

**FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONÓMICAS
Y DE LOS ALIMENTOS**



**PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO**

TALLER DE TÍTULO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

*Alimentación de *Eisenia foetida* en base a residuos orgánicos generados de diferentes mercados hortofrutícolas de la zona central en la producción de harina de lombriz para consumo humano*

DIEGO EDUARDO GUTIÉRREZ COLILLAN

QUILLOTA, CHILE

2018

Índice

1. Problemática.....	1
2. Hipótesis.....	4
3. Objetivo General.....	4
4. Objetivos específicos.....	4
5. Estado del arte	5
5.1. Rol de la lombriz.....	5
5.2. Propiedades Nutricionales	5
5.3. Alimento para lombrices	8
5.4. Cosecha	8
5.5. Secado	9
5.6. Aspectos sanitarios.....	9
6. Materiales y métodos.....	11
6.1. Condiciones de crianza y reproducción de lombrices	11
6.2. Cosecha y secado de lombrices	12
6.3. Determinación de proteínas y aminoácidos	13
6.4. Determinación de metales pesados	13
6.5. Determinación de residuos de pesticidas.....	14
6.6. Determinación de presencia microbiológica.....	14
6.7. Análisis estadístico	14
7. Resultados esperados	15
8. Presupuesto	16
9. Plan de trabajo	16
10. Bibliografía	18

1. Problemática

Actualmente existen diversas problemáticas asociadas al cambio climático, entre ellas la emisión de gases de efecto invernadero, deforestación, erosión, explotación de recursos no renovables, contaminación de aguas, etc.

Según un informe publicado por la ONU (2006), se estima que la producción pecuaria mundial emite más gases de efecto invernadero que todo el sistema de transporte del mundo, resaltando entre los gases más importantes: el anhídrido carbónico (9%), metano (37%) y óxido nitroso (65%), del total de emisiones provocadas por la actividad humana. Desde el 2015, se alcanzaron niveles records del anhídrido carbónico y se han mantenido hasta la fecha (SIO, 2018).

En cuanto al sector agropecuario, la ganadería representa el rubro con la mayor cantidad de hectáreas utilizadas para su explotación (30% de la superficie global), por un lado, dado por las más de 15 mil millones de cabezas de ganado, entre ellos vacunos, porcinos y aves de corral (Statista, 2018); y por el otro, la superficie empleada para los cultivos de alimentación de los mismos animales, como la soja y el maíz (ONU, 2006). Todo esto contribuye fuertemente a la degradación ambiental, ya que constantemente se está deforestando, erosionando, provocando contaminación difusa de suelos y aguas, desertificación, compactación por pisoteo y uso de maquinaria, etc. De este modo se ve afectada tanto la zona donde ocurre la explotación, como los lugares que son influenciados de forma indirecta.

Se estima que para obtener un kilogramo de carne se necesitan entre 15.000 y 20.000 litros de agua (FAO, 2012), en cuanto a la huella hídrica de la uva de mesa, ésta equivale a 450 L/kg de fruta terminada (Sellés y Riquelme, 2013) y el consumo de agua de una persona en Chile que bordea los 5000 L/mes (Gobierno de Chile, 2015). Lo anterior resulta alarmante, ya que se estima que para el 2025 un tercio de la población estará con escasez hídrica y para el 2050 habrá problemas de disponibilidad de agua en dos tercios de la población mundial, considerando que esta bordeará los 9 mil millones de personas para mediados de siglo (The World Bank, 2015).

Frente a este escenario de sobre población y escasez hídrica para las próximas tres décadas, la producción de carne está muy lejos de ser sustentable, por lo tanto, es

necesario un cambio de comportamiento en la forma de alimentación, con un producto que contenga proteínas de gran calidad, al igual que la de los animales utilizados tradicionalmente para la producción de carne.

Es así como la harina de anélidos, específicamente la lombriz roja de california (*Eisenia foetida*), es una posible alternativa, ya que, posee alrededor de un 12,3% de proteína en su carne con un 82% de humedad. Pero cuando ésta se presenta como harina, con solo un 11 a 12% de humedad, aumenta significativamente la proporción de proteína por kilo producido, sobrepasando el 60% y algunos autores afirman que puede llegar hasta el 80% de proteína (Medina *et al.*, 2003). Esta harina proteica es interesante, porque comparada con la carne de bovino, con 70% de humedad y 20% de proteína en sus contenidos totales (FAO, 2017), es más efectiva en cuanto a contenidos proteicos por kilo producido.

Con respecto a la calidad de la proteína procedente de lombrices, ésta posee todos los aminoácidos esenciales y dentro de sus contenidos, cabe destacar la lisina, un aminoácido generalmente ausente en los alimentos proteicos básicos y está en un porcentaje significativo en la harina de lombriz (5,9%), satisfaciendo los requerimientos de niños de entre 2 y 5 años exigidos por la FAO (Vielma *et al.*, 2003). Por lo tanto, la harina de anélidos es un producto biotecnológico de gran valor nutritivo para la alimentación humana.

Además, el anélido excreta un subproducto ya conocido, el humus de lombriz. Este resulta importante para la recuperación de suelos, porque es rico en macro y micronutrientes, también posee buena calidad y gran cantidad de actividad microbiológica, es mejorador de estructura, entrega fitohormonas, etc (Selles *et al.*, 2006). También se disminuye considerablemente la producción de gases de efecto invernadero, como CO₂, metano y óxido nitroso, generados por la industria ganadera para la obtención de carne.

Por otra parte, la producción de lombrices resulta de menor costo que la producción de carne tradicional (bovinos, porcinos y aves), ya que los anélidos basan su alimentación principalmente en materia orgánica, pudiendo aprovechar los desechos de la agricultura, eliminando las grandes extensiones de monocultivo dedicadas para la nutrición de animales de las empresas ganaderas y junto con ello un ahorro considerable del recurso hídrico.

Según un informe emitido por el Ministerio del Medio Ambiente (MMA) en 2017, en la sección de residuos sólidos en Chile, arrojó como resultado que para el 2015, anualmente se produjeron 18,8 millones de toneladas, de las cuales 5,5 millones toneladas correspondieron a residuos sólidos municipales. Estos últimos originados desde zonas urbanas, semiurbanas y rurales, y que corresponden principalmente a papeles y cartones, textiles, plásticos, vidrios, metales, materia orgánica, entre otros. Destaca la materia orgánica como principal residuo sólido municipal, con un 53%, equivalente a 2,9 millones de toneladas al año, originado desde domicilios particulares, ferias libres y mayoristas en su mayoría.

Entre los residuos sólidos orgánicos municipales, procedentes de la agricultura a través de ferias mayoristas y ferias libres principalmente, se pueden encontrar todo tipo de restos vegetales, entre las hortalizas: lechugas, papas, apios, repollos, zanahorias, pepinos de ensalada, leguminosas, etc. Además de restos de frutas como: carozos, pomáceas, uvas, paltas, entre otros. Esta gran diversidad de vegetales, para la alimentación de lombrices, mantendría la proporción de proteínas junto con los aminoácidos esenciales en aproximadamente 60% (Sales, 1996), demostrado en Uyucali, con basura de mercado local, a través del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana.

En el periodo 2011 - 2012, el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) emitió un informe relacionado con los residuos de plaguicidas en los productos hortofrutícolas, con el fin de generar información y propuestas para mitigar la contaminación de estos productos. Para ello muestrearon frutas, hortalizas, cereales, leche y huevos en supermercados, ferias libres y mayoristas en la Región Metropolitana. De las 403 muestras, solo 81 sobrepasaron el límite máximo de residuos, correspondiendo a un 20% del total (INIA, 2012).

Por último, debido a la falta de información en relación a la bioacumulación de pesticidas en la carne de lombriz, no se puede dar cuenta de la inocuidad del producto al basar la alimentación de lombrices a partir de residuos orgánicos de ferias mayoristas principalmente. Por esta razón, el presente trabajo de investigación, pretende alimentar lombrices en base a la materia orgánica procedente de residuos sólidos de ferias mayoristas hortofrutícolas, generando una oportunidad y agregación de valor a lo que

hoy se conoce como desecho o desperdicio y comprobar la inocuidad de la harina como un producto altamente proteico, para ser incorporado en la alimentación humana.

2. Hipótesis

La harina de lombriz alimentada en base a materia orgánica obtenida durante verano e invierno de diferentes mercados mayoristas de la región de Valparaíso, Metropolitana y del Maule, no sobrepasa el límite máximo de residuos, la concentración de metales pesados y tampoco la presencia microbiológica, y además no se altera la calidad ni cantidad de proteína.

3. Objetivo General

Determinar y cuantificar el contenido proteico y calidad de proteínas, de lombrices alimentadas con materia orgánica de diferente procedencia y época del año, además determinar el cumplimiento del límite máximo de residuos, metales pesados y presencia microbiológica de acuerdo al Reglamento Sanitario de los Alimentos.

4. Objetivos específicos

- Cuantificar los contenidos proteicos y aminoácidos de la harina de lombrices alimentadas con materia orgánica de diferente procedencia.
- Determinar si la harina de lombriz alimentada con materia orgánica de diferente procedencia, sobrepasa los límites máximos de residuos, estipulado en el Reglamento Sanitario de los Alimentos.
- Comparar y cuantificar la presencia de metales pesados en la harina de lombriz alimentada con materia orgánica de diferente procedencia, según lo estipulado en el Reglamento Sanitario de los Alimentos.

- Determinar si la presencia microbiológica en la harina de lombriz alimentada con materia orgánica de diferente procedencia, cumple con los valores establecidos en el Reglamento Sanitario de los Alimentos.

5. Estado del arte

5.1. Rol de la lombriz

Las lombrices son conocidas principalmente como especies capaces de modificar el suelo a través de su organismo transformando su alimento en humus, resultado de la excreción.

El alimento de las lombrices está constituido principalmente de materia orgánica en descomposición, nemátodos y hongos, generando suelos de alta calidad. Lo anterior, relacionado a las condiciones físicas del suelo (mayor porosidad, mayor infiltración aire/agua, entre otras) al realizar galerías a través de éste. También mejorando condiciones químicas, mineralizando compuestos orgánicos y trasladando nutrientes a través del suelo (humus de lombriz). Por último, relacionado a las propiedades biológicas, la presencia de lombrices permite el aumento de la actividad microbiológica del suelo (humus de lombriz) y además actúan como controladoras de nemátodos, ya que son parte de su dieta (Selles *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que estos animales se pueden emplear como bioindicadores de contaminación en suelos, realizando análisis de sus tejidos, determinando la presencia de metales pesados, pesticidas, antibióticos, derivados del petróleo, entre otros (Mara, 2010).

En lo que respecta a su uso como alimento, éste se consume como harina y puede ser empleado tanto en la dieta animal como humana, ya que presenta un interesante aporte nutritivo, por un lado, cerca de un 60% de proteína (Vielma *et al.*, 2003), además de ácidos grasos entre 8 a 11% y de minerales con un 7% (Vielma y Medina, 2006).

5.2. Propiedades Nutricionales

Según un informe emitido por la FAO (2015b), en América Latina y el Caribe (ALC) la seguridad alimentaria y nutricional es uno de los principales objetivos de desarrollo para el 2025 en esta región, poniendo como meta la erradicación del hambre y malnutrición.

En lo que respecta a Chile, la desnutrición en niños menores de 5 años es de aproximadamente un 2%, ubicando al país con el menor número de niños desnutridos de ALC. En contraste, posee 9,5% de obesos en su población, una de las tasas más altas de la región, sólo superado por Argentina con un 9,9% respectivamente (FAO, 2015b).

La desnutrición en Chile disminuyó, debido al crecimiento económico y reducción de la pobreza de las últimas dos décadas, además de la implementación de programas de fortificación de alimentos básicos con micronutrientes como en pan y leche (FAO, 2015b).

En relación a la obesidad, ésta se asocia al aumento del consumo de alimentos procesados y ultraprocesados (FAO, 2015b). Según la clasificación de alimentos NOVA (OPS, 2015), los del tipo *procesados*, se caracterizan por la adición de aceites, azúcar, sal, y/o métodos de conservación del producto que cambian la naturaleza del alimento original, y además, los del tipo *ultraprocesados*, se elaboran principalmente con productos industriales y con poco o ningún alimento entero con el objetivo que sean altamente apetecibles y duraderos.

Siguiendo la misma línea, se suma una nueva problemática, denominada mal nutrición o “hambre oculta”, que considera la falta de algún nutriente en la dieta (FAO, 2015b). Por ejemplo, la falta de hierro (Fe), mineral directamente asociado al desarrollo cognitivo, físico y social, ya que este elemento es parte de la estructura de la hemoglobina encargada de transportar el oxígeno en la sangre. La carencia de este elemento se relaciona a la obesidad porque se producen inflamaciones, liberando al sistema circulatorio hepcidina, hormona que secuestra el Fe del cuerpo, como un método de defensa del sistema inmune para no dejar disponible este elemento a microorganismos patógenos, pero impide la absorción del hierro en el cuerpo, pudiendo producir anemia (FAO y OPS, 2017).

Frente a la mal nutrición y obesidad en Chile, resulta apropiada la inclusión de la Lombriz Roja de California a la dieta humana. Para ello, son diversos los estudios asociados a los contenidos nutricionales de la harina de anélidos (*Eisenia foetida*), pudiendo obtener desde un 60% hasta un 80% en sus contenidos proteicos (base seca) y una alta proporción de aminoácidos esenciales disponibles (Vielma *et al.*, 2003), aunque la determinación aminoacídica varía dependiendo de la precisión de la técnica empleada por cada autor. La harina de lombriz resulta dos, tres y hasta cuatro veces más eficiente en la

obtención de proteínas por kilogramo, ya que, comparado a la carne de vacuno, porcino y ave, estos poseen 22; 23 y 23 % de proteína por kilogramo de carne (base húmeda) respectivamente (FAO, 2015a).

La harina de lombriz tiene una alta calidad proteica, ya que entre los aminoácidos esenciales descritos está fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina y valina, aunque, como se mencionó anteriormente, la determinación aminoacídica varía dependiendo de la precisión de la técnica empleada por cada autor y los compuestos utilizados en la cuantificación, por otra parte, no se cuantificó la cantidad de triptófano (Vielma *et al.*, 2003). Estos valores son similares a los presentados en la proteína del huevo, la ovoalbúmina (Ministerio de Agroindustria, 2017) y la harina de carne de vacuno, ya que tiene todos los aminoácidos esenciales, ambos considerados como alimentos de gran calidad en relación a sus contenidos proteicos y aminoacídicos (Vielma *et al.*, 2003).

También se determinó la fracción lipídica donde se reportó entre un 9 y 11% en harina (11-12% de humedad), de los cuales los ácidos grasos saturados representaron entre 5 y 6%, monoinsaturados representaron un 3% y poliinsaturados representaron 1% aproximadamente (Cayot *et al.*, 2009).

En cuanto a minerales, existe un importante aporte de P, K, Ca, Fe, Mg, Zn y Cu; con 950, 700, 205, 103, 91, 4 y 2 mg/100g respectivamente (Vielma *et al.*, 2007) y comparado con la carne de vacuno (Arenas *et al.*, 2000) y el huevo (Instituto de Estudios del huevo, 2018), la harina de lombriz presenta una mayor proporción en todos los minerales descritos. Cabe destacar que, según la ingesta diaria de minerales recomendada por la FAO y Estados Unidos, incluir la harina de lombriz en la dieta humana contribuiría con un gran aporte de dichos minerales (Cuervo *et al.*, 2009).

En cuanto al consumo humano, se ha registrado su uso en tribus amazónicas del Alto Orinoco en Venezuela (Paoletti *et al.*, 2003) y otras latitudes como China, Taiwán, Japón, entre otros (Zhenjun *et al.*, 1996), representando las lombrices un gran aporte de proteínas, lípidos y minerales en la dieta, según los estudios antes descritos.

5.3. Alimento para lombrices

No cabe duda del aporte nutricional de la harina de lombriz en la dieta humana y los estudios principalmente se han enfocado en la cuantificación de los contenidos de macro y micronutrientes. Sin embargo, son pocas las investigaciones relacionadas a los tipos de sustratos óptimos para el cultivo de lombrices y como éstos afectan las propiedades nutricionales de las mismas. En la zona de Uyacali, Perú, se llevó a cabo una investigación que consistió en la determinación de la combinación óptima de alimentos disponibles en la región, y que permitiera obtener harina de lombriz con el mayor porcentaje de proteína. Se concluyó que basura de mercado, estiércol de ovino, residuo de yuca, estiércol de vacuno, estiércol de gallina y combinaciones entre ellos, develaron un rango del 50 a 60% en los niveles proteicos (Sales, 1996).

Según Cayot *et al.* (2009), la alimentación de las lombrices fue basada en compost de los residuos orgánicos, obtenidos del comedor del recinto universitario (Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, Venezuela) y se logró aproximadamente un 65% de proteína cruda.

Otro estudio realizado por López (2012), evaluó las densidades poblacionales de anélido en base a dos fuentes de alimentación para producción de humus de lombriz y rendimiento en producción de carne. Se pudo concluir que la mejor calidad de humus de lombriz se obtuvo con estiércol de bovino y en relación a la carne, el estiércol de conejo tuvo mejores resultados en cuanto a peso y longitud, pero no consideró la calidad ni cantidad proteica de esta última. En paralelo, Ccasani y Poma (2012), evaluaron la densidad poblacional, peso y longitud de lombrices rojas de california alimentadas con estiércol de bovino y ovino. Se observó que el estiércol fresco de bovino tuvo mayor densidad de lombrices que estiércol fresco de ovino, y no se obtuvo diferencias en cuanto al peso y longitud. Sin embargo, no se consideró el rendimiento de carne, calidad y proporción proteica.

5.4. Cosecha

Acerca de la cosecha de lombrices, Girón (2006) y García (2013) concuerdan en que el mayor rendimiento se obtiene, implementando al momento de la cosecha, una malla sobre la cama de lombrices y sobre ésta se coloca una capa de alimento rico en materia orgánica con un 80% de humedad, para provocar la atracción de las lombrices. Previo a lo

anterior, se somete a los anélidos a una hambruna de cuatro días aproximadamente, para favorecer la acción del cebo, y las lombrices se retiran manualmente del “sustrato cebo”.

Según los autores es necesario realizar la acción anterior dos a tres veces consecutivas con intervalos de cuatro días, logrando una eficiencia del 93% de extracción de lombrices del total de la cama.

5.5. Secado

En relación al secado, este influye en la calidad y proporción proteica de la harina de lombriz, dependiendo de la temperatura y el tiempo al cual sean sometidas las lombrices. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al tipo de secado, ya sea liofilizado o por estufa (Vielma *et al.*, 2007).

Existe un amplio rango en las variables tiempo - temperatura, por un lado, Boulogne *et al.* (2008) concluyeron que someter los anélidos a 60°C durante 100 min y sin prensado son las condiciones óptimas, porque a mayor temperatura se desnaturalizan las proteínas y a menor temperatura no se obtiene la humedad deseada. Al mismo tiempo, Alcívar-Cedeño *et al.* (2016) sostienen que deshidratar lombrices a 90°C durante 450 min y sin circulación de aire son las variables apropiadas para generar harina de buena calidad y alta proporción proteica en base seca.

Ambos estudios concuerdan en que la humedad final de la harina lombriz debe estar entre un 11 y 12% para evitar el desarrollo bacteriológico y fúngico, ya que con contenidos de humedad del 15% es suficiente para que el que moho comience su desarrollo, y si la harina sobrepasa el 17% de humedad ya es propicio para la proliferación de bacterias (Frazier y Westhoff, 1993).

5.6. Aspectos sanitarios

La harina de lombriz al ser un producto obtenido por deshidratación y molienda de los tejidos musculares del anélido y que se empleará para el consumo humano, lo convierten en un alimento altamente proteico y puede ser comparado con carnes de bovino en relación a los límites máximos de residuos, aspectos microbiológicos y metales pesados descritos en el Reglamento Sanitario de Alimentos para Chile de 1997 modificado en 2016 y el *Codex Alimentarius* de 1995 enmendado en 2015.

Según el Reglamento Sanitario de los alimentos (Ministerio de Salud, 1997), relacionado a carnes, se establece que Dioxinas y Bifenilos Policlorados Coplanare (órganos clorados) no pueden sobrepasar los 6 picogramos EQT/OMS/g de grasa.

INIA (2012), en su informe sobre el Estudio de Residuos de Plaguicidas en los productos hortofrutícolas, demostró la presencia de diversos analitos en frutas y verduras, entre ellos: azinfos metilo, clorpirifos, diazinon, fenamifos, fosmet, imidacloprid, iprodiona, malatión, metidation, pirimetanil, triazofos y tiabendazol. De las 403 muestras, sólo 81 (20%) sobrepasaron el límite máximo de residuos, registrado en la Región Metropolitana.

En lo que respecta a carnes, el Ministerio de Salud (2010) establece que la presencia de los analitos antes descritos no debe sobrepasar rangos de 0,01 a 0,1 mg/kg de carne (dependiendo del compuesto), con excepción de clorpirifos y diazinon, con un máximo de 1 g y 2 g/kg de carne respectivamente. Sin embargo, para harina de lombriz se carece de investigación sobre la presencia de residuos de plaguicidas en su contenido.

En cuanto a los criterios microbiológicos, establece para carne, el recuento de microorganismos aerobios mesófilos permitidos entre 10^6 y 10^7 unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de muestra y de salmonella tan solo su presencia representa un riesgo para salud. Se determinó que la harina de lombriz liofilizada (LF) a -40°C en liofilizador o secada en estufa (SE) a 60°C por nueve horas, logra una humedad de 11,3% LF y 13,5% SE o con actividad de agua (Aw) de 0,6 (Frazier y Westhoff, 1993), impidiendo el desarrollo de microorganismos por la falta de agua libre, ya que éstos requieren sobre Aw 0,61 (Vielma *et al.*, 2008).

En cuanto a metales pesados, el *Codex Alimentarius* (FAO, 1995) establece que los contenidos de plomo (Pb) en carne de bovino no deben sobrepasar 0,1 mg/kg. En cuanto a los contenidos de mercurio (Hg), compuesto del tipo inorgánico presente como sales o vapor, no hay parámetros en carnes y sólo hace mención a metilmercurio, compuesto del tipo orgánico obtenido de la acción de bacterias, siendo éste el que está presente en peces y no debe estar con niveles superiores a 0,5 mg/kg.

Se demostró que las lombrices tienen la capacidad de bioacumular compuestos tóxicos en sus tejidos (metales pesados, aceites, plaguicidas, etc.) a través de su alimentación. A

raíz de esto, se utiliza como un bioindicador con el fin de determinar la calidad del suelo (Mara, 2010).

Debido a lo anterior, es necesario saber si esta acumulación de compuestos tóxicos origina un problema sanitario y sobrepasa la normativa vigente, a consecuencia de la alimentación de la lombriz con residuos orgánicos de ferias mayoristas. Vielma *et al.* (2007) y Medina *et al.* (2003) concluyeron que los contenidos de mercurio (Hg) y plomo (Pb) en la harina de lombriz se encuentran en el límite de lo que estipula el Reglamento Sanitario de los Alimentos y el *Codex Alimentarius*, presentando una probabilidad de riesgo para la salud humana.

Los valores para Vielma *et al.* (2007) fueron de 0,15 - 0,17 mg/kg de Hg y 1,9 - 2,5 mg/kg de Pb. Mientras que para Medina *et al.* (2003) estos fueron de 0,08 mg/kg de Hg y para Pb entre 2,5 - 5,8 mg/kg. Sin embargo, no se especifica de qué se componía el alimento de las lombrices para obtener dichos resultados.

6. Materiales y métodos

6.1. Condiciones de crianza y reproducción de lombrices

Los lechos de las lombrices estarán ubicados en el Centro Regional de Innovación Hortofrutícola de Valparaíso (Centro CERES), en la Comuna de Quillota, Región de Valparaíso (Latitud, 32°53'05.6"S; longitud, 71°12'26.3"W).

Se utilizarán lechos durante dos años y en dos periodos diferentes, uno en verano y el otro en invierno, de cada año respectivamente.

En cuanto a los análisis químicos, se derivarán a terceros, utilizando el servicio de AGQLabs & Technological Services y el Laboratorio de Asistencia Técnica (ASISTEC) de la Escuela de Alimentos de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV).

Los lechos de las lombrices tendrán una dimensión de 0,60 m de alto, 1 m de ancho y 1 m de largo cada uno, en el que se empleará una malla sobre los ensayos con el fin de evitar el ataque de aves u otros animales, y además favorecer la ventilación. La localización de los lechos será en sombra, para evitar que la radiación afecte la actividad de las lombrices (Selles *et al.*, 2006).

La materia orgánica que se utilizará como alimento para las lombrices provendrá de la Feria Mayorista La Calera (FEMACAL) de la Región de Valparaíso, Mercado Mayorista Lo Valledor de la Región Metropolitana y Macroferia Regional de Talca en la Región del Maule, siendo principalmente frutas y verduras. Se realizará una única recolección inicial de materia orgánica, correspondiente a un volumen de 0,6 m³ por cada lecho, siendo ésta la única fuente de alimentación durante los tres meses que dura el ensayo en verano y cuatro meses en invierno. Esta recolección se extenderá durante tres días consecutivos, siendo un día por cada región.

Los ejemplares (lombrices) utilizados serán solo adultos, los cuales se identificarán por el anillo clitelar. Se empleará inicialmente un núcleo de 2000 ejemplares de *E. foetida*.

Como realizó Durán y Henríquez (2009), previo al ingreso de las lombrices al lecho, se realizará un pre-compostado de los residuos orgánicos, de dos a tres semanas para otorgar las condiciones adecuadas a las lombrices, favoreciendo la adaptación y reproducción. Además, durante los 90 días que dura el experimento en verano y 120 días en invierno, se monitoreará la humedad (óptimo 70 – 80%) y temperatura de los lechos (20 – 35°C), además de las condiciones químicas de pH 7 (óptimo) y conductividad eléctrica (< 4 dS/m), ya que cualquier estrés provoca disminución en la tasa de reproducción e incluso la muerte de las lombrices.

6.2. Cosecha y secado de lombrices

Finalizado el ensayo a los 90 días en verano y 120 días en invierno, se realizará la cosecha de lombrices con la técnica empleada por García (2013). Se utilizará una malla de semi-sombra sobre el lecho de las lombrices, donde se les depositará residuos orgánicos semi-compostados húmedos (70 a 80% de humedad) sobre la malla, para provocar la atracción hacia la superficie, este proceso dura aproximadamente cuatro días y se debe repetir tres veces, teniendo un periodo de cosecha de entre 10 a 12 días. Sólo se seleccionarán ejemplares adultos, los cuales se identificarán por el anillo clitelar.

En cuanto al secado, se optará por el realizado por Cayot *et al.* (2009), en el que posterior a la cosecha, se lavarán por completo y se almacenarán en un recipiente con agua burbujeante por 12 horas. La muerte de las lombrices ocurrirá finalizadas las doce horas, con un shock térmico por un minuto con agua hirviendo y por último un secado en horno a

60°C por cuatro horas, considerando el peso constante del producto. Se trituran las lombrices deshidratadas, obteniendo un producto homogéneo, éste se almacenará en condiciones de refrigeración (4 a 6°C), para luego realizar los análisis de laboratorio.

6.3. Determinación de proteínas y aminoácidos

El contenido total de proteína y aminoácidos lo entregará ASISTEC de la Escuela de Alimentos de la PUCV.

Para el caso de la determinación de los contenidos de proteína, se utiliza el método Kjeldahl, el cual se basa en la determinación de los contenidos de nitrógeno en muestras orgánicas o inorgánicas. De acuerdo a la naturaleza del producto, harina proteica de lombriz, se utilizará 6,25 como factor de conversión para la valorización y cálculo de proteínas. Los resultados se expresarán en g/100g.

Para la determinación de aminoácidos, se utilizará el método 994.12 basado en una hidrólisis ácida con metabisulfito de sodio, descrito en A.O.A.C. (Latimer, 2016). Los resultados se expresarán en g/100g de muestra.

6.4. Determinación de metales pesados

Los análisis de plomo (Pb) y mercurio (Hg) se realizarán en AGQ Labs & Technological Services.

En cuanto a la determinación de Pb, se utilizará el método descrito en A.O.A.C. (Latimer, 2016) basado en espectrofotometría de absorción atómica de 217 a 283,3 nm. Los resultados serán expresados en mg/kg en base de muestra seca.

Para Hg, la determinación será realizada de acuerdo a lo descrito en A.O.A.C. (Latimer, 2016), en el que se debe generar vapor de Hg calentando la muestra, posteriormente se enfría y se realiza la valorización de acuerdo a la absorción en la trayectoria de la luz (253,7 nm) del espectrofotómetro de absorción atómica. Los resultados se expresarán en mg/kg.

6.5. Determinación de residuos de pesticidas

Los análisis para cuantificar la presencia de plaguicidas se realizarán en AGQ Labs & Technological Services.

Estas determinaciones están basadas en cromatografía gaseosa (GC) y cromatografía líquida (LC), utilizada para compuestos termoestables y menos termoestables, respectivamente. Se empleará el protocolo reportado por AGQ labs & technological Services, denominada la técnica QuEChERS “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe”, por sus siglas en inglés (Phenomenex®, 2012). Los resultados serán expresados en mg/kg de muestra.

6.6. Determinación de presencia microbiológica

La presencia de microorganismos se realizará a través del servicio de laboratorio de ASISTEC de la Escuela de Alimentos de la PUCV.

Para el caso de *E. coli*, se utilizará el método ISO16649-2:2001, el cual se basa en el recuento de colonias que crecen a 44°C en un medio sólido (triptona-bilis-glucuronido), ya que forman una coloración azul típica. La enumeración de *E. coli* β-glucuronidasa-positiva determina las unidades formadoras de colonias (UFC) por milímetro o gramo de muestra. Los resultados se expresan en UFC/g (ISO, 2001).

En el caso de *Salmonella spp.*, se empleará el procedimiento descrito en la norma NCh 2675.Of 2002, la cual consta de cinco fases: se comienza por un preenriquecimiento en agua peptonada (AT); luego un enriquecimiento selectivo en medio líquido (caldo Selenito-Cistina o caldo SC; posteriormente un aislamiento en medio sólido de agar Xilosa Lisina DEoxicolato (XLD) y agar Salmonella-Shigella; y finalmente la confirmación bioquímica (fermentación de glucosa, sacarosa, producción de H₂S) y la confirmación serológica (INN, 2002), los resultados se expresan por presencia o ausencia en la muestra.

6.7. Análisis estadístico

El ensayo cuenta con tres tratamientos y tres repeticiones por cada tratamiento. Se realizarán ensayos, durante el verano y en invierno.

Se identifica como factor, la procedencia de la materia orgánica utilizada (FEMACAL, Lo Valledor y Macroferia Regional de Talca). La unidad experimental (UE) son 1000 ejemplares de lombrices de cada lecho, siendo el experimento un Diseño Completamente Aleatorio (DCA) 1X3. Se realizará análisis de varianza (ANOVA) de un factor con tres niveles. Los ciclos verano e invierno serán analizados de manera independiente.

Las variables de respuesta del ensayo se obtendrán de los análisis químicos de la harina de lombriz, en el que se cuantifica la cantidad de proteína y aminoácidos, la concentración de plomo (Pb) y mercurio (Hg), concentración de residuos de pesticidas y la presencia microbiológica (*E. coli* y *Salmonella spp.*)

7. Resultados esperados

Cuadro 1. Resultados esperados de cada Objetivo específico.

Objetivo específico	Resultado esperado
1. Cuantificación de proteína y aminoácidos.	Sobre el 60% de proteína y todos los aminoácidos esenciales presentes.
2. Determinar si la harina de lombriz sobrepasa los LMR.**	Se espera que los analitos presentes en la muestra no superen el LMR descritos para cada ingrediente activo.
3. Comparar y cuantificar la presencia de metales pesados en la harina de lombriz.**	Metales pesados no superen Límite máximo permisible. Pb < 0,1 mg/kg ; Hg < 0,5 mg/kg.
4. Determinar la presencia microbiológica en la harina de lombriz.**	Sin presencia de <i>Salmonella spp.</i> , y recuento de microorganismos aerobios mesófilos < a 10 ⁶ UFC/g de muestra.

(**) = De acuerdo a lo estipulado en el Reglamento Sanitario de los Alimentos.

Fuente: Elaboración propia, 2018.

8. Presupuesto

Los costos y gastos del proyecto se resumen en el Cuadro 2:

Cuadro 2. Presupuesto proyecto de Harina de Lombriz para consumo humano para dos años.

Ítem	CLP
Inversión en infraestructura (sombreadero, lombriceras, riego, equipos)	1.765.242
Costos directos (núcleos lombrices y análisis químicos, cosecha, secado, molienda)	23.851.416
Costos operacionales (Agrónomo, obrero)	26.400.000
Costo movilización (traslado materia orgánica)	1.200.000
Imprevistos 5%	2.660.833
TOTAL	55.877.491

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Fondo concursable al cual se postulará el proyecto será el II Concurso IDeA en Dos Etapas del Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDEF) de CONICYT.

Lo anterior, debido a que el proyecto Harina de Lombriz para consumo humano cumple con los requisitos básicos para postular a este programa, ya que el fondo concursable tiene como objetivo “apoyar financieramente la ejecución de proyectos de investigación científica y tecnológica con potencial impacto económico y/o social, cuyos resultados sean obtenidos, evaluados y validados en plazos breves” (CONICYT, 2015).

9. Plan de trabajo

El plan de trabajo se extiende por dos años, y a final de cada año se realizará un informe anual que resume los datos obtenidos durante verano e invierno.

Durante el periodo que las lombrices se están alimentando y reproduciendo, se realizará monitoreo de las condiciones del compost, en relación a la CE, humedad y temperatura.

Las labores y sus tiempos quedan resumidas en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Carta Gantt proyecto Harina de Lombriz para consumo Humano, dos años.

Actividades y objetivos específicos	2019												2020												2021		
	Año 1												Año 2												Año 3		
	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb
1. Condiciones de crianza y reproducción de lombrices	X					X							X					X									
1.1. Construcción de lechos para lombrices	X					X							X					X									
1.2. Recolección única de materia orgánica	X					X						X						X									
1.3. Precompostado de materia orgánica	X	X				X	X					X	X					X	X								
1.4. Adquisición de lombrices (<i>E. Foetida</i>)	X					X						X						X									
1.5. Monitoreo de las condiciones de crianza y reproducción de lombrices		X	X	X			X	X	X	X	X			X	X	X			X	X	X	X					
2. Cosecha y secado de lombrices																											
2.1. Cosecha con atracción a la superficie					X						X						X						X				
2.2. Secado de lombrices					X						X						X						X				
2.3. Triturado de lombrices (harina)					X						X						X						X				
3. Determinación de proteínas y aminoácidos Objetivo 1																											
3.1. Envío de muestras para análisis de determinación proteína y aminoácidos (ASISTEC PUCV)												X						X					X				
4. Determinación de metales pesados Objetivo 2																											
4.1. Envío de muestras para análisis de determinación Pb y Hg (Lab suelos y análisis foliar PUCV)					X						X						X						X				
5. Determinación de residuos de pesticidas Objetivo 3																											
5.1. Envío de muestras para análisis de determinación de residuos de pesticidas (AGQ Labs)					X						X						X						X				
6. Determinación microbiológica Objetivo 4																											
6.1. Envío de muestras para la determinación de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella spp.</i> (ASISTEC PUCV)					X						X						X						X				
7. Análisis de datos																											
7.1. Interpretación de resultados entregados de laboratorios						X						X						X						X			
7.2. Informe anual													X												X		
7.3. Informe final																										X	

Fuente. Elaboración propia, 2018.

10. Bibliografía

- Alcívar-Cedeño, U., A. Dueñas-Rivadeneira, E. Sacon-Vera, L. Bravo-Sanchez, y C. Villanueva-Ramos. 2016. Influencia de los tipos de secado para la obtención de harina de Lombriz Roja californiana (*Eisenia foetida*) a escala piloto. *TecnologíaQuímica* 36(2):187-196.
- Arenas, L., A. Vidal, D. Huerta-Sánchez, Y. Navas, S. Uzcátegui-Bracho y N. Huerta-Leidenz. 2000. Análisis comparativo proximal y de minerales entre carnes de iguana, pollo y res. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50(4) : 409-415.
- Boulogne, S., E. Marquez, Y. García, A. Medina, y P. Cayot. 2008. Optimización de la operación de secado de la carne de lombriz (*Eisenia andrei*) para producir harina destinada al consumo animal. *Ciencia e Ingeniería* 29: 91–96.
- Cayot, N., P. Cayot, E. Bou-Maroum, H. Laboure, B. Abad-Romero, K. Pernin, N. Seller-Alvarez, A. Hernandez, E. Marquez, and A. Medina. 2009. Physico-chemical characterisation of a non-conventional food protein source from earthworms and sensory impact in *arepas*. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 2303–2313.
- Ccasani, N. y A. Poma. 2012. Evaluación de la densidad poblacional, peso y longitud de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) alimentadas con estiércol y compost de bovino y ovino. 49 p. Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de Huancavelica, Huancavelica, Perú.
- CONICYT. 2015. Aprueba de bases y forato tipo de convenios para el II Concurso Idea e dos Etapas del Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico-FONDEF de CONICYT Resolución Afecta N° 237. 125 p. Ministerio de Educación, Santiago, Chile.
- Cuervo, M.,M. Corbalán, E. Baladía, L. Cabrerizo, X. Formiguera, C. Iglesias, H. Lorenzo, I. Polanco, J. Quiles, M. Romero de Ávila, G. Russolillo, A. Villarino, y J. Martinez. 2009. Comparativa de las Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR de los diferentes países de la Unión Europea, de Estados Unidos (EEUU) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS). *Nutr. Hosp.* 24: 384–414.

Durán, L. y C. Henríquez. 2009. Crecimiento y reproducción de la lombriz roja (*Eisenia foetida*) en cinco sustratos orgánicos. *Agronomía Costarricense* 33(2): 275-281.

FAO. 1995. Codex Alimentarius norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. Adoptada en 1995 Revisión: 1997, 2006, 2008, 2009 Enmienda: 2010, 2012, 2013, 2014, 2015 CODEX STAN 193-1995. 62 p. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, Italia.

FAO. 2012. Día Mundial del Agua: se requieren 1.500 litros de agua para producir un kilo de granos, Señala FAO. Disponible en <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/229495/>. Leído el 2 de enero 2017.

FAO. 2015a. Composición de la carne. Disponible en http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html. Leído el 15 de abril de 2017.

FAO. 2015b. Panorama de la Inseguridad Alimentaria en América Latina y el Caribe. 66 p. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, Italia.

FAO. 2017. Composición de la Carne. Disponible en http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html. Leído el 31 marzo 2017.

FAO y OPS. 2017. 2016 América Latina y el Caribe, Panorama de la Seguridad Alimentaria y Nutricional, Sistemas Alimentarios Sostenibles para poner fin al hambre y la malnutrición. 163 p. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Panamericana de la Salud, Santiago, Chile.

Frazier, W. y D. Westhoff. 1993. Microbiología de los alimentos. 681 p. 4a ed. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.

García, I. 2013. Incremento en la eficiencia de la cosecha de lombriz *Eisenia foetida* en lombricompostaje de RSO en esquema productivo. *Revista Iberoamericana para la investigación y el Desarrollo Educativo* 10: 416–435.

Girón, M. 2006. Evaluación de dos métodos en la extracción de lombriz coqueta roja (*Eisenia foetida*), tradicional y capas en la producción de lombrihumus. 27 p. Licenciado

en Zootecnia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad de Guatemala, Guatemala.

Gobierno de Chile. 2015. Cuidemos el agua: Cifras y recomendaciones. Disponible en <http://www.gob.cl/cuidemos-el-agua/>. Leído el 24 de mayo de 2017.

INIA. 2012. Informe técnico final, Proyecto “Fortalecimiento de la competitividad del rubro hortofrutícola mediante la producción de alimentos inocuos en la R.M.” 2° Etapa COD. BI N° 30107725-0. 41p. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Santiago, Chile.

Instituto de Estudios del huevo. 2018. Composición Nutricional del Huevo. Disponible en <http://www.institutohuevo.com/composicion-nutricional-del-huevo/>. Leído el 12 abril de 2018.

Instituto Nacional de Normalización. 2002. NCh 2675:2002 Productos hidrobiológicos – detección de salmonella. 31 p. INN, Santiago, Chile.

International Organization for Standardization. 2001. ISO 16649-2:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* -- Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl Beta-D-glucuronide. 8 p. ISO, Berna, Switzerland.

Latimer G. (Editor). 2016a. Official Methods of Analysis. Volumen I. 20th Edition. AOAC INTERNATIONAL. Rockville, Maryland, USA.

López, A. 2012. Evaluación de cinco densidades poblacionales y dos fuentes de alimentación en la producción de lombriabono y carne de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*). 62 p. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.

Mara, A. 2010. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. Acta Zoológica Mexicana Número especial 2: 95-107.

Medina, A., J. Cova, A. Vielma, P. Pujic, M. Carlos and J. Torres. 2003. Immunological and Chemical Analysis of Proteins from *Eisenia foetida* Earthworm. Food and Agricultural Immunology 15: 255–263.

Ministerio de Agroindustria (Argentina). 2017. Huevo, un alimento para aprovechar al máximo. 8 p. Ministerio de Agroindustria Presidencia de la Nación Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Ministerio de Salud. 1997. Reglamento Sanitario de los alimentos. Modificada Dto. 29/16, Minsal D.OF. 12/10/16. 171 p. Ministerio de Salud, Santiago, Chile.

Ministerio de Salud. 2010. Fija tolerancias máximas de residuos de plaguicidas en alimentos y deja sin efecto la resolución N° 581 exenta, de 1999, y sus modificaciones. 99p. Subsecretaría de Salud pública, Santiago, Chile.

MMA. 2017. Tercer reporte del Estado del Medio Ambiente. 196 p. Ministerio del Medio Ambiente, Santiago, Chile.

ONU. 2006. Rearing cattle produces more greenhouse gases than driving cars, UN report warns. Available at <http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=20772#.WGs-j1V9601>. Accessed 2 January 2017.

OPS. 2015. Clasificación de los alimentos y sus implicaciones en la salud. Disponible en http://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=documentos-2014&alias=456-clasificacion-de-los-alimentos-y-sus-implicaciones-en-la-salud&Itemid=599. Leído el 13 de abril de 2017.

Paoletti, M., E. Buscardo, D. Vanderjagt, A. Pastuszyn, L. Pizzoferrato, Y. Huang, L. Chuang, M. Millson, H. Cerda, F. TorresandR. Glew. 2003. Nutrient content of earthworms consumed by Ye'Kuana Amerindians of the Alto Orinoco of Venezuela. *Biological Science*. 270: 249–257.

Phenomenex®. 2012. roQQuEChERS Kits, Una solución más sencilla de QuEChERS para análisis de multi residuos en alimentos. Disponible en: http://phx.phenomenex.com/lib/br95920712_I_Sp.pdf. Leído el 20 de mayo 2018.

Sales, F. 1996. Harina de lombriz, alternativa proteica en trópico y tipos de alimento. *Folia Amazonica* 8: 70–90.

Selles, G., R. Ferreyra, R. Ahumada, M. Santelices, J. García, P. Huidobro y R. Ruiz. 2006. Lombrices de tierra como agentes Mejoradores de las Propiedades Físicas del

Suelo en Huertos Frutales. 92 p. Boletín INIA N°140. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Santiago, Chile.

Sellés, G. y P. Riquelme. 2013. Capítulo 3: Huella Hídrica de Uva de mesa. 27 – 35. *In* Osorio, A. Determinación de la huella del agua y estrategias de manejo de recursos hídricos. Serie Actas N°50. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Serena, Chile.

SIO. 2018. The Keeling Curve. Available at <https://scripps.ucsd.edu/programs/keelingcurve/>. Accessed 15 June 2018.

Statista. 2018. Global number of livestock 2012-2018. Available at <https://www.statista.com/statistics/263963/number-of-pigs-worldwide-since-1990/>. Accessed 11 June 2018.

The World Bank. 2015. High and dry climate Change, Water, and the Economy. 4 p. The World Bank, Washington DC, United States.

Vielma, R., J. Ovalles, A. León y A. Medina. 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). *ArsPharmaceutica* 44(1): 43-58.

Vielma, R., P. Carrero, C. Rondón y A. Medina. 2007. Comparación del contenido de minerales y elementos trazas en la harina de lombriz de tierra (*Eisenia foetida*) utilizando dos métodos de secado. SABER. Revista Multidisciplinaria del consejo de investigación de la Universidad de Oriente 19: 83–89.

Vielma, R., D. Rosales, Y. Rosales, A. Medina y J. Villarreal. 2008. Perfil Electroforético y Calidad Microbiológica de la Harina de Lombriz *Eisenia fetida*. *Rev. Chil. Nutr.* 35:225-234.

Vilema, R. y A. Medina. 2006. Determinación de la composición química y estudios de solubilidad en la harina de lombriz *Eisenia foetida*. *Revista de la Facultad de Farmacia* 48(1): 2-8.

Zhenjun, S., L. Xianchun, S. Lihui and S. Chunyang. 1996. Earthworm as a potential protein resource. *Ecology of Food and Nutrition* 36: 221–236.