organic waste compost, obtained from a university canteen in the region. In order to guarantee optimum growth conditions, the temperature, moisture and pH of the compost were kept under control. **Samples of the earthworm flour obtained from lyophilization (FL):** The earthworms (n=300) were thoroughly washed and were subsequently stored for 24 hours in an air insufflated water container. On completing this process, the worms were frozen (liquid nitrogen) and lyophilised, degreased using the Soxhlet method⁵, and finally ground to a

se lavaron profusamente y luego se conservaron durante 24 horas en un recipiente contentivo de agua e insuflación de aire. Finalizado este proceso, se congelaron (nitrógeno líquido) y se colocaron en un liofilizador. Después se desgrasaron por el método de Soxhlet⁵ y finalmente 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 HL hasta el proceso de insuflación de aire. Las lombrices previamente lavadas, fueron tratadas con una solución de cloruro de sodio al 4%¹. Después del beneficio se lavaron con abundante agua hasta eliminar totalmente la sal y luego se colocaron en una estufa a 60°C durante 9 horas. Finalmente se aplicó el mismo proceso de desgrasado y molienda. **Muestras de hidrolizados proteicos:** Se pesó por duplicado 0,0200 g de HL y 0,0202 g de HSE. Cada una de las muestras se transfirió a una ampolla (de color ámbar) junto con 2 mL de ácido clorhídrico 12 M^{6,7}. La hidrólisis se realizó a 110° C durante 24 horas. Las ampollas se conservaron a -20°C hasta el momento de preparar las soluciones de trabajo (1 a 2 semanas). El producto de la hidrólisis ácida se transfirió a un balón de 25 mL de capacidad y se llevó a volumen con agua milli-Q. Esta solución se filtró utilizando una membrana filtrante de 0,45 mm. Se midió 1 mL del filtrado, se transfirió a un balón de 10 mL junto con 6 mL de hidróxido de sodio 0,1 M y finalmente se enrasó con ácido acético 30 mM (muestras HL-1 y HSE-1). A partir de estas muestras se prepararon las soluciones muestra HL-2 y HSE-2 mediante diluciones 2:10 (v/v) con ácido acético 30 mM. Las disoluciones a ser ensayadas se prepararon inmediatamente antes de la derivatización de los aminoácidos.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES:
Solución patrón de aminoácidos individuales (SP1): se pesó por separado una muestra de cada aminoácido equivalente a 2 µM, y luego se prepararon soluciones de trabajo equivalentes a 20 mM utilizando solución de ácido acético 30 mM como disolvente. Todas las soluciones fueron transferidas a viales de color ámbar y sellados bajo atmósfera de nitrógeno y conservadas a -20°C (1 a 2 semanas). **Solución patrón de trabajo de una mezcla de aminoácidos (SP2):** se preparó una serie de soluciones de una mezcla

homogeneous flour. **Samples of earthworm flour obtained from oven drying (ODF):** Up until the air insuflation process, the same methodology for obtaining FL was applied. The previously washed earthworms, were treated with a 4% solution of sodium chloride¹. After washing with abundant water in order to totally eliminate the salt, the worms were heated in an oven at 60°C for nine hours, followed by the same degreasing and grinding process as before. **Hydrolysed protein samples:** The samples obtained from both processes were weighed with 0.0200 g and 0.0202 g obtained from FL and ODF respectively. Each of the samples were transferred to a amber coloured ampoule with 2 mL of hydrochloric acid (12 M)^{6,7}. Hydrolysis was carried out at 110° C for 24 hours. The ampoules were stored at -20°C until preparation of the working solutions (one to two weeks). The product obtained from acid hydrolysis was transferred to a cylinder of a capacity of 25 mL and milli-Q water to make up volume, together with 6mL of sodium hydroxide 0.1 M, were added. Finally, acetic acid 30 mM was used to bring the solution to full volume (samples FL-1 & ODF-1). From these samples, the sample solutions FL-2 and ODF-2 were prepared through dissolution 2:10 (v/v) with acetic acid 30 mM. The dissolutions to be tested were prepared immediately before amino acid derivatization.

SOLUTION PREPARATION: Individual amino acid solution patterns (SP1): The equivalent of a 2 mM sample of each amino acid were prepared separately, followed by the preparation of solutions equivalent to 20 µM, using 30 mM acetic acid solution as solvent. All solutions were transferred to amber coloured vials and were sealed in a nitrogen environment and stored at -20°C for one to two weeks. **Mixed amino acid solution working patterns (SP2):** A series of solutions of a mixture of individual amino acids equivalent to a concentration of 0, 2, 4, 8, 12, 16, & 32 µM for each amino acid were prepared, using the previously mentioned methodology.

DERIVATIZATION: 100 mL of the solution to be tested (standard or sample) were transferred to a vial in a nitrogen atmosphere with 200 µL of derivatizing reactive (OPA). After exactly 60 seconds, 500 µL of potassium borate

de aminoácidos individuales equivalentes a una concentración de 0, 2, 4, 8, 12, 16 y 32 μM para cada aminoácido, usando la metodología ya mencionada.

DERIVATIZACIÓN: Se transfirió 100 mL de la solución a ensayar (patrón o muestra) a un vial bajo atmósfera de nitrógeno y 200 μL del reactivo derivatizante (OPA). Exactamente después de 60 segundos se agregó 500 μL de una solución buffer 0,4 M de borato de potasio (pH 10) y seguidamente se selló y agitó. Dado que los aminoácidos derivatizados con OPA sólo son estables por un corto periodo de tiempo, las inyecciones en el cromatógrafo de los OPA-derivados se realizaron dentro de los dos minutos siguientes a la derivatización tal como lo recomienda el fabricante⁸.

PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS:

Fase móvil A: 50 mM de fosfato monosódico ajustado a pH 7,2. **Fase móvil B:** metanol-buffer fosfato (70:30, v/v). **Flujo:** 2 mL/min. **Temperatura de la columna:** ambiente ($\pm 20^\circ\text{C}$). **Volumen de inyección:** 10 μL . **Detector:** Fluorescencia, filtro 1,5 y atenuación 16 x 100. **Detección:** excitación 340 nm y emisión 455 nm. **Gradiente** (T-%B-curva): (0-10-cóncava); (35-65-cóncava); (45-90-convexa).

ANÁLISIS CUALITATIVO DE AMINOÁCIDOS

Las muestras de harina de lombriz fueron hidrolizadas con ácido clorhídrico 6 M durante 20 horas. El pH del hidrolizado fue ajustado a 2,20 con una solución tampón Beckman System 6300. Los aminoácidos fueron separados utilizando un analizador automático de aminoácidos tipo Beckman (System 126 AA) y derivatizados con ninhidrina para su detección a 570 nm y 440 nm.

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

El contenido de proteínas de la harina de lombriz fue determinado por el método de micro Kjeldahl⁵.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Ensayo de conveniencia del sistema cromatográfico. Se inyectó la solución SP2 (n = 10)

buffer solution 0.4 M (pH 10) was added, and the solution was subsequently sealed and shaken. Given that derivatized amino acids with OPA are only stable for a short period of time, the injections of OPA-derivatives into the chromatograph were performed within two minutes, immediately after derivatization, as recommended by the manufacturer⁸.

CHROMATOGRAPHIC PARAMETERS:

Mobile phase A: 50 mM of monosodium phosphate adjusted to pH 7.2. **Mobile phase B:** Methanol-buffer phosphate (70:30, v/v). **Flow:** 2 mL/min. **Column temperature:** ambient ($\pm 20^\circ\text{C}$). **Injection volume:** 10 μL . **Detector:** Fluorescence, filter 1.5 and attenuation 16 x 100. **Detection:** excitation 340 nm and emission 455 nm. **Gradient** (T-%B-curve): (0-10-concave); (35-65-concave); (45-90-convex).

QUALITATIVE ANALYSIS OF AMINO ACIDS

Earthworm flour samples were hydrolysed with hydrochloric acid (6 M) for 20 hours. The pH of the hydrolysed product was adjusted to 2.20 with a Beckman System 6300 buffer solution. The amino acids were separated using an automatic Beckman amino acid analyser (System 126 AA) and were derivatized with ninhydrin for detection purposes at 570 nm & 440 nm.

ANALYSIS OF PROTEINS

The protein content of the earthworm flour was determined using the micro Kjeldahl method⁵.

METHOD VALIDATION

SUITABILITY TEST OF THE CHROMATOGRAPHIC SYSTEM. The SP2 solution (n=10) was injected until peaks of a height of between 10 & 100% were obtained with regard to the fluorometric signal response. The concentration of amino acids with a lower signal were adjusted in order to prepare the calibration curve. A range of concentrations of between nM & mM were examined. In order to determine the portion of sample and a concentration of amino acids within the calibration curve, a study similar to that mentioned for SP2 was carried out.

hasta obtener picos de altura entre 10 % y 100% con respecto a la respuesta de la señal fluorométrica. La concentración de los aminoácidos con menor señal se ajustó para preparar la curva de calibración. Se examinó un rango de concentraciones entre nM y mM. Para determinar la porción de muestra y una concentración de aminoácidos dentro de la curva de calibrado, se efectuó un estudio similar al mencionado para la solución SP2. **Identificación de los aminoácidos.** Se obtuvo mediante ensayos individuales duplicados de materiales de referencia (SP1) y un ensayo duplicado de la mezcla de aminoácidos (SP2). La identificación de los aminoácidos fue comprobada utilizando cromatografía de intercambio iónico y derivatización postcolumna con ninhidrina. **Repetitividad.** La precisión dentro de series se examinó mediante inyecciones cuádruples de una solución intermedia de la serie de patrones de la mezcla de aminoácidos (SP2). La curva de calibración se obtuvo mediante inyecciones por duplicado. **Exactitud.** A una solución intermedia de la serie de patrones de la mezcla de aminoácidos (SP2) se le adicionó una solución muestra HL-2 1:1, v/v (n=2). **Robustez.** La identificación y cuantificación de los aminoácidos certificados fue evaluada utilizando una columna BondapaK C18 bajo las condiciones descritas en materiales y métodos. La repetitividad dentro de series y entre series en relación a los tiempos de retención y las áreas de los picos fue determinada utilizando ambas columnas. El análisis final de las muestras se llevó a cabo utilizando la columna OPA-HS. **Linealidad.** La linealidad del método se determinó en el intervalo de concentración de 2 – 16 μM para cada uno de los aminoácidos (SP2). **Estabilidad.** No se realizaron ensayos de estabilidad ya que después de optimizado el método las muestras se prepararon, conservaron a -20°C bajo atmósfera de nitrógeno y luego se analizaron dentro de las dos semanas siguientes. Durante el ensayo diario las soluciones de trabajo se conservaron a $\leq 0^{\circ}\text{C}$. La estabilidad de los aminoácidos derivatizados se normalizó mediante un seguimiento riguroso del tiempo de derivatización previo a la separación cromatográfica⁸. El reactivo OPA se conservó a 4°C bajo atmósfera de nitrógeno y se reconstituyó cada semana mediante la adición de 5 μL de 2-mercaptoetanol a 1 mL del reactivo OPA sin diluir. Durante los ensayos, el reactivo OPA se manipuló conservándolo en un baño de hielo y

Identification of amino acids. Identification was carried out through individual duplicated tests of reference materials (SP1) and a duplicated test of the mixture of amino acids (SP2). The process was checked using ionic interchange chromatography and postcolumn derivatization with ninhydrin. **Repetitivity.** Precision within the series was examined through quadruple injections of an intermediate solution of the series of standard amino acid mixtures (SP2). The calibration curve was obtained through duplicated injections. **Accuracy.** An intermediate solution from the series of standard amino acid mixtures (SP2) were added to a sample solution FL-2 1:1, v/v (n=2). **Robustness.** The identification and quantification of the certified amino acids were evaluated using a BondapaK C18 column, under the conditions described in materials and methods. The repetivity within and among series, with regard to retention times and areas of peaks, was determined using both columns. The final analysis of the samples was carried out using the OPA-HS column. **Linearity.** Method linearity was determined within concentration interval 2-16 μM for each amino acid (SP2). **Stability.** Stability tests were not carried out given that after optimising the method, the samples were prepared, conserved at -20°C in an atmosphere of nitrogen, and subsequently analysed within a period of two weeks. During the daily testing period, the working solutions were stored at $\leq 0^{\circ}\text{C}$. The stability of the derivatized amino acids was normalised through a rigorous adherence to derivatization times prior to chromatographic separation⁸. The reactive OPA was conserved at 4°C in nitrogen atmosphere and was reconstituted every week through the addition of 5 μL of 2-mercapthoethanol to 1 mL of undiluted OPA reactive. During the tests, the OPA reactive was manipulated in ice bath storage and the recipient was opened in a nitrogen atmosphere. **Determination of the quantity of solution sampled to be tested.** 100 μL of samples HL-1 and HSE-1 and 100 μL of diluted sample HL-2 and HSE-2 were derivatized. **Statistical analysis of the data.** The program Microcal Origin 5.0 was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Liophylized (FL) and oven dried earthworm flour (ODF) were characterised by their high

se destapó el envase bajo una atmósfera de nitrógeno. **Determinación de la cantidad de solución muestra a ensayar.** Se derivatizó 100 μ L de las muestras HL-1 y HSE-1 y 100 μ L de las muestras diluidas HL-2 y HSE-2. **Análisis estadístico de los datos.** Se utilizó el programa Microcal Origin 5.0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La harina de lombriz obtenida por liofilización (HL) y secado en estufa (HSE) se caracterizó por un elevado contenido en proteínas (62,28 y 61,81% p/p, respectivamente) como era de esperarse según otros autores^{1,9,10}.

Un total de 15 aminoácidos fueron identificados por cromatografía líquida de alta resolución (Fig.1 y 2) y validados por cromatografía de intercambio iónico (Fig. 3) utilizando materiales de referencia. Sin embargo, sólo 12 aminoácidos fueron cuantificados por CLAR. La resolución obtenida para la mayoría de los aminoácidos primarios derivatizados fue satisfactoria tanto para el patrón como para la muestra. Los derivados isoindólicos de histidina, glicina y treonina, que normalmente coeluyen¹¹, fueron separados usando las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos. Los aminoácidos metionina y valina coeluyeron bajo las condiciones descritas (Fig. 1 y 2). La falta de resolución de este par de aminoácidos es propia de la metodología utilizada⁸. Los tiempos de retención, entre corridas, para la curva patrón (inyecciones por duplicado), no varió representativamente ($< 0,1$ min), manteniendo en cada caso la resolución esperada. A pesar de que no se usó un patrón interno, la variación de los tiempos de retención diario e interdiario fue inferior a 0,1 min. La precisión dentro de corridas, expresada como coeficiente de variación porcentual (CV), para una solución SP2 ensayada 4 veces de manera consecutiva fue en todos los casos $< 5\%$ (Tabla 1). Un intervalo lineal entre 4 y 16 mM resultó adecuado para la mayoría de los aminoácidos derivatizados, no obstante, la concentración final de algunos aminoácidos se ajustó entre 2 y 32 mM. El coeficiente de correlación (r) fluctuó entre 0,998 y 1,000 (Tabla 1). La exactitud expresada como porcentaje recuperado osciló entre 97 y 102 para los 12 aminoácidos finalmente cuantificados. La cantidad de solución muestra óptima para lograr

protein content (62.28 y 61.81% w/w, respectively), as expected in the light of the work of other authors^{1,9,10}.

A total of 15 amino acids were identified through high resolution liquid chromatography (Fig.1 & 2) and validated by ionic interchange chromatography (Fig. 3) using reference materials. However, only 12 amino acids were quantified by HPLC. The resolution obtained for most of the primary derivatized amino acids was satisfactory both for standard as well as for the sample. The isoindol derivatives of histidine, glycine and threonine, that normally co-eluate¹¹, were separated under the conditions described in the materials and methods section. The amino acids methionine and valine co-eluated under the conditions described (Fig. 1 & 2). The lack of resolution from this pair of amino acids is characteristic of the methodology used⁸. Retention times, between runs, for the standard curve (duplicated injections), did not vary significantly (< 0.1 min), and in every case maintained the resolutions expected. Although an internal standard was not used, the variation in daily and inter-daily retention times was less than 0.1 min. Precision within runs, expressed as a coefficient of percentage variation (CV), for an SP2 solution tested on 4 consecutive occasions was in all cases $< 5\%$ (Table 1). A lineal interval of between 4 & 16 mM was found to be adequate for the majority of the derivatized amino acids. However, the final concentration of some amino acids settled at between 2 & 32 mM. The coefficient of correlation (r) fluctuated between 0.998 & 1.000 (Table 1). Exactness expressed as recovery percentage oscillated between 97 and 102 for the 12 amino acids that were finally quantified. The optimal quantity of sample solution to achieve a concentration within lineal range was 2 mL (FL-1 or ODF-1) diluted to 10mL with acetic acid 30 mM (HL-2 or HSE-2).

The high resolution reversed phase liquid chromatograph (HPLC) adapts perfectly to the quantification of amino acids that are produced from hydrolysed proteins from earthworm flour after derivatization with o-phthaldehyde. The method was found to be accurate, lineal and reproducible, at the concentration interval tested. Amino acid quantification was carried out in two types of sample: (a) flour obtained through lio-phylyzation (FL) and (b) oven dried flour (ODF). The results obtained demonstrate that the diffe-

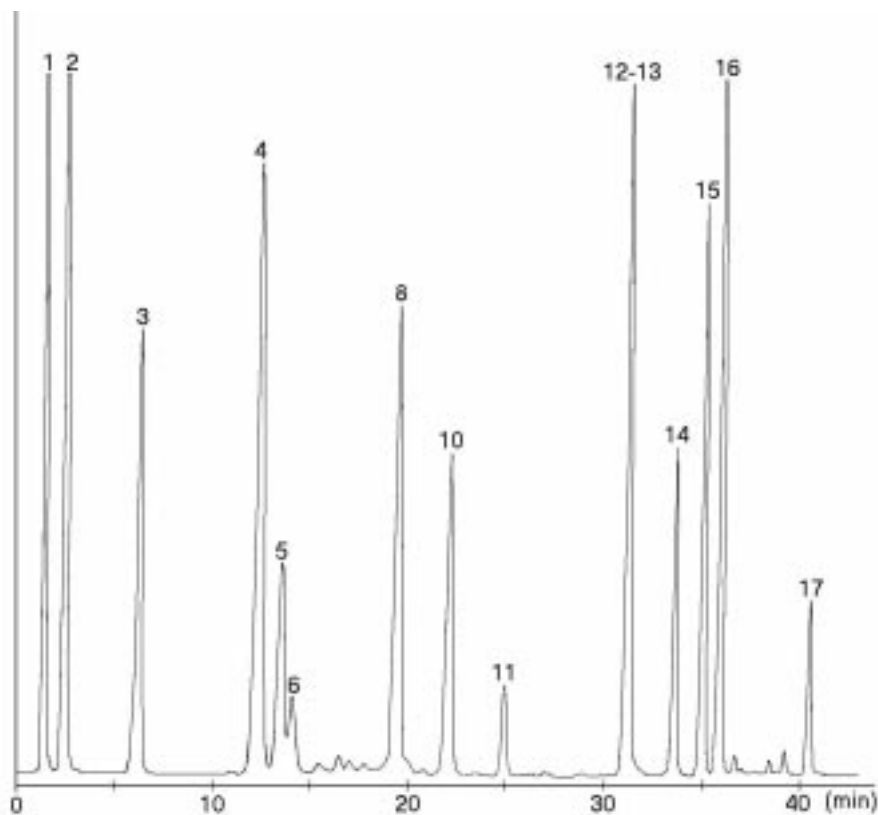
una concentración dentro del rango lineal fue 2 mL de muestra (HL-1 o HSE-1) diluida a 10 mL con ácido acético 30 mM (HL-2 o HSE-2).

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en fase reversa se adapta perfectamente a la cuantificación de aminoácidos producto de la hidrólisis de proteínas de la harina de lombriz previa derivatización con *o*-ftalaldehído ya que el método resultó ser preciso, lineal y reproducible, en el intervalo de concentración ensayado. La cuantificación de aminoácidos se realizó en dos tipos de muestra: (a) harina obtenida por liofilización (HL) y (b) harina obtenida por secado en estufa (HSE). Los resultados obtenidos demostraron que la diferencia entre una y otra muestra es < 10% para cada aminoácido ($n = 4$), excepto para tirosina y lisina. Se evidenció que en todos los casos se obtuvo un mayor contenido de aminoácidos siguiendo la metodología de obtención de harina de lombriz por liofilización (HL) por lo que se recomienda esta última para el análisis cuantitativo.

rence between one or other sample is < 10% for each amino acid ($n = 4$), except for tyrosine and lysine. In all cases it was apparent that a greater quantity of amino acid content was achieved following the methodology for the production of lyophilized earthworm flour (LF). Consequently, it is this methodology that is recommended for quantitative analysis.

FIGURA 1. Cromatograma (CLAR) representativo de los derivados OPA-aminoacídicos de una muestra de harina de lombriz (HL).

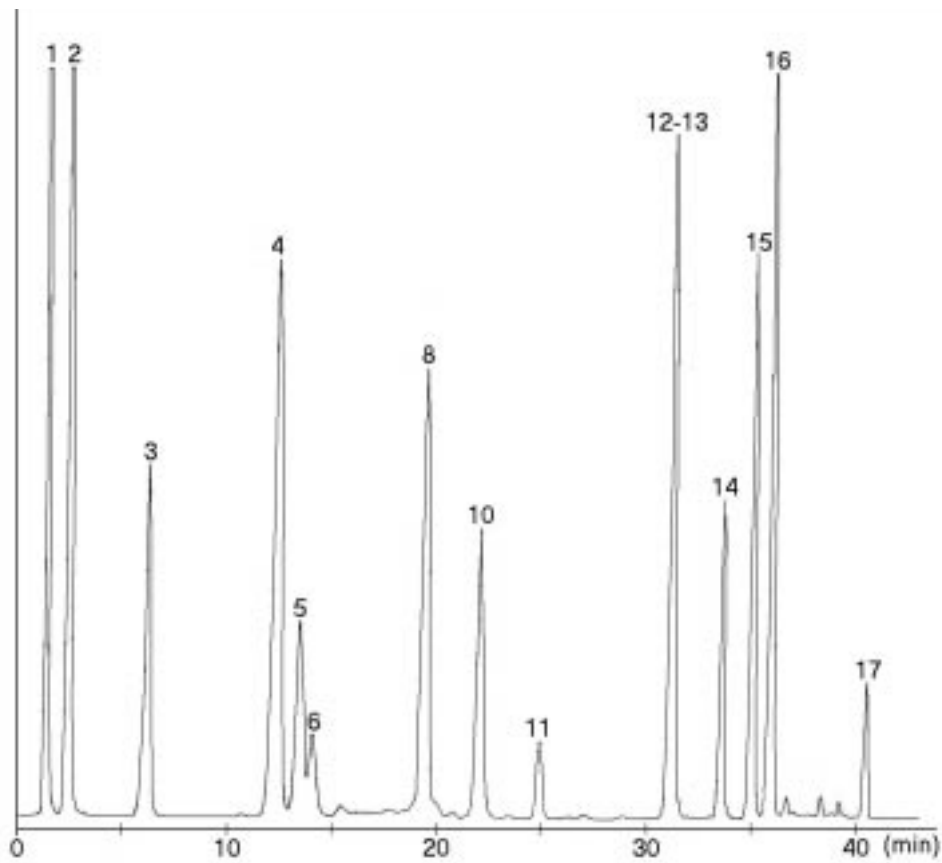
FIGURE 1. Chromatogram (HPLC) representing OPA-amino acid derivatives of earthworm sample (FL).



Identificación/Identification: 1 = Asp, 2 = Glu, 3 = Ser, 4 = Gly, 5 = Thr, 6 = His, 8 = Ala, 10 = Arg, 11 = Tyr, 12-13 = Met-Val, 14 = Phe, 15 = Ileu, 16 = Leu y 17 = Lys.

FIGURA 2. Cromatograma (CLAR) representativo de los derivados OPA-aminoacídicos de una muestra de harina de lombriz (HSE).

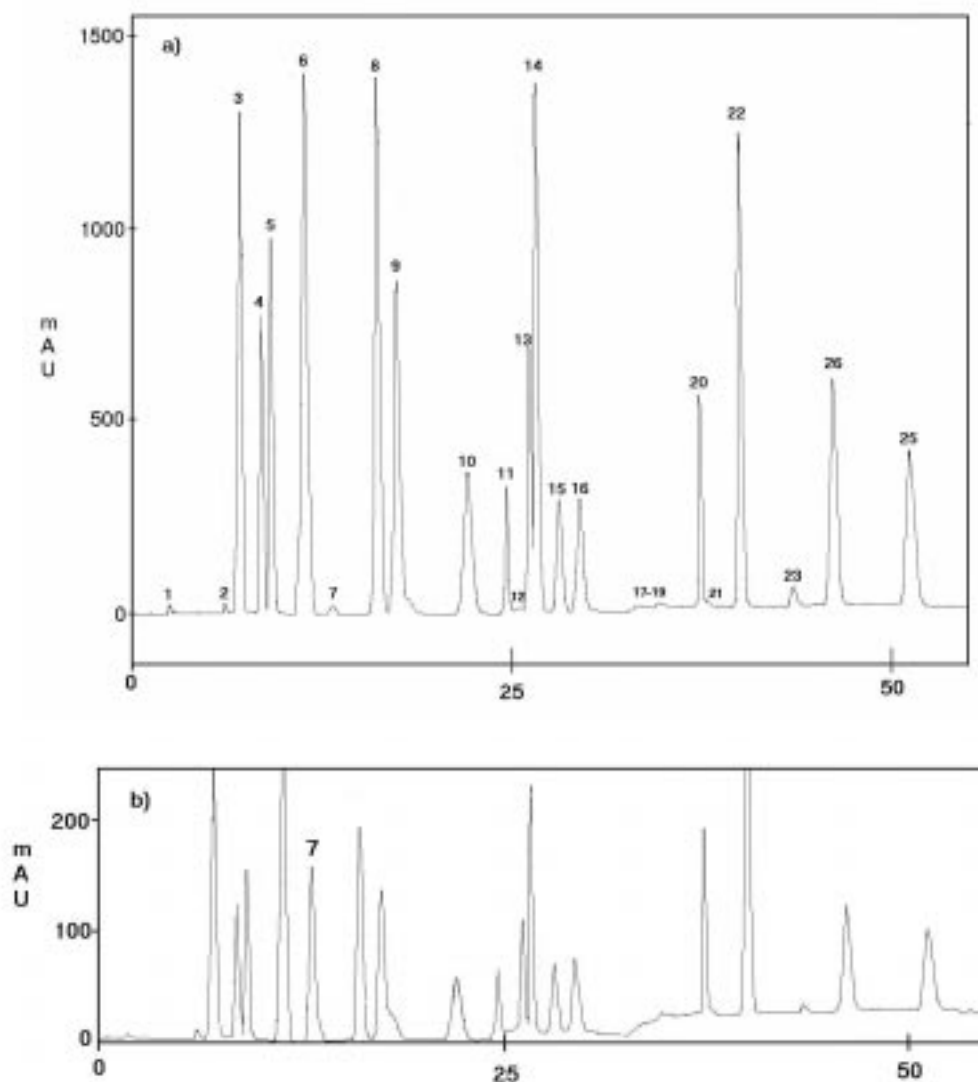
FIGURE 2: Chromatogram (HPLC) representing OPA-amino acid derivatives of earthworm sample (ODF).



Identificación/Identification: 1 = Asp, 2 = Glu, 3 = Ser, 4 = Gly, 5 = Thr, 6 = His, 8 = Ala, 10 = Arg, 11 = Tyr, 12-13 = Met-Val, 14 = Phe, 15 = Ileu, 16 = Leu y 17 = Lys.

FIGURA 3. Cromatograma (IEC) representativo de los derivados aminoacídicos con ninhidrina de una muestra de harina de lombriz.

FIGURE 3: Chromatogram (IEC) representing amino acid derivatives with ninhydrin of an earthworm sample.



a) Cromatograma obtenido a 570 nm.

b) cromatograma obtenido a 440 nm. Identificación: 1-2 = NI, 3 = Asp, 4 = Thr, 5 = Ser, 6 = Glu, 7 = Pro, 8 = Gly, 9 = Ala, 10 = Val, 11 = Met, 12 = NI, 13 = Ileu, 14 = Leu, 15 = Tyr, 16 = Phe, 17-19 = NI, 20 = His, 21 = NI, 22 = Lys, 23 = NI, 24 = Amoniacio, 25 = Arg. NI = No identificado.

a) Chromatogram obtained at 570 nm.

b) chromatogram obtained at 440 nm. Identification: 1-2 = NI, 3 = Asp, 4 = Thr, 5 = Ser, 6 = Glu, 7 = Pro, 8 = Gly, 9 = Ala, 10 = Val, 11 = Met, 12 = NI, 13 = Ileu, 14 = Leu, 15 = Tyr, 16 = Phe, 17-19 = NI, 20 = His, 21 = NI, 22 = Lys, 23 = NI, 24 = Amonium, 25 = Arg. NI = Not identified.

TABLA 1. Conveniencia del método analítico por cromatografía líquida de alta eficacia para la cuantificación de aminoácidos en la harina de lombriz.

Aminoácidos		Parámetros de optimización del sistema cromatográfico (CLAR)		
Orden de elusión	Solución patrón (µM)	Reproducibilidad ^a		Linealidad ^b
		TR (DS)	Áreas (% CV)	(r)
1 Asp	12	0,015	2,534	1,000
2 Glu	12	0,040	2,815	0,999
3 Ser	12	0,051	3,193	0,998
4 Gly	16	0,026	1,134	0,999
5 Thr	12	0,091	4,141	0,999
6 His	12	0,064	3,767	0,998
7 Cit	12	0,046	2,353	0,999
8 Ala	12	0,038	1,878	1,000
9-10 Gaba-Arg	(12-12)	0,058	3,907	-
11 Tyr	12	0,066	1,950	0,999
12-13 Met-Val	(24-24)	0,033	2,623	-
14 Phe	24	0,054	1,600	0,999
15 Ile	12	0,029	2,100	0,999
16 Leu	12	0,025	2,516	0,999
17 Lys	24	0,062	4,638	0,999

^a n = 4^b n = 5 (duplicado)**TABLE 1.** The suitability of the analytical method through high performance liquid chromatography, in the quantification of amino acids in earthworm flour.

Amino acids		Optimisation parameters of the Chromatographic system (HPLC)		
Order of elution	Solution standard (µM)	Reproducibility ^a		Linearity ^b
		TR (DS)	Areas (% CV)	(r)
1 Asp	12	0.015	2.534	1.000
2 Glu	12	0.040	2.815	0.999
3 Ser	12	0.051	3.193	0.998
4 Gly	16	0.026	1.134	0.999
5 Thr	12	0.091	4.141	0.999
6 His	12	0.064	3.767	0.998
7 Cit	12	0.046	2.353	0.999
8 Ala	12	0.038	1.878	1.000
9-10 Gaba-Arg	(12-12)	0.058	3.907	-
11 Tyr	12	0.066	1.950	0.999
12-13 Met-Val	(24-24)	0.033	2.623	-
14 Phe	24	0.054	1.600	0.999
15 Ile	12	0.029	2.100	0.999
16 Leu	12	0.025	2.516	0.999
17 Lys	24	0.062	4.638	0.999

^a n = 4^b n = 5 (duplicated)

El contenido aminoacídico producto de la hidrólisis de proteínas de la harina de lombriz resultó rico en ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, isoleucina, leucina, lisina y alanina (Tabla 2). En este estudio no se investigó la presencia de aminoácidos secundarios y tampoco de triptófano. Sin embargo, la prolina fue identificada en los ensayos realizados por cromatografía de intercambio iónico (Fig. 3b).

Amino acid content, obtained from hydrolysed proteins from earthworm flour, proved to be rich in aspartic acid, glutamic acid, glycine, isoleucine, lysine and alanine (Table 2). In this study neither the presence of secondary amino acids nor triptophane were investigated. However, proline was identified in the tests carried out using ionic exchange chromatography (Fig. 3b).

TABLA 2. Contenido de aminoácidos proteicos en la harina de lombriz determinados por el método analítico de CLAR y derivatización pre-columna con OPA.

Aminoácidos	Harina de lombriz	
	HL (% p/p) ^a	HSE (% p/p) ^a
Asp	7,1	6,7
Glu	9,0	8,2
Ser	0,9	0,8
Gly	5,7	5,3
Thr	3,6	3,2
His	2,5	2,3
Ala	4,1	3,5
Arg	NC	NC
Tyr	0,92	0,5
Met-Val	NR	NC
Phe	3,53	2,9
Ile	6,2	5,3
Leu	16,6	13,8
Lys	4,3	3,1

NC = no cuantificado

NR = no reportado

^a Desviación estándar = 0,03 – 1,0 (n = 2)

TABLE 2. Content of amino acid proteins in earthworm flour through HPLC and pre-column derivatization with OPA.

Amino acids	Earthworm flour	
	FL (% w/w) ^a	ODF (% w/w) ^a
Asp	7.1	6.7
Glu	9.0	8.2
Ser	0.9	0.8
Gly	5.7	5.3
Thr	3.6	3.2
His	2.5	2.3
Ala	4.1	3.5
Arg	NQ	NQ
Tyr	0.92	0.5
Met-Val	NR	NQ
Phe	3.53	2.9
Ile	6.2	5.3
Leu	16.6	13.8
Lys	4.3	3.1

NQ = Not quantified

NR = not reported

^a Standard deviation = 0.03 – 1.0 (n = 2)

Los resultados obtenidos en términos del perfil aminoacídico de la harina de lombriz concuerdan significativamente con los reportados por otros autores^{1,3,12}. Es de destacar que estos niveles de aminoácidos también son equivalentes a los obtenidos para harinas de otras fuentes alimenticias¹². Además, los requerimientos de lisina y otros aminoácidos esenciales en el hombre exigidos por la FAO/OMS¹ coinciden satisfactoriamente con los obtenidos en la HL y HSE (Tabla 3).

The results obtained in terms of the amino acid profile of earthworm flour, strongly resemble that reported by other authors^{1,3,12}. Furthermore, it is important to mention that these levels of amino acids are equivalent to those found in flours obtained from other food sources¹², and that lysine and other essential amino acids for the human organism, as stated by the FAO/WHO¹ are present to a satisfactory degree in LF and ODF (Table 3).

TABLA 3. Cuadro comparativo del contenido de aminoácidos de diferentes fuentes con los requerimientos oficiales.

Aminoácido	Contenido de aminoácidos (% p/p)					
	Harina de lombriz ^a	Harina de lombriz ^b	Harina de lombriz ^c	Harina de pescado ^d	Harina de carne ^e	FAO/OMS ^f
Asp	7,1/6,7	7,5	6,6	5,9	6,5	-
Glu	9,0/8,2	11,7	15,2	14,8	13,8	-
Ser	0,9/0,8	3,4	5,1	-	-	-
Gly	5,7/5,3	3,7	4,8	4,0	7,2	-
Thr	3,6/3,2	3,4	5,2	3,7	4,6	2,8
His	2,5/2,3	2,1	2,5	2,2	2,5	-
Ala	4,1/3,5	4,0	-	-	-	-
Arg	NC	5,0	-	-	-	-
Tyr	0,92/0,5	-	1,2	0,5	1,1	2,8
Met	NC	-	2,5	2,2	3,0	2,2
Val	NC	3,8	5,3	4,9	5,7	4,2
Phe	3,53/2,9	-	3,8	3,6	4,2	2,8
Ile	6,2/5,3	3,6	4,8	4,1	6,0	4,2
Leu	16,6/13,8	6,3	8,2	7,1	8,4	4,8
Lys	4,3/3,1	5,9	7,1	7,2	10,4	4,2

^a = obtenidos en esta investigación (HL/HSE)
^{c,d y e} = Salazar y Rojas 1992

^b = Segovia 1996
^f = Velásquez et al. 1986

TABLA 3. Comparative chart of amino acid content of different sources with official required intakes.

Amino acid	Amino acid content (% w/w)					
	Earthworm flour	Earthworm flour	Earthworm flour	Fish flour	Meat flour	FAO/WHO ^f
Asp	7.1/6.7	7.5	6.6	5.9	6.5	-
Glu	9.0/8.2	11.7	15.2	14.8	13.8	-
Ser	0.9/0.8	3.4	5.1	-	-	-
Gly	5.7/5.3	3.7	4.8	4.0	7.2	-
Thr	3.6/3.2	3.4	5.2	3.7	4.6	2.8
His	2.5/2.3	2.1	2.5	2.2	2.5	-
Ala	4.1/3.5	4.0	-	-	-	-
Arg	NQ	5.0	-	-	-	-
Tyr	0.92/0.5	-	1.2	0.5	1.1	2.8
Met	NQ	-	2.5	2.2	3.0	2.2
Val	NQ	3.8	5.3	4.9	5.7	4.2
Phe	3.53/2.9	-	3.8	3.6	4.2	2.8
Ile	6.2/5.3	3.6	4.8	4.1	6.0	4.2
Leu	16.6/13.8	6.3	8.2	7.1	8.4	4.8
Lys	4.3/3.1	5.9	7.1	7.2	10.4	4.2

^a = obtained in this research (FL/ODF)
^{c,d y e} = Salazar & Rojas 1992

^b = Segovia 1996
^f = Velásquez et al. 1986

Es importante destacar que en este estudio se realizó una hidrólisis de proteínas en una matriz conformada por harina de lombriz (HL y HSE) utilizando ácido clorhídrico 12 M, en lugar del método usual con ácido clorhídrico 6 M., usando ácido clorhídrico 12 M, se obtienen resultados similares para la mayoría de los aminoácidos⁷; mientras valina, isoleucina y leucina continúan liberándose aun después de 48 horas, cistina y metionina son destruidos. Por lo tanto, se recomienda ampliar este estudio utilizando ácido clorhídrico 6 M a 24, 48 y 72 horas. Igualmente, es necesario tomar en cuenta las debilidades del método de hidrólisis ácida, ampliamente difundidas por la bibliografía especializada en términos de algunos aminoácidos, por ejemplo, la inclusión de 10 mM de phenol o tioglicol para evitar la conversión parcial de tirosina en clorotirosina y adicionalmente prevenir alguna pérdida de cistina y metionina⁸.

CONCLUSIONES

El método analítico propuesto provee una herramienta alternativa para el análisis de los niveles de aminoácidos proteicos en la harina de lombriz (*Eisenia foetida*) con ciertas ventajas sobre el método clásico por cromatografía de intercambio iónico, en términos de rapidez, resolución y sensibilidad. Dado que este es un estudio preliminar, indiscutiblemente, es necesario realizar más estudios en relación a la hidrólisis ácida de la matriz utilizada.

Estos resultados aunados a los obtenidos por los mismos autores en trabajos previos sobre el contenido de minerales¹³ y la calidad bacteriológica¹⁰ de la harina de lombriz, permiten inferir que ésta podría constituir parte de las soluciones a los problemas nutricionales de los países en vías de desarrollo. El bajo costo que implica producir una harina de lombriz rica en proteínas, representa una ventaja enorme cuando se compara con la obtención de proteínas de carne de vacuno. "Actualmente, se destinan 157 millones de toneladas métricas de cereales, legumbres y proteínas vegetales aptas para uso humano para alimentar el ganado que producirá los 28 millones de toneladas métricas de proteínas animales que consumen los seres humanos anualmente"¹⁴. Esta es la auténtica preocupación de la FAO para la próxima Cumbre Mundial sobre la Alimentación a cele-

It is important to point out that in this study, protein hydrolysis was carried out in a matrix made up of earthworm flour (LF & ODF) using (12 M) hydrochloric acid, instead of the more usually used (6 M) hydrochloric acid. The results obtained are similar for most of the amino acids⁷. However, with (12 M) hydrochloric acid, valine, isoleucine and leucine continue to be liberated even after 48 hours, while cistine and methionine are destroyed. It is therefore recommendable that this study should be extended using 6 M hydrochloric acid at 24, 48, & 72 hours. It is equally necessary to take into account the weaknesses of the acid hydrolysis method. These are widely mentioned in specialized bibliography with regard to amino acids. For example, the inclusion of 10 mM of phenol or tioglycol will avoid the partial conversion of tyrosine into Chlorotyrosine and similarly, some of the loss of cistine and methionine⁸.

CONCLUSIONS

The proposed analytical method provides an alternative tool for the analysis of levels of amino acids proteins in earth worm flour (*Eisenia foetida*). It presents certain advantages over the classical ionic interchange chromatography method, in terms of speed, resolution and sensitivity. Undoubtedly, given that this is a preliminary study, it is necessary to carry out further studies on the acidic hydrolysis of the matrix used.

These results combined with those obtained by the same authors in previous work on the mineral content¹³ and bacteriological quality¹⁰ of earthworm flour, allow us to deduce that this product could constitute part of the solution to the nutritional problems of developing countries. The low cost of production of protein rich earthworm flour represents an enormous advantage, in comparison with the provision of proteins from bovine meat. On an annual basis, 157 million metric tons of cereals, legume, and vegetable protein apt for human consumption is fed to cattle, which in turn produces 28 million metric tons of animal protein consumed by human beings¹⁴. This will be a serious concern for the FAO at the next World Summit on Food Resources to be held in June 2002, which will be centred on the serious issue of how to feed a growing population in the XXI century. The enrichment of cereals with this

brarse en Junio 2002, la cual se centrará en la grave situación de cómo alimentar a una población en aumento en el siglo XXI. El enriquecimiento de cereales con este recurso no convencional para preparar productos de la dieta diaria representa una de las alternativas a nivel industrial. Sin embargo, debido a la poca aceptación que podría tener en la población humana, surge la alternativa de utilizarla en la alimentación animal⁹, lo cual permitiría aminorar en gran parte la utilización de tantas toneladas de cereales como alimento para el ganado, la mayoría vacuno.

En último lugar, no hay que despreciar la alternativa que representa para la disposición final de la basura orgánica y la posterior conversión en humus, que sirve para generar los abonos y los fertilizantes orgánicos que necesitan los pueblos agropecuarios, tal como lo pretende la Estación Piloto de Compostaje y Lombricultura, adscrito al Circuito de la Universidad de Los Andes (Venezuela), para el Manejo Integral de los Desechos, Ciulamide⁴.

non-conventional resource with a view to manufacturing products for daily human consumption, represents an alternative on an industrial scale. However, in the light of the low level acceptance that may become apparent within the human population, it could be alternatively used in animal feed⁹. To a great extent, this would reduce the use of so many tons of cereal produced to provide fodder for a largely bovine population of livestock.

Finally, the alternative that earthworms present for the disposal of organic waste should not be disregarded. Such waste products can be converted into humus, which serves to generate fertiliser and organic fertiliser required by farming societies. It is with this aim in mind that the Pilot Compost and Earthworm Culturing Station, in association with the University of the Andes, Venezuela, is working on the Integral Handling of Waste, Ciulamide⁴.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes, Venezuela por financiar este proyecto (N° FA-260-01-03-B) y al Laboratorio FIRP de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Los Andes, Venezuela. A la Fundación Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT), Venezuela (Beca de Doctorado).

BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

1. Velásquez L, Herrera C, Ibáñez I. Harina de lombriz. I Parte: Obtención, composición química, valor nutricional y calidad bacteriológica. *Alimentos* 1986; 11 (1): 15-21.
2. Albarrán GN. Formulación de alimentos concentrados para animales a partir de harina de lombriz. [Tesis de licenciatura, Ingeniería]. Laboratorio de Ciencia de los Alimentos. Mérida-Venezuela. Universidad de Los Andes. 1996.
3. Segovia, E. Análisis físico-químico de la harina de lombriz *Eisenia foetida*. [Tesis de licenciatura, Ingeniería]. Lima-Perú. Universidad Agraria La Molina; 1996.
4. Suárez, G. Compostaje y Lombricultura, una combinación perfecta para el campo. *Diario Frontera de Mérida, Venezuela* 2002 Feb 12; Cuerpo C, p. 1C.
5. Association of Official Analysis Chemists. *Official Methods of Analysis*. A.O.A.C. 1980.
6. Cayot P. Modification des protéines par voie électrochimique: glucosilation et réduction de pont disulfuros. *Aspects analytiques et applications* [these de doctorat]. France: Université de Bourgogne.; 1995. p. 257.
7. Davies MG, Thomas AJ. An investigation of hydrolytic techniques for the amino acid analysis of foodstuffs. *J. Sci. Food Agric.* 1973; 24 (12): 1525-40.
8. Alltech. Adsorbosphere® OPA. Alltech Associates Inc. 2051 Waukegan Road, Deerfield, IL 60015-1899. data Sheet D28062 (Jul. 29, 1993).
9. Ortega M, Reyes A, Mendoza G. Composición química de ensilados de lombrices terrestres (*Eisenia fetida* y *Lumbricus rubellus*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 1996; 46(4):325.
10. Medina A, Araque J. 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)* 1999; 37: 31-38.
11. Jones BN, Paabo S, Stein S. Amino acid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved o-phthalaldehyde precolumn labeling procedure. *J. Liquid Chromatography* 1981; 4 (4): 565-86.

12. Salazar E, Rojas C. Curso fundamental de lombricultura. Conferencia. Asociación Colombiana de lombricultores, Asolombriz; 1992.
13. Vielma R, Carrero P, Rondón C, Medina A. 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); 2001 Nov 16-21 Universidad Nacional Experimental del Táchira, Táchira-Venezuela.
14. Rifkin J. Ante una auténtica crisis alimentaria global. [citado en el Diario El PAIS.ES, España, 10 de Junio de 2002]. Disponible en: http://www.elpais.es/articulo.html?anchor=elpepiopi&xref=20020610elpepiopi_8&type=Tes&date.