

# **ARCHEAS HALÓFILAS COMO CAUSA DE ALTERACIONES EN TRIPAS BOVINAS SALADAS**



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**TESIS DOCTORAL**

**Mónica María Bertacchi Pepe**

Dirigida por:  
**Dra. María Jesús Pagán Moreno**  
**Dr. Andrés Gil Rodríguez**

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**“Archeas halófilas como causa de alteraciones en tripas  
bovinas saladas”**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Mónica María Bertacchi Pepe**

Dirigida por:

**Dra. María Jesús Pagán Moreno**

**Dr. Andrés Gil Rodríguez**

Valencia/Montevideo, enero de 2016

*“La investigación científica original comienza en el preciso momento en que la sabiduría nos deja en la ignorancia”*

**Clemente Estable**

*Dedico esta tesis a mi madre Olga y a mi padre Gualberto, quienes me educaron en la exigencia académica; a mis queridos abuelos, a mi incondicional compañero de vida Eduardo y a mi hijo Federico, a quien le digo que no hay edad para continuar con la formación y que con esfuerzo todo se puede lograr. A mi hermana Patricia y a su familia, quienes me ayudaron a realizar la Maestría, que me abrió camino a esta nueva etapa hoy.*

## AGRADECIMIENTOS

Una vez culminada esta tesis, quiero detenerme un instante para agradecer a todos aquellos que a lo largo de estos años han contribuido para hacer posible el presente trabajo; a ellos mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de tesis, los *Doctores María Jesús Pagán y el Dr. Andrés Gil Rodríguez*, quienes fueron mi soporte desde el punto de vista académico y humano. A *Chus*, le agradezco por su apoyo constante a pesar de la distancia y la diferencia horaria, y por su exigencia permanente que, sin dudas, contribuyó sustancialmente a mejorar esta investigación.

Un agradecimiento muy especial a mi hermano, *Dr. Claudio Gaucher Pepe*, por su apoyo incondicional durante los años de investigación, cuando aún la idea de la tesis no existía y era sólo una inquietud. A él le debo también el ingreso al apasionante mundo de la geología que me permitió conocer el problema desde sus orígenes e investigar las posibles soluciones.

A la *Dra. Cristina López*, compañera de investigación y amiga, que me abrió las puertas del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UdelaR para desarrollar la investigación. Me brindó su asesoramiento durante toda esta etapa de estudio de las

arqueas halófilas, realizando valiosos aportes en el área de la microbiología de alimentos.

A *Pablo Costabel y a la Familia Pastorino*, que hicieron posible el estudio del proceso industrial y, en gran medida, la presente investigación, aportando información y el material indispensable para este estudio.

Agradezco a la *Dra. Andrea Quadrelli*, por su infinita paciencia, el constante ánimo brindado y por su profesionalismo que enriqueció, en todo momento, el documento de la tesis.

A los excelentes profesionales de nuestro país que colaboraron en la investigación: los Doctores *Fernando Dutra, Silvia Villar, Alejandro Márquez, Claudia Etchebehere, Gonzalo Greif, Teresa Bellizi, Ing. Alim. Rosana Reinares*. Y, especialmente, a mi gran amigo y colega *Daniel Pérez*, de quien aprendí tanto.

Por otro lado, es preciso agradecer también a destacados investigadores de diversos países: *Dra. Elida Ramírez; Ing. María Isabel Yeannes; Dr. Joris Wijnker; Prof. Aharon Oren; Prof. Antonio Ventosa; Prof. Francisco Rodríguez Valera y Prof. Bill Grant*. Todos ellos respondieron siempre a mis consultas con un gran aporte de conocimiento y, por tanto, con una gran contribución a esta investigación.

A *Graciela Bossio, Julio Dorta, Carlos Baptista, Gabriela Petrone y Roberto Avelino*, que con su experiencia laboral en el

“área de la tripa” me brindaron un aporte difícil de encontrar en cualquier bibliografía.

También quisiera mencionar a mi amiga Liliana Alarcón, por su actitud solidaria y su apoyo constante.

Por último, a quienes fueron un soporte fundamental en toda esta etapa de mi vida; a mi familia, a mi esposo *Eduardo Galagorri*, a mi hijo Federico Galagorri, por su gran paciencia y respeto por mi trabajo; y a mis sobrinas, *Sofía Rossi* y *Serrana Bertacchi*, por su ayuda incondicional en todo momento.

## RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo es el análisis, descripción, caracterización e incidencia de las coloraciones rosadas, rojo y anaranjadas observadas en tripas bovinas saladas (intestinos), prontas para su comercialización. Para ello, en el curso de tres años, se realizó una investigación en dos establecimientos de faena para evaluar el proceso industrial de obtención de intestinos bovinos (proceso primario); y en tres triperías, para estudiar el proceso secundario de industrialización de las tripas bovinas saladas. También se asistió a un establecimiento procesador de sal. Se realizó una evaluación sensorial de los productos contaminados y se recolectaron muestras de sal, tripas vacunas y agua para estudios microbiológicos, físico-químicos, moleculares e histológicos. Este trabajo concluye que los microorganismos responsables de las alteraciones son arqueas halófilas extremas identificándose los géneros *Haloarcula*, *Halogranum* o *Haloterrigena* y *Haloferax*. Las arqueas ingresan al sistema por contaminación cruzada a través de la sal de grado alimentario. Los estudios muestran que una carga extremadamente baja de arqueas halófilas extremas es suficiente para su desarrollo. Por otro lado, se encontró una baja incidencia del problema, entre un 2.3% y un 3%, siendo necesarios mayores estudios para mejores definiciones en este sentido. De acuerdo con las observaciones realizadas, se constatan coloraciones rosadas, rojas y anaranjadas en la sal y

salmuera de la superficie de las tarrinas con tan sólo 20 días de almacenamiento y hasta un año y medio. Por otra parte, la microscopía electrónica de barrido y los estudios histológicos, muestran que estos microorganismos halófilos pueden formar biopelículas, adhiriéndose a la superficie de la tripa, alterando su estructura histológica y, por lo tanto, sus propiedades al momento de la elaboración de embutidos. En los establecimientos estudiados se constató que, a pesar de adoptar todas las medidas para garantizar la inocuidad del producto (GMP, SSOP y HACCP), se presentaban alteraciones de calidad en el producto. En conclusión, se trata de un problema subestimado a nivel industrial, donde las medidas preventivas desempeñan un papel fundamental.

Palabras claves: arqueas; halófilas; industria de los alimentos; sal; tripas bovinas; biopelículas.

## RESUM

L'objectiu principal d'este treball va ser l'anàlisi, descripció, caracterització i incidència de les coloracions rosa, roig ataronjades observades en budells bovins salats (intestins), promptes per a la seua comercialització. Per a això, en el curs de tres anys, es va realitzar una investigació en dos establiments de faena per a avaluar el procés industrial d'obtenció d'intestins bovins (procés primari); i en tres triperies, per a estudiar el procés secundari d'obtenció de budells bovins salats. També es va assistir a un establiment processador de sal. Es va realitzar avaluació sensorial dels productes contaminats i es van recol·lectar mostres de sal, budells vacunes i aigua per a estudis microbiològics, fisicoquímics, moleculars i histològics. Este treball conclou que els microorganismes responsables de les alteracions són arqueges halòfiles extremes identificant-se els gèneres *Haloarcula*, *Halogramum* o *Haloterrigena* i *Haloferax*. Les arqueges ingressen al sistema per contaminació encreuada a través de la sal de grau alimentari. Els estudis mostren que una càrrega extremadament baixa d'arqueges halòfiles extremes és suficient per al seu desenrotllament. Per un altre costat, es va trobar una baixa incidència del problema, entre un 2.3% i un 3%, siguent necessari majors estudis per a obtindre mijors definicions en aquet sentit. D'acord amb les observacions realitzades, es constaten coloracions roig ataronjades en la sal i salmorra de la superfície de les terrines amb tan sols 20 dies

d'emmagatzemament i fins a un any i mig. D'altra banda, la microscòpia electrònica de rastreig i els estudis histològics mostren qu'aquets microorganismes halòfils poden formar biofilms, adherint-se a la superfície del budell, alterant la seua estructura histològica i, per tant, les seues propietats al moment de l'elaboració d'embotits. En els establiments estudiats es va constatar que, a pesar d'adoptar totes les mesures per a garantir la innocuïtat del producte (GMP, SSOP i HACCP), es presentaven alteracions de qualitat en el producte. En conclusió es tracta d'un problema subestimat a nivell industrial, i on les mesures preventives exercixen un paper fonamental.

Paraules Clau: arqueges; halòfiles; indústria dels aliments; sal; budells bovins; biofilms.

## SUMMARY

The main objective of this study was the analysis, description, characterization and impact of red, orange or purple colorations observed in salted bovine casings (intestines), ready for marketing. To achieve this, over the course of three years, an investigation was conducted in two slaughterhouses to assess the industrial process of obtaining cattle intestines (primary process); and three tripe shops to study the secondary process of obtaining salted bovine casings. A salt processing establishment was also visited. A sensory evaluation of the contaminated products was performed, and samples of salt, bovine casings, and water were collected and subjected to physico-chemical, microbiological, molecular, and histological analyses. Our study concludes that the microorganisms responsible for the color alterations are extremely halophilic archaea, *Haloarcula*, *Halogramum* or *Haloterrigena* and *Haloferax* being the identified Genus. Archaea enter the system by cross-contamination through food grade salt. Our studies show that an extremely low load of extremely halophilic archaea is sufficient for its development. On the other hand, a low incidence of the problem was found, between 2.3% and 3%, further studies must be developed for a better definition in this regard. According to our observations red, orange and purple colorations can be found in the salt and brine from the surface of open-head drums with only 20 days of storage, and up to a year and a half. Furthermore, the scanning electron microscopy

and histological studies showed that these halophilic microorganisms can form biofilms, adhering to the casings' surface, altering its histological structure, and therefore their properties when making sausages. In the establishments surveyed it was found that, despite all the measures taken to ensure product quality and safety (GMP, SSOP and HACCP), quality changes in the product were present. We conclude that this is a problem underestimated at an industrial level, and where preventive measures play a major role.

Keywords: archaea; halophile; food industry; salt; bovine casings; biofilms.

# ÍNDICE GENERAL

I. Introducción .....	24
I.1. Tripa Bovina.....	24
I.2. Industria de la Tripa Bovina.....	29
I.3. Breve caracterización anátomo-histológica del intestino bovino.....	33
I.4. Clasificación de las tripas bovinas .....	37
I.4.1. Calibre .....	38
I.4.2. Alteraciones de la pared .....	38
I.5. Comercialización .....	41
I.6. La sal y su importancia en la cons. de alimentos .....	44
I.6.1 Acción de la sal sobre los microorganismos y los alimentos. ....	45
I.6.2. Principales fuentes de sal en la naturaleza .....	49
I.7. La sal y las arqueas halófilas .....	53
II. Justificación .....	61
III. Objetivos y Plan de trabajo.....	65
III.1. Objetivos .....	65
III.1.1. Objetivo general .....	65
III.1.2. Objetivos específicos .....	65
III.3. Plan de trabajo.....	66
IV. Materiales y Métodos.....	69
IV.1. Análisis y evaluación de los procesos .....	69
IV.1.1. Proceso primario. Proceso industrial de obtención de intestino bovino. ....	69
IV.1.2. Proceso de obtención de sal industrial comestible a partir de sal importada.....	70

IV.1.3. Proceso secundario. Proceso industrial de obtención de tripa bovina salada. ....	70
IV.2. Metodología Analítica .....	71
IV.2.1. Análisis petrográfico de la sal.....	71
IV.2.2. Inspección sensorial de la tripa. ....	73
IV.2.3. Determinaciones microbiológicas.....	74
IV.2.3.1. Detección y aislamiento de arqueas halófilas en los componentes del sistema. ....	78
IV.2.3.2. Recuento de arqueas halófilas.....	80
IV.2.3.3. Detección de microorganismos patógenos: <i>Salmonella spp.</i> y <i>Staphylococcus Aureus</i> .....	80
IV.2.4. Determinación de pH y $a_w$ en tripas bovinas saladas prontas para comercializar.....	82
IV.2.5. Pruebas bioquímicas bacteriológicas.....	82
IV.2.6. Estudios de morfología celular. ....	83
IV.2.6.1. Frotis y tinción GRAM. ....	83
IV.2.6.2. Microfotografía.....	83
IV.2.6.3. Microscopía electrónica.....	83
IV.2.6.4. Estudios histológicos.....	85
IV.2.7. Caracterización molecular. ....	86
V. Resultados y Discusión .....	88
V.1. Evaluación del proceso de obtención de intestino .....	88
V.2. Evaluación del proceso de obtención de sal industrial comestible a partir de sal importada .....	101
V.2.1. Análisis petrográfico. ....	105
V.3. Evaluación del proceso industrial de procesamiento de tripa bovina. ....	108

V.4. Inspección sensorial de tripas listas para su comercialización .....	123
V.5. Determinaciones microbiológicas .....	128
V.5.1. Detección y cuantificación de arqueas halófilas en los componentes del sistema.....	129
V.5.2. Detección de arqueas halófilas en tripas bovinas saladas. ....	132
V.5.3. Aislamiento de arqueas halófilas.....	134
V.5.4. Cuantificación de arqueas halófilas.....	135
V.5.5. Detección de patógenos <i>Salmonella spp.</i> y <i>S. Aureus</i> en tripas saladas.....	136
V.6. Análisis de pruebas bioquímicas. ....	137
V.7. Determinación de pH y $a_w$ .....	138
V.8. Estudios de morfología celular. ....	142
V.8.1. Frotis, tinción GRAM y microfotografías. ....	142
V.8.2. Microscopía electrónica de barrido . ....	148
V.8.3. Estudio histológico.....	154
V.9. Caracterización molecular. ....	160
VI. Conclusiones.....	168
VI.1. Conclusiones.....	168
VI.2. Reflexiones.....	173
VI.3. Recomendaciones.....	174
VII. Referencias bibliográficas.....	177

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Valores microbiológicos recomendados (UFC/g) (Wijnker <i>et al.</i> , 2006) .....	43
Tabla IV.1. Composición del medio Agar TSL (Tryptona-Sal-Extracto de levadura) .....	77
Tabla IV.2. Composición del medio APHA para halófilas.....	77
Tabla IV.3. Ciclo de PCR .....	86
Tabla V.1. Valores de producción .....	120
Tabla V.2. Resultados de la comparación de las secuencia del gen del ARNr de 16S con Cepa 1.....	165
Tabla V.3. Resultados de la comparación de las secuencia del gen del ARNr de 16S con Cepa 2.....	166
Tabla V.4. Resultados de la comparación de las secuencia del gen del ARNr de 16S con Cepa 3.....	167

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Diferentes tipos de tripas artificiales: poliamida, celulosa y colágeno .....	28
Figura I.2. Proceso de embutido. ....	30
Figura I.3. Tripas en “tubbing”. ....	31
Figura I.4. Detalles del aparato digestivo vacuno.....	34
Figura I.5. Detalles del intestino delgado y grueso.....	34
Figura I.6. Esquema general del intestino (W.B. Saunders Company, 2002) .....	36
Figura I.7. Detalle de alteraciones en la pared de la tripa, en este caso, por formaciones nodulares o granos de origen parasitario. ....	38
Figura I.8. Detalle de alteraciones en la pared de la tripa por granos blancos y ventanas de diferente tamaño. ....	40
Figura I.9. Exportaciones de tripa bovina salada en Uruguay en el período 2009-2014. ....	41
Figura I.10. Detalle del proceso de cristalización fraccionada para la recuperación de sal marina.....	50
Figura I.11. Salina Grande en Jujuy, Argentina a 3.450 metros de altura; (a) vista general con polígonos (grietas de desecación), (b) cristales retorcidos de sal.....	51
Figura I.12. Eflorescencia en Salina Grande, Argentina .....	52
Figura I.13. Árbol filogenético.....	54
Figura II.1. Coloraciones rojizas en tripa bovina salada.....	61

Figura II.2. Detalles del proceso de envasado de tripa bovina en tarrinas plásticas forradas con bolsas de polietileno, con agregado de salmuera. ....	62
Figura III.1. Plan de trabajo .....	66
Figura IV.1. Laminadora CONRAD WOCO 50 .....	73
Figura V.1. a) Detalle del atado del esófago y b) atado de culato (recto) en playa de faena.....	89
Figura V.2. Detalle separación de vísceras rojas y verdes .....	89
Figura V.3. Detalle de la separación del intestino delgado del grueso .....	90
Figura V.4. Detalle de operación de desorrillado-desebado ....	91
Figura V.5. Detalle de la operación mecánica de vaciado .....	93
Figura V.6. Detalle de la operación de virado.....	94
Figura V.7. Detalle de la operación de destapado. ....	95
Figura V.8. Detalle de la operación de vaciado .....	96
Figura V.9. Detalle de la operación de deseado.....	97
Figura V.10. Detalle de la operación de virado .....	97
Figura V.11. Diagrama de flujo del proceso primario .....	100
Figura V.12. Depósito de sal .....	101
Figura V.13. Línea de purificación y secado de la sal. ....	102
Figura V.14. Diagrama de flujo del proceso de obtención de sal comestible a partir de sal importada .....	104
Figura V.15. Muestras de sal analizadas.....	107
Figura V.16. Proceso de desarrado de tripa bovina .....	109
Figura V.17. En establecimiento procesador de tripas se observan las tripas desarradas en el transcurso de su clasificación por calidad y calibre .....	110

Figura V.18. Detalle del proceso de calibrado de la tripa desarrada insuflando aire comprimido en su interior y comparando con una escala ubica en la mesa .....	111
Figura V.19. Detalle del proceso de calibrado de la tripa desarrada.....	111
Figura V.20. Detalle del proceso de identificación de las madejas, una vez calibradas y armadas según las exigencias del cliente. En la figura pueden observarse, en segundo plano en las mesas, los hilos de colores. En primer plano, se utiliza un hilo rojo .....	113
Figura V.21. Proceso de salado a mano de las madejas luego de la calibración.....	114
Figura V.22. (a) Tripa orilla salada y (b) tripón salada previo a su almacenamiento .....	115
Figura V.23. Tripas Bovinas saladas almacenadas en tarrinas cerradas.....	116
Figura V.24. Puntos críticos de control del proceso de elaboración de tripas bovinas saladas (Bertacchi, 2000). .....	119
Figura V.25. Diagrama de flujo del proceso secundario.....	121
Figura V.26. a) Tripas bovinas saladas aptas para su comercialización; b) Coloraciones rosadas y naranjas en tripas bovinas alteradas almacenadas en salmuera .....	124
Figura V.27. Coloraciones observadas en tripas alteradas....	124
Figura V.28. Detalle de la coloración rojo anaranjada en tripa y granos de sal .....	125
Figura V.29. Coloración anaranjada y aspecto áspero .....	126
Figura V.30. Tripas con 20 días de almacenamiento con salmuera y sal de la superficie coloreada.....	127

Figura V.31. Crecimiento observado en pool de sal.....	130
Figura V.32. Siembra en superficie de sal en solución .....	130
Figura V.33. Sal en medio con 20% de NaCl con crecimiento de halófilas a los 27 días.....	131
Figura V.34. Aumento de la intensidad del color en las tripas alteradas y desarrollo de colonias alrededor en medio para halófilas extremas.....	133
Figura V.35. Desarrollo de colonias en tripas alteradas sembradas en superficie .....	134
Figura V.36. a) Repique en medio para halófilas extremas; b) Repique en agar inclinado, ambos con desarrollo de la coloración característica.....	135
Figura V.37. Gráfico control de valores de $a_w$ a 20°C.....	140
Figura V.38. Gráfico de control de valores de pH a 25°C .....	141
Figura V.39. a) Bacilos y cocos. Origen: Pool de sal; b) Innumerables bacilos GRAM negativos. Origen: tripa alterada (1er repique); c) Bacilos GRAM a menor densidad. Origen: tripa alterada (1er repique); d) Muchos cocos. Origen: Pool de Sal; e) Bacilos GRAM positivos y GRAM negativos. Origen: tripa alterada (1er repique); f) Bacilos y cocos GRAM negativos juntos. Origen: Pool de sal (1er repique) .....	144
Figura V.40. Resultados de las morfologías y respuestas a la tinción GRAM.....	147
Figura V.41. a) Biopelícula madura; b) A mayor aumento. ....	148
Figura V.42. Presencia de muchos cristales de sal.....	149
Figura V.43. Se indica una incipiente biopelícula de bacilos en círculo azul y una biopelícula madura en círculo rojo.....	151

Figura V.44. a) y b) Biopelículas incipientes señaladas en círculos rojos y bacilos señalados en verde .....	152
Figura V.45. a) El círculo rojo indica una biopelícula madura. Las flechas verdes señalan un bacilo adhiriéndose a la pared del tejido a través de nanotubos; b) biopelícula muy madura con gruesa cubierta de exopolisacáridos; c) bacilos. ....	153
Figura V.46. Muestras en preparación para histología, arriba: tripa normal, tripa con coloración roja pero recuperable, abajo tripa para descartar. ....	154
Figura V.47. a) Tripa “normal” con preservación de detalles tisulares; M: capa muscular lisa; b) Tripa “normal” con preservación de estructura histológica y detalles tisulares; M: capa muscular lisa (H&E x100). ....	157
Figura V.48. a) Tripa con pocas alteraciones (se reprocesa) con pérdida de detalles tisulares (M) y arqueas cocoides en superficie visceral; b) Tripa con pocas alteraciones (se reprocesa) con pérdida de detalles tisulares (M) y arqueas en superficie visceral (flechas; H&E x100). ....	158
Figura V.49. a) Tripa alterada que se descarta, con pérdida de detalles tisulares, ruptura y separación de los tejidos (R) y arqueas en superficie visceral invadiendo la pared; b) Tripa alterada que se descarta, con pérdida de detalles tisulares, ruptura y separación de los tejidos (R) y arqueas en superficie visceral invadiendo la pared (flechas; H&E x100). ....	159
Figura V.50. Al aplicar la tinción GRAM, el tejido muscular y las arqueas se observan GRAM negativas .....	160

## **ABREVIATURAS**

ABI: Applied Biosystems Inc.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APHA: American Public Health Association

APPCC (HACCP): Análisis de Peligro y Puntos Críticos de Control

CE: Comunidad Europea

CFR: Code of Federal Regulation

EEB: Encefalopatía Espongiforme Bovina

ENSCA: Asociación Europea de Tripas Naturales para Embutidos

GMP (BPM): Buenas Prácticas de Manufactura

H&E: Hematoxilina & Eosina

INSCA: Asociación Internacional de Tripas Naturales para Embutidos

IRAM: Instituto Argentino de Racionalización de Materiales

MER: Material Específico de Riesgo

NCBI: National Center for Biotechnology Information

OIE: Organización Internacional de Sanidad Animal

OMC: Organización Mundial de Comercio

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

SSOP (POES): Procedimientos Operativos Estandarizados de Limpieza y desinfección

TSL: Triptona-Sal-Extracto de levadura

UdelaR: Universidad de la República (Uruguay)

UE: Unión Europea

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1. TRIPA BOVINA

Las tripas naturales se definen como envolturas tubulares derivadas del tracto intestinal, principalmente de bovinos, ovinos, suinos o equinos, luego de haber sido sometidas a un proceso de limpieza y clasificación siendo, posteriormente, tratadas con sal (NaCl) y/o salmuera (solución saturada) o secadas. Mientras en los suinos se utiliza todo el intestino para la producción de tripas, en ovinos y equinos se utiliza solamente el intestino delgado (Wijnker, 2009). En bovinos, se descarta el duodeno y la porción distal del íleon por razones sanitarias que se explicaran más adelante.

Desde épocas antiguas se encuentran registros del uso de tripas en la elaboración de productos cárnicos embutidos, además de otros usos<sup>1</sup>. Hay referencias del año 4000 AC sobre la elaboración de salchichas por sumerios. En Babilonia, se encontró un grabado en tres tablas de arcilla del año 3700 AC donde se menciona un embutido cocido envuelto en estómago de cabra (Savic & Savic, 2002). En el año 589 AC se menciona, por primera vez, la salchicha China Lácháng que consiste en carne de cabra y cordero (Wijnker, 2009). En el libro “El

---

<sup>1</sup> En la Mesopotamia, en la ciudad de Ur, en las tumbas de los reyes Sumerios se encontraron cuerdas de arpas fabricadas con intestinos de origen animal (Savic & Savic, 2002).

banquete de los sofistas” (228 AC), de autor griego, también se nombra a los embutidos.

La elaboración de embutidos utilizando intestinos de animales sobrevivió a la caída del Imperio Romano y continuó a lo largo de la Edad Media. A fines de la misma, la demanda de tripas por la industria del chacinado<sup>2</sup> superaba a la oferta. De esta forma, las tripas saladas se convirtieron en una mercancía importante a lo largo del sur y centro de Europa, y los intestinos fueron considerados manjares (Savic & Savic, 2002).

En 1662, bajo el pseudónimo de Marcus Knackwurst, se escribió un libro que describía un gran número de fórmulas de embutidos destacando el uso de tripas. Con la Revolución Industrial mejoraron no sólo los métodos de conservación y procesamiento de la carne, sino también la fabricación de salchichas.

Durante la primera mitad del s. XX, los procesos de obtención de tripas naturales mejoraron. Se patentaron varias máquinas para la limpieza de los intestinos y se mejoró el control de calidad de las tripas obtenidas (Prince & Bernard, 1994). Asimismo, los controles sanitarios comienzan a ser más exigentes, no sólo por la tripa en sí, sino por el uso de sal y aditivos en el proceso de elaboración (Wijnker, 2009).

En 1818 Cincinnati era el hogar de la industria del envasado de carne y, posteriormente, la ciudad de Chicago en

---

<sup>2</sup> Comprende a las industrias que elaboran productos alimenticios a base de carne pura de cerdo o con mezcla (Cesáreo, 1967).

Estados Unidos se convirtió en el centro de la industria de la carne. Se realizaban grandes matanzas y los carniceros conservaban los intestinos como forma de pago (Savic & Savic, 2002). Las tripas de cerdo se convirtieron en un producto importante impulsando el origen de la industria de los proveedores de tripas. Algunas plantas de procesamiento de carne tenían sectores (tripería), completamente equipados.

Durante la época de la producción norteamericana de embutidos, las tripas animales jugaron un rol importante (Savic & Savic, 2002). Cuatro años después de la fundación constitucional de la Comunidad Económica Europea, en 1956, se fundó en París la Asociación Europea de Tripas Naturales para Embutidos (ENSCA). En sus inicios, la integraban exclusivamente empresas europeas, pero con el tiempo se incorporaron miembros asociados fuera de la eurozona. A su vez, la ENSCA es miembro de la Asociación Internacional de Tripas Naturales para Embutidos (INSCA), fundada en 1965, con un predominio de compañías americanas asociadas en el inicio, hoy con miembros de todos los continentes.

Estas asociaciones son de gran importancia para la promoción de las tripas naturales y su investigación. Sus aportes han sido de utilidad, especialmente, frente al surgimiento de problemas sanitarios como la Fiebre Aftosa y la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB). Desde estas asociaciones se han realizado investigaciones que permitieron volcar valiosos aportes a la comunidad científica.

Al mejorar los procesos de producción y aumentar la demanda se produjo un gran cambio en la tecnología de los envases para embutidos. Uno de los cambios más importantes fue el surgimiento de las llamadas tripas sintéticas o artificiales que consistió en el desarrollo de tripas de colágeno y celulosa regenerados con propiedades estructurales y funcionales apropiadas (Savic & Savic, 2002). Actualmente, se dispone de cuatro tipos de tripas elaboradas industrialmente: celulosa, colágeno no comestible, colágeno comestible y plástico. Las tripas de colágeno comestible e incomedible se elaboran a partir de piel y cueros (Forrest *et al.*, 1975). Por otra parte, las tripas de celulosa se emplean principalmente en salchichas tipo Frankfurt que se comercializan sin tripas.

En embutidos cocidos, que no se someten al ahumado, se pueden utilizar tripas de plástico. Generalmente, están formadas de un copolímero de polivinilo y cloruro de polivinilo o polietileno (Price & Schweigert, 1994).

Porcelli (1985) clasifica a las tripas en tres categorías; además de las naturales, identifica tripas artificiales o semi-sintéticas y sintéticas (figura I.1).



**Figura I.1.** Diferentes tipos de tripas: poliamida, celulosa y colágeno.

Las tripas sintéticas proceden de materias primas de alto peso molecular, derivadas de la industria química o petroquímica. Se elaboran, entre otros, a partir de poliamidas y polimerizados mixtos de cloruro de polivinilideno, polipropileno y polietileno (Porcelli, 1985).

Según Coretti (1986), las tripas artificiales no suelen presentar problemas microbiológicos, ya que por sus características fisicoquímicas la contaminación microbiana es escasa.

La materia prima de las tripas artificiales puede ser de origen vegetal o animal, reestructuradas por diferentes procesos. Generalmente, son fibras de colágeno (origen animal) o celulosa (origen vegetal).

Las tripas artificiales presentan algunas ventajas frente a las naturales: son fáciles de pelar, de calibre uniforme, resistentes a la rotura; algunas son comestibles (colágeno), otras son impermeables y se pueden imprimir. Algunas son

contráctiles (se adaptan a la reducción del contenido cárnico), permiten la automatización de los procesos, no son tóxicas y se conservan por largos períodos (Müller & Ardoíno, 1983). Además, no requieren preparación especial antes de su uso (Varnam *et. al.*, 1995).

## **I.2. INDUSTRIA DE LA TRIPA BOVINA**

Las tripas naturales han sido los envases tradicionales para los productos cárnicos embutidos. El material utilizado es la capa de colágeno que da fuerza a la porción del tracto intestinal utilizado; la capa interna se elimina (Price & Schweigert, 1994).

La industria de la tripa, en general, utiliza el término "tripa natural" para definir los intestinos que han sido tratados después de la limpieza. El tratamiento más común se realiza mediante el uso de sal (NaCl) o salmuera (solución saturada de sal). Otro término utilizado con frecuencia es el de "tripas originales" que se aplica a aquellas tripas que no han sido clasificadas. La palabra "tripas" también se utiliza para otros productos no relacionados con los intestinos, como la vejiga y el esófago (Wijnker, 2009, 2013).

Las tripas naturales dan al producto una apariencia artesanal y se les atribuyen otras ventajas como ser comestibles, económicas, elásticas, con alta permeabilidad a

los gases, humo y vapor, no aportan sabores indeseables y permiten una unión íntima entre las proteínas de la tripa y la masa embutida (Karmas, 1974; Müller & Ardoíno, 1983).

Forrest *et al.* (1975) mencionan como una de sus características más importantes el hecho de encogerse y adaptarse a la superficie del embutido, permaneciendo en contacto, aún cuando el embutido pierde humedad (figura I.2).



**Figura I.2.** Proceso de embutido.

Las tripas saladas se utilizan en la industria del chacinado para la fabricación de productos crudos, cocidos, curados y, algunas veces, sólo sirven de continente para la fermentación y/o almacenamiento del producto hasta su consumo.

La salazón de las tripas disminuye su elasticidad y su resistencia durante el embutido, por lo que se recomienda el desalado de la tripa al momento de su uso. Para ello, se sumergen en un baño con ácidos orgánicos (acético o láctico) que, al mismo tiempo, reduce la contaminación bacteriana<sup>3</sup> (Bakker *et al.*, 1999).

Actualmente, hay otras formas de presentación de la tripa natural, la tripa corrugada, en “tubbing” o preentubada (figura I.3).



**Figura I.3.** Tripas en “tubbing”

Las tripas se salan, clasifican, se corrugan (forman los tubbings) y envasan al vacío. Al retirarlas del envase se transfieren directamente al cuerno de embutir reduciendo, de este modo, el trabajo (Kondaiah & Chatierjee, 1979; Price & Schweigert, 1994). Otras ventajas mencionadas se relacionan

---

<sup>3</sup> El baño no debe ser muy concentrado o aplicarse por largo tiempo pues las tripas se fragilizan. Un baño de 1% de ácido acético no daña la tripa y no requiere enjuague (Duran *et. al.*, 2008).

con una mayor velocidad en el proceso de embutido y un menor volúmen para su almacenamiento.

La industria de la tripa natural ha evolucionado a lo largo del tiempo y, a pesar de la industrialización y consiguiente estandarización del proceso, continúan existiendo diferencias con respecto al proceso de producción y elaboración en los distintos países o regiones. Dicho proceso aún mantiene como característica una producción artesanal, con adaptaciones específicas según la región, donde el trabajo manual ocupa un lugar de importancia y define el aspecto artesanal del producto como un valor agregado y un sello diferencial del mismo.

En este sentido, en los establecimientos estudiados en Uruguay se destaca ese trabajo manual, que se inicia en los frigoríficos, donde el uso del cuchillo y la tijera, acompañados de las manos del operario, desempeña un rol fundamental en los distintos procesos. En dichas actividades se observa una diferencia de género importante. Así, las actividades realizadas en la planta frigorífica y las tareas de salado son desempeñadas principalmente por hombres, mientras que las referidas al proceso de clasificación de las tripas vacunas son realizadas, en su mayoría, por mujeres. Este último proceso exige una gran meticulosidad donde el accionar de las manos, junto con los sentidos de la vista y el tacto, resultan

fundamentales para detectar defectos o no, en la clasificación de las tripas y posterior calibrado (ver apartado I.4.)<sup>4</sup>.

### **I.3. BREVE CARACTERIZACIÓN ANATOMO-HISTOLÓGICA DEL INTESTINO BOVINO**

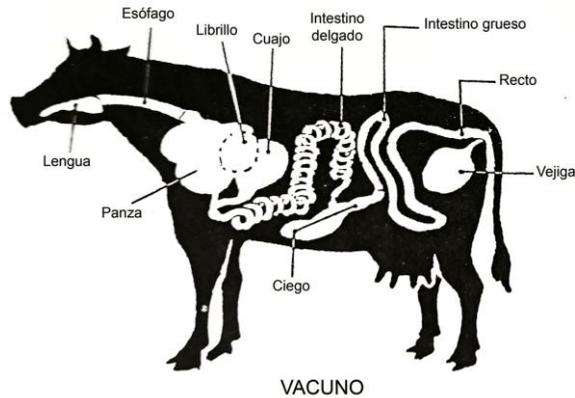
Como se indicó antes, las tripas vacunas provienen del tracto digestivo de los bovinos y se utilizan como envases naturales para alimentos.

Según Porcelli (1985), el tracto intestinal de los ovinos, suinos y bovinos no presenta grandes variaciones, tiene una estructura similar a lo largo del mismo, variando en su diámetro y en el grosor de sus paredes.

En el bovino, el intestino se divide en delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y grueso (ciego, colon y recto) (figura I.4.) El duodeno mide aproximadamente 1 metro de longitud y no es utilizado en la industria de la tripa. Se lo denomina “tripa amarga” (Delfino, 1989); en el mismo desemboca el conducto biliar (a unos 60 cm del píloro) y el conducto pancreático accesorio (que lo hace a unos 30 cm caudal del conducto biliar) (Sisson & Grossman, 1982).

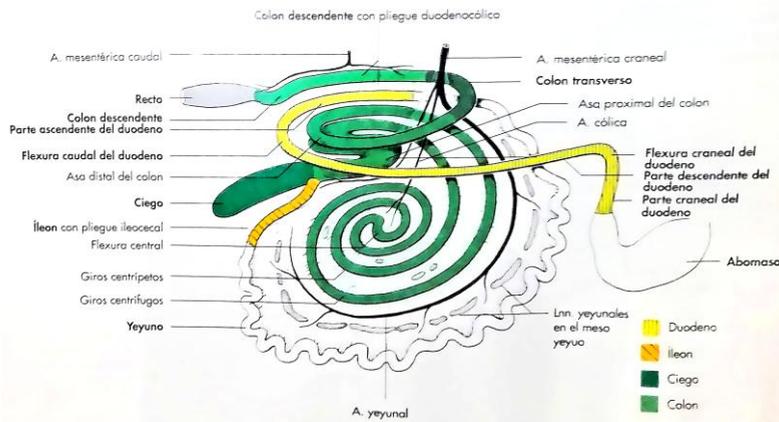
---

<sup>4</sup> También hace a toda esta “cultura tripera” la frecuente reserva con respecto al proceso de producción y a los ingredientes utilizados. Es posible constatar la existencia de recetas guardadas con mucho recelo, casi “secretas”, que pueden provenir de una tradición familiar o de una forma particular de preparar la tripa.



**Figura I.4.** Detalles del aparato digestivo vacuno.

Por razones sanitarias, luego de la aparición de la EEB, tampoco se utiliza la porción distal del íleon, dado que la misma constituye uno de los llamados materiales específicos de riesgo (MER). El íleon es la porción terminal del intestino delgado (figura I.5).



**Figura I.5.** Detalles del intestino delgado y grueso (Dyce *et al.*, 2007).

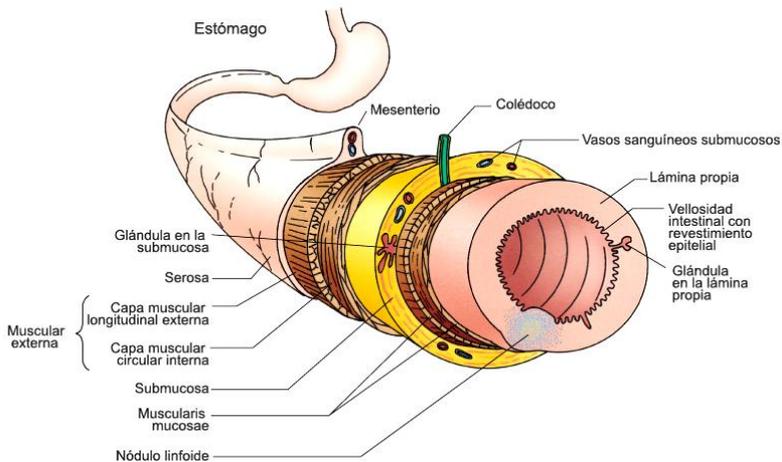
En los establecimientos de faena cuando los intestinos llegan a la sección tripería se procede a la separación del íleon, comenzando en la unión ileocecal y cortando proximalmente hacia el yeyuno un tramo de 210 cm. Este trozo de intestino es desechado para su destrucción posterior. El yeyuno forma numerosos pliegues dispuestos en festones alrededor del borde del mesenterio y antes de unirse al íleon se prolonga en una serie de asas en forma de U, sobre una extensión del mesenterio (Sisson & Grossman, 1982).

Como se indicó antes, el intestino grueso se divide en ciego, colon y recto. El ciego es un saco con un extremo cerrado y recibe el nombre de “tripón”. El extremo abierto del ciego se continúa con la porción inicial del colon. El colon es la porción más larga del intestino grueso, con una longitud media de 10 metros (Castro *et al.*, 1981). El colon es ascendente, transversal y descendente y constituye la “tripa salame”. Su extremo posterior se continúa con el recto, la porción más corta del intestino grueso conocido por el nombre de “culato”.

Todo el tracto intestinal se une a la pared dorsal de la cavidad abdominal por el mesenterio (repliegue de la serosa peritoneal). Esta serosa forma pliegues que cubren parcialmente la masa intestinal (Castro *et al.*, 1981).

Es necesario agregar algunas palabras sobre la estructura de la pared del intestino para comprender el proceso industrial de obtención de tripas naturales y, así, poder evaluar las alteraciones que se pueden presentar.

La histología de la pared intestinal se describe en cuatro capas que, desde afuera hacia adentro, se identifican como: serosa, muscular, submucosa y mucosa (Castro *et al.*, 1981) (figura I.6.).



**Figura I.6.** Esquema general del intestino (Saunders Company, 2002).

La capa serosa está constituida por dos partes: una superficial formada por células epiteliales planas (mesotelio) y una capa de tejido conjuntivo laxo, rica en tejido adiposo, además de colágeno y elastina (Salvat, 1974).

La capa muscular está compuesta de músculo liso con dirección circular y una capa muscular longitudinal con alto contenido de colágeno. Ambas capas actúan simultáneamente determinando los movimientos peristálticos del intestino.

La capa submucosa está formada por tejido conjuntivo denso, rico en fibras colágenas y elastina.

Por último, hacia la luz intestinal, se encuentra la mucosa definida como “sarro” por Delfino (1989) y formada por tres láminas: (a) el epitelio cilíndrico simple y sus células con microvellosidades; (b) el corion, constituido por tejido conjuntivo; (c) la mucosa formada por células musculares lisas dispuestas en una delgada capa que limita la mucosa de la submucosa (figura I.6).

## **I.4. CLASIFICACIÓN DE LAS TRIPAS BOVINAS**

La clasificación de las tripas se realiza en base a dos elementos; el primero se refiere a su *calibre* que se define como el ancho de la tripa cuando se llena de aire. El segundo elemento hace referencia a la calidad del producto y se relaciona con la presencia o no de alteraciones en la pared de la tripa.

### **I.4.1. CALIBRE**

La presentación del producto para su comercialización es muy variada, siendo una de las más frecuentes las madejas de 15, 18, 30 y 50 metros de la tripa orilla y salame, dependiendo de las preferencias del cliente y del mercado. Los calibres de las tripas que forman las madejas varían en tripa

orilla de 34 a 50+ (expresado en mm), en tripa salame de 45 a 65+ y en los tripones de 100 a 140+.

#### I.4.2. ALTERACIONES DE LA PARED

Las tripas frescas pueden presentar alteraciones en la pared que van a incidir en la calidad y en el precio de su comercialización. Es frecuente encontrar formaciones nodulares, de origen parasitario, que asientan en la submucosa del intestino delgado y en el ciego. Estos nódulos son de tamaño variables, duros, de color gris pálido o negruzco, y pertenecen a formaciones larvianas del género *Oesophafostomun* (nematodo), dentro de una estructura conjuntiva (Pellegrini *et al.*, 1986), (figura I.7).



**Figura I.7.** Detalle de alteraciones en la pared de la tripa, en este caso, por formaciones nodulares o granos de origen parasitario.

Este parásito, en su fase adulta, vive en la luz intestinal donde deposita sus huevos microscópicos que se eliminan con

la materia fecal. Cuando el bovino ingiere los huevos al pastar, al llegar al intestino delgado eclosionan y dejan en libertad unas larvas microscópicas, fase joven del parásito, que atraviesan la mucosa y se alojan en la submucosa. El organismo huésped reacciona tratando de aislarlas, pues se trata de cuerpos extraños, y se genera una proliferación de tejido fibroso que enquistas cada larva. Luego de un período de tiempo, las larvas abandonan la submucosa y el grano, y se dirigen a la luz intestinal para parasitar como adulto y recomenzar el ciclo. El grano sin larva involuciona lentamente hasta desaparecer (Pellegrini *et al.*, 1986).

Si los granos son pocos se continúa el proceso de preparación de la tripa para su comercialización como tripa de segunda calidad o “tripa doméstica” y su precio es menor. Se destina, por ejemplo, a productos como la morcilla que al teñirse pasan desapercibidos. Si los nódulos son muchos la tripa no es apta para consumo humano y se descarta (Pellegrini *et al.*, 1986).

Delfino (1989) describe otras alteraciones como la rayadura, el espumado, el estirado y el agujero.

La **rayadura** o ventana es una erosión de la pared del intestino que abarca sólo parte del espesor de la pared, sin llegar a atravesarla de lado a lado; falta parte del tejido de la pared, lo cual provoca que, en esa zona, la tripa sea más débil. Se observa insuflando con aire la tripa desarrada (sin mucosa), y se visualiza como zonas irregulares de menor densidad y

mayor transparencia a la luz. Se produce principalmente al desorillar y desebar la tripa por acción del filo del cuchillo o tijera sobre los tejidos (figura I.8).



**Figura I.8.** Detalle de alteraciones en la pared de la tripa, en este caso, por granos blancos y ventanas de diferente tamaño.

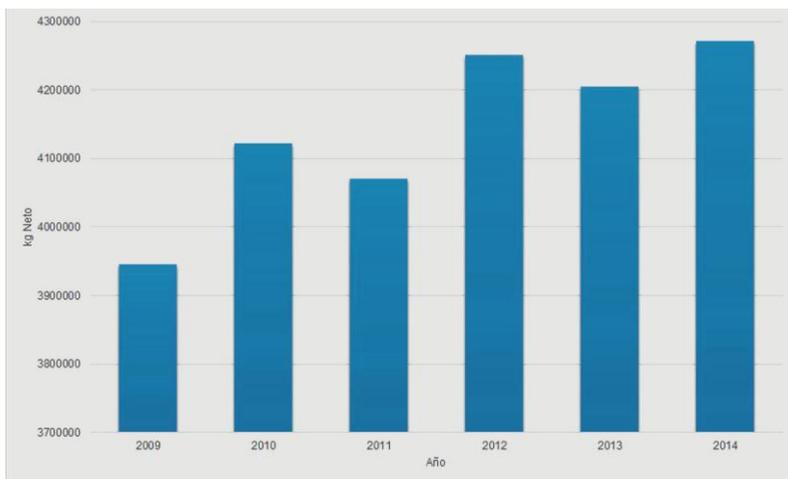
Si una mala maniobra perfora de lado a lado la tripa, estamos en presencia de **agujeros** que pueden ser de distintos tamaños.

Otra alteración es el **espumado** que se produce al inflar con aire la tripa para calibrarla y éste se infiltra en el espesor de la pared. Según Delfino (1989), se debe a que las fibras musculares longitudinales se separan parcialmente dejando ranuras entre sí.

Por último, cuando por causa de tracciones excesivas (manuales o mecánicas), que superan la resistencia de la tripa, se produce una distensión longitudinal, estamos frente a un **estiramiento**, defecto que se produce principalmente al realizar el virado de la tripa.

## I.5. COMERCIALIZACIÓN

El rubro tripas naturales es un área de creciente desarrollo en el comercio internacional. En la figura I.9 se muestra un gráfico correspondiente a las exportaciones de Uruguay para el período 2009-2014.



**Figura I.9.** Exportaciones de tripa bovina salada en Uruguay en el período 2009-2014.

El intercambio comercial de tripas entre países se realiza bajo estrictas normas sanitarias, en especial luego de la aparición de la EEB. Las normas se basan en las recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal (O.I.E).

El reglamento de la Unión Europea (UE) 853/2004 define a los intestinos tratados como intestinos que han sido sometidos a tratamientos, como salado, calentamiento o secado, después de haberse extraído y limpiado. La decisión de la Comisión Europea (CE) 2004/414 establece las condiciones sanitarias y el certificado veterinario para la importación de tripas de animales procedentes de terceros países. En los requisitos del certificado sanitario de la UE se establece que las tripas de animales deben estar limpias, sin sarro (mucosa) y saladas con NaCl (Cloruro de Sodio) durante 30 días, o blanqueadas, o secadas. Las tripas de vacunos pueden importarse a la UE sólo si proceden de animales originarios de países declarados con riesgo insignificante de EEB, según la Decisión 2007/ 453 / CE. Estados Unidos, por su parte, exige además la extracción de la porción distal del íleon en el Código de Regulación Federal (CFR), 9 CFR 310.22 (a) (3).

La exigencia de 30 días de salado por parte de la UE permite garantizar la eliminación del virus de la Fiebre Aftosa. Wijnker (2009) investigó la viabilidad de dicho microorganismo luego de inocular tripas ovinas y suinas, salarlas y almacenarlas durante 30 días a 20°C y 4°C. En el almacenamiento a 20°C no se encontró el virus a partir de los 30 días. Cuando las tripas naturales son saladas y/o inmersas en salmuera saturada por ese período, las bacterias patógenas tampoco están presentes, a excepción de esporas bacterianas

de poco riesgo, mientras se mantengan las condiciones de almacenamiento (Wijnker, 2009).

En la industria de las tripas naturales el salado es considerado entonces como un punto crítico de control en el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) para lograr la inocuidad del producto y, además, como medida de protección para el comercio internacional. Después de un período de 30 días, las temperaturas específicas de almacenamiento ya no son necesarias (Wijnker, 2009). En la tabla I.1, se muestran los valores microbiológicos recomendados para las tripas naturales saladas (Wijnker *et al.*, 2006).

**Tabla I.1.** Valores microbiológicos recomendados (UFC/g) (Wijnker *et al.*, 2006).

---

<b>Especie</b>	<b>Totalmente aceptable</b>	<b>Valor máximo</b>	<b>Método de referencia</b>
Aerobios mesofilos	$<1,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^6$	ISO 4833
Enterobacteriaceae	$<1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$	ISO 21528-2
<i>Staphylococcus aureus</i>	$<1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	ISO 6888-1
Clostridios sulfitorreductores	$<1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	ISO 15213

---

De esta forma, el salado es un excelente método de conservación que tiene como objetivo principal reducir el contenido de agua en la tripa natural dejando muy poca agua disponible para el crecimiento bacteriano.

## **I.6. LA SAL Y SU IMPORTANCIA EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS**

La sal (Cloruro de Sodio, NaCl) es un actor fundamental en la producción de tripas naturales, ya sea como sal seca o salmuera saturada<sup>5</sup>, con o sin otros ingredientes agregados.

La sal es el medio de conservación más antiguo que se conoce, utilizado desde hace más de 5000 años (Hughes, 1994; Adams & Moss, 1995). La historia de la conservación de los alimentos se remonta a épocas prehistóricas (Sinell, 1981). El libro del Génesis (41,35) relata cómo el almacenamiento de alimentos permitió al hombre sobrevivir en períodos de hambruna. Desde la antigüedad, la sal ha sido fundamental para la conservación de alimentos y para el curado de carnes y pescados (Huges, 1994). Entre los años 3000 y 1200 AC los judíos utilizaron la sal del mar Muerto para conservar diversos alimentos. Los chinos y los griegos usaron en sus dietas las salazones de pescado, y se cree que los últimos transfirieron

---

<sup>5</sup> Las salmueras de 25° Bé se denominan saturadas (Amo, 1980).

esta práctica a los romanos, cuya dieta incluyó las carnes adobadas (Jay, 2005)<sup>6</sup>.

La sal también fue moneda de cambio en las rutas de los mares Egeo, Adriático y Mediterráneo, siendo objeto de impuestos y tributos en los países asiáticos desde épocas remotas. Se utilizó también como dinero en el Tíbet y Etiopía. De hecho, el término salario deriva de la palabra *salarium*, vocablo latino que aludía a la asignación de sal que se entregaba a los soldados que servían en el ejército romano.

Antes de su explotación minera, la obtención de sal marina se realizaba con grandes esfuerzos, demandaba mucho tiempo y dependía, en gran medida, de las condiciones climáticas. Por esta razón, en la antigüedad, la sal era considerada un artículo de lujo (Sinell, 1981). Como necesidad humana básica, su obtención implicó, desde el comienzo, expediciones, guerras, conquistas y comercio (Lopes Barbosa, 1973)<sup>7</sup>.

### **I.6.1. Acción de la sal sobre los microorganismos y los alimentos**

El rol de la sal como conservador de alimentos se debe a que inhibe el crecimiento de la mayoría de los

---

<sup>6</sup> También se ha utilizado para preservar los cueros crudos y, en el antiguo Egipto, para conservar cuerpos humanos (Ventosa & Nieto, 1995).

<sup>7</sup> En la India, a partir de la Primera Guerra Mundial, surge el proceso independentista y su líder, Mahatma Gandhi, impulsó la abstención del pago de impuestos, particularmente, del impuesto a la sal (Venkatesh, 1982).

microorganismos cuando se utiliza en concentraciones elevadas. Generalmente, se considera que a concentraciones del 10% detiene el crecimiento de numerosos microorganismos; concentraciones del 5% actúan solamente sobre microorganismos anaerobios (Girard, 1991).

Una concentración alta de sal ejerce un efecto de desecación sobre los alimentos y los microorganismos. Por difusión, el agua se desplaza desde la zona de mayor concentración a la de menor, saliendo de las células en un porcentaje mayor a su ingreso, por tanto, una consecuencia principal es la plasmólisis<sup>8</sup>, que se traduce en la inhibición del crecimiento y posible muerte (Jay, 2005). Cuando hablamos de crecimiento microbiano nos referimos al número de células y no al tamaño de ellas (Tortora *et. al.*, 2010).

En los alimentos salados, la sal retiene el agua, por lo que el NaCl influye perjudicialmente sobre el crecimiento de los microorganismos al descender la actividad de agua ( $a_w$ )<sup>9</sup> del producto.

El agua es un factor fundamental en el control del crecimiento microbiano y de las reacciones químicas en los alimentos. Sin embargo, es la disponibilidad de agua en los alimentos, más que la cantidad, lo que determina la inhibición (Fehlaber & Janetschke, 1995; Montville & Matthews, 2009).

---

<sup>8</sup> Disolución del protoplasma celular.

<sup>9</sup> Disponibilidad de agua en un alimento; es el cociente entre la presión de vapor de agua del alimento y la del agua pura a la misma temperatura (Warriss, 2003).

Las bacterias no crecen cuando los valores de  $a_w$  son inferiores a 0,75 (Warriss, 2003). De este modo, los microorganismos pueden ser directamente eliminados debido a la presión osmótica por diferencia de concentración.

Por otra parte, la mayoría de los microorganismos, incluyendo las bacterias patógenas, crecen más rápido a niveles de  $a_w$  entre 0,995 – 0,980 (ICMSF, 1980a). La mayoría de las bacterias patógenas presentes en los alimentos no crecen a  $a_w < 0.92$  ó para una concentración de sal superior al 10% (Barbosa *et.al*, 1998).

La sal, además de reducir el  $a_w$ , posee una acción bacteriostática debido, simultáneamente, a la influencia del NaCl sobre los sistemas enzimáticos, al efecto tóxico del catión sodio sobre las células microbianas y a la reducción del número de microorganismos por plasmólisis (Czerner, 2011; Czerner & Yeannes, 2014).

Por otra parte, los mohos xerofílicos, las levaduras osmofílicas y las arqueas halofílicas<sup>10</sup> pueden crecer a actividades de agua bajas y necesitan de la sal para su crecimiento.

Otras acciones de la sal se relacionan con su influencia sobre el poder de retención de agua de la carne, según ya se mencionó, y como agente de sapidez o aporte de gusto salado. Asimismo, aumenta la solubilidad de las proteínas musculares

---

<sup>10</sup> Xerófilo se refiere al organismo capaz de vivir o que vive mejor en ambientes muy desecados; osmófilo, que crece mejor en presencia de elevados niveles de solutos y halófilo, que necesita NaCl para crecer (Broock *et al.*, 2009).

(manifestando sus propiedades como emulsificante y ligante), también favorece la oxidación y el enranciamiento de las grasas, lo cual constituye un efecto no deseado (Girard, 1991). La sal es, además, el ingrediente principal usado en el curado (Jungk, 1972).

Al estudiar la acción conservadora del NaCl debe prestarse especial atención a su posible acción sinergista y otros factores intrínsecos (como el pH), y extrínsecos (como la temperatura, entre otros)<sup>11</sup>.

La sal utilizada para la preservación de alimentos debe ser de calidad alimentaria, según las restricciones incluidas en el *Codex Alimentarius* (*Codex Stan* 150-1985 1), que se refieren, fundamentalmente, a las características físico-químicas de la sal. La Organización Mundial del Comercio (OMC) toma como referencia dicho *Codex* para resolver diferencias comerciales entre países. De tal modo, las normas oficiales de cada país adoptan los criterios expresados en el *Codex*.

Dado los orígenes diversos de la sal, a seguir detallamos algunas de sus fuentes principales en la naturaleza.

---

<sup>11</sup> La acción conjunta de la sal y el pH constituyen un importante sistema conservador en el queso (Board, 1988).

### I.6.2. Principales fuentes de sal en la naturaleza

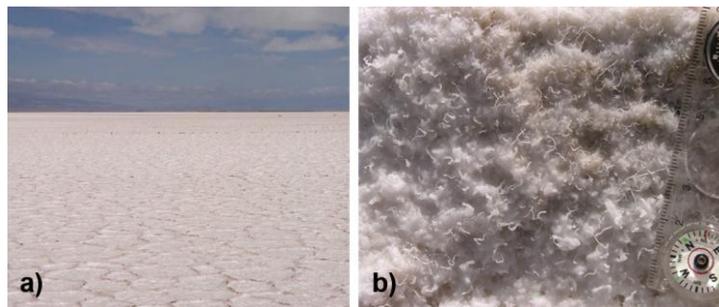
Los océanos contienen, probablemente, la mayor parte de la sal existente en el planeta, es decir, **sal marina**. En éstos la salinidad es de 34 a 36 gramos de sal por litro y aproximadamente el 83% (28 a 29 g/l) corresponde a cloruro de sodio. Los mares tienen una salinidad prácticamente igual, dependiendo del ingreso de agua dulce (Lopes Barbosa, 1973). La recuperación de sal marina se realiza, habitualmente, por cristalización fraccionada en una serie de salinas de poca profundidad, usando el calor solar para la evaporación, así se concentra la sal (beneficiamiento) (figura I.10). Enseguida, se lava con una solución saturada de salmuera y se almacena.

En las regiones tropicales se debe hacer una perfecta limpieza de las salinas y depósitos, a fin de evitar crecimiento de microorganismos que vuelven a la sal inapropiada para fines de conservación, precisamente, por causa de la coloración rosada que se desarrolla en ciertos alimentos, particularmente en los pescados (Lopes Barbosa, 1973).



**Figura I.10.** Detalle del proceso de cristalización fraccionada para la recuperación de sal marina.

La sal también puede obtenerse a partir de **lagos salados**, como el Lago Salado de Utah (EEUU) que tiene 203 g/l de sal (88% NaCl). El Mar Muerto es un lago salado situado a 300 metros bajo el nivel del océano con 200 a 300 g/l de sal. Muchos lagos salados, donde predomina el cloruro de sodio, son fuente de sal para las poblaciones de sus alrededores, como en los altiplanos de Chile, Bolivia, Argentina y Centro de Asia (Lopes Barbosa, 1973) (figura I.11).



**Figura 1.11.** Salina Grande en Jujuy, Argentina a 3.450 metros de altura; (a) vista general con polígonos (grietas de desecación), (b) cristales retorcidos de sal (Gentileza Dr. Claudio Gaucher Pepe).

Las **salmueras subterráneas** son mantos de agua salada resultantes de la lixiviación (disolución) de capas salinas en profundidad o aguas residuales de mares antiguos. Muchas de ellas contienen casi exclusivamente cloruro de sodio, otras están contaminadas por sales de magnesio y potasio. Muchas veces las salmueras subterráneas están relacionadas con yacimientos de petróleo, otras veces contienen altas concentraciones de yodo (Lopes Barbosa, 1973).

En regiones de clima árido (escasas precipitaciones y elevada evaporación), las sales que circulan disueltas en el agua subterránea son conducidas hasta la superficie y allí el agua se evapora y forma las **eflorescencias superficiales** (figura I.12) que, a veces, constituyen espesas capas que cubren el suelo. Este es un fenómeno generalizado en los altiplanos del norte argentino, norte de Chile, Sur de Perú y Bolivia (Lopes Barbosa, 1973).



**Figura I.12.** Eflorescencia en Salina Grande, Argentina  
(Fuente: <http://tectonicablog.com/?p=2049>).

Por último, encontramos **yacimientos de sal gema o sal de roca** formados por masas salinas contenidas en estratos sedimentarios del subsuelo, formando estratos o domos. Los depósitos de sal gema se presentan casi siempre con un elevado grado de pureza, siendo explotados por galerías o por solubilización con agua inyectada. En el primer caso, se obtiene un producto sólido, mientras que en el segundo se consiguen soluciones concentradas que deberán ser evaporadas o utilizadas en la industria directamente en solución. Gran parte de la sal de roca tiene una pureza de más del 98.3% y una vez triturada puede ser vendida para su uso inmediato, sin refinación (Lopes Barbosa, 1973).

## I.7. LA SAL Y LAS ARQUEAS HALÓFILAS

Las arqueas halófilas son procariontes extremófilos<sup>12</sup> que pertenecen al dominio Archaea, el cual se subdivide, a su vez, en crenarchaeotas y euryarchaeota (Ramírez *et al.*, 2004). A éste último pertenecen las halófilas (Priest, 1994; Montoya & Ramírez Jiménez, 2013)<sup>13</sup> (figura I.13).

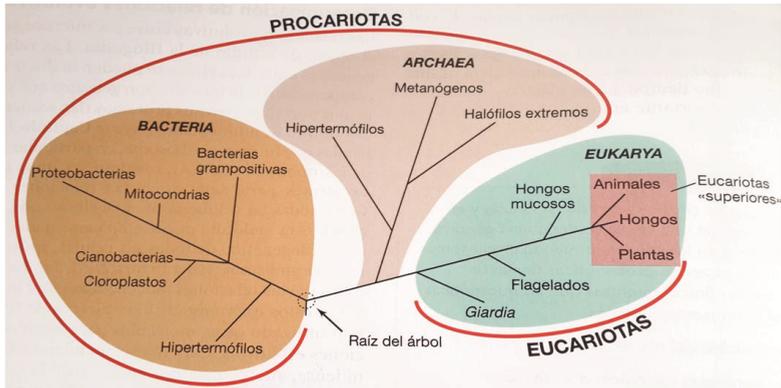
Las arqueas halófilas habitan ambientes hipersalinos, como los depósitos de evaporación de sal (Lopes Barbosa, 1973; Ventosa, 1989; Norton *et al.*, 1993) o hábitat salinos, como las superficies de alimentos salados<sup>14</sup>, mostrando gran capacidad de adaptación en ambientes extremos (Ventosa *et al.*, 1984; Ventosa, 1994; Sousa & Souza, 1997; Canales *et al.*, 2014).

---

<sup>12</sup> Microorganismos adaptados a condiciones ambientales muy difíciles de soportar para la mayoría de los seres vivos (Kushwaha *et al.*, 1982).

<sup>13</sup> Según análisis genéticos, estos microorganismos se agrupan en tres dominios: los eucariotas (Eukarya) y dos grupos de procariontes, las eubacterias (Bacteria) y las arqueobacterias (Archaea) (Tehei & Zaccai, 2005).

<sup>14</sup> Oren & Rodríguez Valera (2001) estudiaron lagos hipersalinos de Alicante y Baleares con presencia de coloraciones rojizas por causa de los pigmentos carotenoides o similares producidos por la presencia de microorganismos halófilos, principalmente de la familia Halobacteriaceae.



**Figura I.13.** Árbol filogenético de los seres vivos según secuenciación comparativa del gen del RNA ribosómico (Madigan *et al.*, 2009).

Algunos autores (Brown & Gibbons, 1955; Mossel *et al.*, 2006) señalan que estos microorganismos requieren medios de 3 a 5 M de NaCl y son capaces de multiplicarse en soluciones de NaCl saturadas, es decir, a un  $a_w$  de aproximadamente 0,75 (Sperber, 1983).

Es posible diferenciar entre halófilas discretas y moderadas para describir, en cada caso, requerimientos bajos (1-6%) y moderados (6 a 15%) de NaCl, respectivamente.

Los organismos capaces de crecer en ambientes muy salinos reciben la denominación de halófilos extremos y requieren entre 15 y 30% de NaCl para su crecimiento óptimo, pudiendo virtualmente desarrollarse a concentraciones de 32% de NaCl (Ventosa, 1994; Madigan *et al.*, 2009).

La mayoría son aerobias, pero algunos pueden crecer en anaerobiosis (Oren *et al.*, 1997; Oren & Litchfield, 1999).

Las arqueas halófilas se reproducen por fisión binaria y no forman esporas. *Halobacterium* y *Halococcus*, frecuentemente, presentan grandes plásmidos.

*Halobacterium* bombea grandes cantidades de  $K^+$  del entorno hacia el interior del citoplasma, así, la concentración de este ión es incluso mayor que la concentración de  $Na^+$  externo para mantener un balance hídrico positivo (Madigan *et al.*, 2009). De este modo, requieren sal en el medio para su crecimiento, si bien en su interior acumulan  $K^+$  (Ordoñez *et al.*, 1999), siendo este mecanismo el que permite su sobrevivencia en medios salinos (Montoya & Ramírez Jiménez, 2013).

Según Bergey (2001), dentro del Phylum Euryarchaeota se encuentra las Halobacterias y, dentro de éstas, el Orden Halobacteriales. En este Orden encontramos la Familia I Halobacteriaceae con varios géneros, entre ellos, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Natronobacterium*.

Las Halobacteriales (*halobacterias* o *haloarcheas*) pueden presentarse bajo la forma de bacilos, cocos y una multitud de formas pleomórficas, incluyendo triángulos, cuadrados y discos. La mayoría de las colonias presentan colores rojos y rosados por la presencia de pigmento carotenoide (Oren, 2000; Oren & Rodríguez Valera, 2001).

Algunas haloarqueas pueden realizar la síntesis de ATP (Hartmann *et al.*, 1980), dependiente de luz, en ausencia de pigmento clorofílico, por lo cual no se considera fotosíntesis. No obstante, intervienen pigmentos sensibles a la luz como

carotenoides rojos y naranjas, principalmente bacterioruberinas y otros pigmentos implicados en la conservación de la energía.

En condiciones de poca aereación *Halobacterium salinarum* y otros halófilos extremos sintetizan bacteriorodopsina (proteína), la cual absorbe energía luminosa y bombea un protón que atraviesa la membrana citoplasmática. Cuando las bacterias pasan de un ambiente de mucha aereación a otro de poca cambian su coloración de rojo anaranjado a rojo púrpura porque se dispara la síntesis de bacteriorodopsina (Madigan *et al.*, 2009). En este sentido, Ripoll (1992) describe alteraciones de color en el pescado salado estacionado en pilas, con humedad del orden de 55%, identificando como responsables a grupos halofílicos. El cambio de coloración va acompañado de proteólisis y olores desagradables.

Las arqueas halófilas pueden ser introducidas en el proceso industrial de elaboración de tripa bovina no a través de la contaminación original de los intestinos, sino a través de la sal utilizada como agente de conservación, aunque ésta cumpla con el grado alimentario (Wijnker, 2009). Si bien las halófilas son de poca relevancia desde el punto de vista de la inocuidad alimentaria, desempeñan un papel importante en la calidad de la tripa. Actúan alterando el producto provocando olores desagradables, coloraciones rosadas y anaranjadas, y proteólisis de la tripa por crecimiento bacteriano (Wijnker, 2009).

También los productos de pescado, como los salados o fermentados, se deterioran debido a microorganismos halófilos y halotolerantes provocando sabores extraños (sulfuroso, afrutado) en los arenques salados en húmedo (Huss, 1997). Se han identificado arqueas halofílicas (*Halococcus* y *Halobacterium*) como responsables de la coloración rojiza/rosada en el pescado salado, en la salmuera y en la sal (Huss, 1997).

Félix *et al.*, (2007) encontraron bacterias halófilas en anchoita (*Engraulis anchoita*) salada-madurada con una actividad de agua ( $a_w$ ) de 0,75 a 0,80. De 100 muestras, el 71% de las colonias halladas fueron halófilas extremas y el 29% estrictas. De acuerdo con sus características bioquímicas, 31% eran *Halococcus spp.*; 15% *Haloferax spp.*; 5% *Halobacterium spp.* y 7% *Haloarcula spp.* El resto se encuentra aún sin identificar. De las bacterias halladas, un 30% tienen actividad proteolítica, 30% lipolítica y 15% proteolítica y lipolítica, lo que podría llevar a alteraciones irreversibles y no deseables en el alimento referido a características sensoriales como olor, color y textura.

También se han reportado daños en cueros vacunos (Birbir *et al.*, 1996) aislando e identificando como responsables a microorganismos halófilos (el 70% de ellos eran capaces de degradar la proteína). Se utilizan bactericidas comerciales como solución a este problema (Birbir & Bailey, 2001).

En las tripas saladas, la flora natural intestinal muere y únicamente persisten las arqueas halotolerantes y halófilas obligadas (ICMSF, 1980b). En tripas sometidas a salazón húmeda también pueden encontrarse *Proteus* y unos pocos lactobacilos (ICMSF, 1980b). Si la concentración de sal es baja o la temperatura de almacenamiento es muy alta, las bacterias proteolíticas (*Proteus*, *Pseudomonas*) pueden alterar las tripas (Frazier & Westhoff, 1993; Fehlhaber & Janetschke, 1995). En algunos casos, se ha comprobado que el crecimiento abundante de *Serratia* determina coloraciones anormales que pueden desaparecer por lavado (ICMSF, 1980b). Benezet *et al.* (2001) investigaron la coloración anormal rojo intensa de un embutido (salchichón) y encontraron que el microorganismo responsable no creció a los porcentajes de sal en que crecen las halófilas extremas. Se identificó *Serratia rubidaea*, una *enterobacteriaceae*. El *Staphylococcus aureus* es también una bacteria halotolerante (Madigan *et al.*, 2009) que puede encontrarse en alimentos salados.

Trindade de Oliveira (1982) aisló e identificó las arqueas halófilas presentes en la sal utilizada para la elaboración de charque<sup>15</sup>; las mismas pertenecían a la familia *Halobacteriaceae*.

Se han descrito microorganismos halotolerantes como micrococcos, *Sarcina*, algunos espirilos, vibrios, flavobacterias y

---

<sup>15</sup> Charque o charqui: carne salada y desecada por exposición al aire (Sanz, 1967).

algunos lactobacilos que se desarrollan en alimentos salados (ICMSF, 1980b). Según Adams & Moss (2008), las halobacterias son halófilas obligadas y no crecen en ausencia de altas concentraciones de sal.

La sal industrial, de grado alimentario, utilizada en la industria de los alimentos como método de conservación, puede ser un elemento de ingreso de microorganismos provocando una **contaminación cruzada** por microorganismos halófilos y una **limitación de la vida útil del alimento**. En este sentido, vale la pena destacar que el Codex no menciona, en ningún momento, a los microorganismos halófilos.

Si bien, como se mencionó antes, se ha reportado contaminación por halófilas en la industria del pescado (Rodríguez Valera *et al.*, 1980; Rodríguez Valera, 1992) con relación a las tripas bovinas, hasta el momento del presente trabajo, sólo se han encontrado reportes de aislamiento e identificación de *Halobacterium salinarum* y *Halobacterium cutirubrum* (Wijnker, 2009).

Por otra parte, las arqueas halófilas presentan características únicas que han permitido su aplicación en diversos campos de la biotecnología, como la producción de bacteriorodopsina para la conversión de luz solar en electricidad, recuperación del petróleo, detección del cáncer, investigación de drogas y biodegradación de residuos y compuestos tóxicos (Ventosa & Nieto, 1995; Doolittle, 1997; Ramírez *et al.*, 2004, 2006; Flores *et al.* 2010).

Otros autores (Kushner & Kamekura, 1988; Kamekura & Kates, 1988, 1999; Kamekura, 1998; Castillo & Barragán; 2011) mencionan otras aplicaciones industriales, como la producción de enzimas, producción de biopolímeros y bioremediación. Según Rodríguez Valera (1980b, 1992), la considerable contribución de las halobacterias a la diversidad de la vida es sólo el comienzo.

Por otra parte, Kis Papo & Oren (2000) descubrieron que varios representantes de la familia *Halobacteriaceae* excretan bacteriocinas halófilas (halocins) que inhiben el crecimiento de otras halobacterias. Pauling (1982) aisló bacteriófagos que infectaban arqueas extremadamente halófilas del género *Halobacterium* en salsa de anchoa.

Este trabajo se centra en las arqueas halófilas como microorganismos alterantes de un alimento salado: las tripas bovinas, si bien también se podría extender a las tripas ovinas y suinas (Wijnker, 2009), donde también se observan las alteraciones que aquí se analizan; no obstante, en el caso de éstas últimas, la diferencia está dada por el menor espesor de sus paredes y, por tanto, el mayor compromiso de las mismas frente a las alteraciones que aquí se describen.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

La presente investigación tiene como punto de partida las observaciones realizadas a partir de nuestro trabajo como Inspector Veterinario que tiene como una de sus finalidades el control de las condiciones higiénico sanitarias en establecimientos elaboradores de alimentos. Es así que, durante esta actividad profesional, llamó nuestra atención la presencia de coloraciones rojizas en tripas bovinas (figura II.1) y, asimismo, en paredes de un secadero de productos fermentados y madurados, y en la parte inferior de un depósito de salmuera que alimentaba una máquina inyectora de jamones, salpicada con salmuera.



**Figura II.1.** Coloraciones rojizas en tripa bovina salada.

De esta forma, un objetivo principal de la presente investigación fue el estudio y la descripción de las coloraciones rojo, rosadas y naranja que pueden observarse en las tripas bovinas saladas (intestinos bovinos), envasadas en tarrinas plásticas, previamente forradas en su interior con bolsas de polietileno aptas para uso en alimentos (figura II.2). En el envase así preparado se agrega salmuera (Madhwaraj *et al.* 1980) que puede prepararse con agua potable y sal, si bien en algunas industrias también se adiciona ácido acético de grado alimentario<sup>16</sup>.



**Figura II.2.** Detalles del proceso de envasado de tripa bovina en tarrinas plásticas forradas con bolsas de polietileno, con agregado de salmuera.

---

<sup>16</sup> La salmuera así preparada alcanza un valor de 24° Bé, en caso de agregarse ácido acético, el pH no será superior a 4.

Las coloraciones observadas en tripas bovinas envasadas serían producidas por arqueas y cabría esperar que se tratase, fundamentalmente, de arqueas halófilas extremas que ingresan al sistema a través de la sal utilizada en el procesamiento y conservación de las tripas.

Como se explicó en el apartado 1.6., las arqueas halófilas forman parte de un grupo de microorganismos conocidos como extremófilos, adaptados a condiciones ambientales muy difíciles de soportar para la mayoría de los seres vivos, en este caso, altas concentraciones de sal (Montoya & Ramírez Jiménez, 2013).

En esta investigación, realizada en el curso de 3 años en tres industrias procesadoras de tripas, se ha constatado la presencia de coloraciones anormales acompañadas, en algunos casos, de alteraciones estructurales en la pared de las tripas bovinas saladas. Esta situación genera pérdidas económicas, no cuantificadas. Las pérdidas se deben al descarte de tripas cuando su estructura está comprometida y al reproceso de las que están en buen estado, pero se encuentran teñidas por el pigmento.

En referencia a las tripas bovinas y su procesamiento industrial, son pocos los trabajos publicados, menos aún aquellos relacionados con microorganismos halófilos y su acción sobre la tripa salada. Sin embargo, como ya se destacó, hay mayores referencias con relación a la acción de las halófilas en pescado (Yeannes *et al.*, 2011; Czerner, 2011,

Czerner & Yeannes, 2014), cueros (Birbir *et al.*, 1996, 2015) y otros productos.

Con relación a la contaminación cruzada de tripas bovinas por halófilas, no se ha encontrado ninguna investigación que profundizase en la acción de estos microorganismos a nivel de los tejidos (estudios histológicos). En este sentido, este trabajo es inédito, así como también en el estudio de la interacción de las halófilas con la superficie del producto y la formación de biofilms (biopelículas)<sup>17</sup>.

Tampoco se han encontrado estudios que aborasen en profundidad el origen y las características de la sal utilizada en la industria procesadoras de tripas. Asimismo, hay poca información sobre el propio proceso de elaboración industrial de las tripas saladas; en este sentido, en este trabajo se genera un amplio registro gráfico del proceso.

Por otra parte, el presente estudio intenta ofrecer un enfoque mixto con una perspectiva académica, pero también industrial, dada nuestra proximidad a esta actividad.

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, este es el primer estudio sobre arqueas halófilas en tripas bovinas que analiza su caracterización y comportamiento, tanto en Uruguay como en América Latina.

---

<sup>17</sup> Colonias de células microbianas recubiertas o incluidas en sustancias mucosas (generalmente polisacáridos), adheridas a una superficie (Madigan *et al.*, 2009).

## **III. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

### **III.1. OBJETIVOS**

#### **III.1.1. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este trabajo es determinar las causas de las alteraciones en la coloración y en la estructura de las tripas vacunas saladas e investigar su incidencia en el producto para definir posibles soluciones.

#### **III.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para conseguir el objetivo general antes indicado se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Identificar el/los posibles puntos de contaminación en el proceso de elaboración de tripas bovinas saladas.
- Aislar e identificar el/los microorganismos responsables de la aparición de coloraciones anormales rosado-anaranjadas.
- Estudiar el grado de alteración que producen en las tripas
- Analizar la incidencia de la contaminación sobre el producto y su posible repercusión en la salud pública.

### III.3. PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo seguido en la presente tesis constó de tres fases (figura III.1.), las cuales se describen brevemente a continuación.

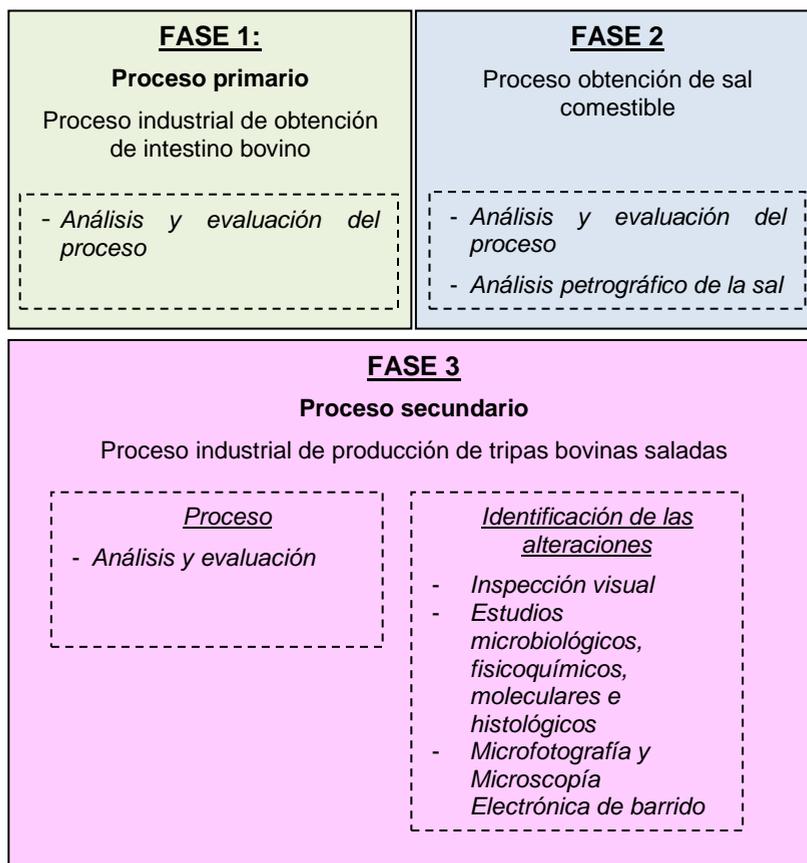


Figura III.1. Plan de trabajo.

**FASE 1. Análisis y evaluación del proceso industrial para la obtención de intestinos bovinos (proceso primario)**

En esta primera fase se analizó y evaluó el proceso primario de obtención de los intestinos. El trabajo se desarrolló en dos establecimientos de faena de bovinos.

El objetivo fue conocer las etapas del proceso y estudiar posibles puntos de contaminación.

Se prestó especial atención a las fases de evisceración y tratamiento del aparato digestivo, estudiando y analizando el proceso realizado a los intestinos en el sector tripería.

**FASE 2. Estudio del proceso de elaboración de sal comestible**

Esta segunda fase se centró en el estudio del proceso de obtención de la sal, ingrediente fundamental para la elaboración de tripas bovinas saladas, para evaluar la posibilidad del ingreso de microorganismos a través de la sal.

Por tanto, se consideró relevante asistir a un establecimiento procesador de sal, ya que en nuestro país toda la sal es importada para su procesamiento posterior. Se analizó y evaluó el proceso de obtención de la sal y se realizaron análisis petrográficos del producto final.

**FASE 3. Análisis y evaluación del proceso industrial de producción de tripas bovinas saladas (proceso secundario)**

El objetivo de la tercera fase del trabajo fue identificar posibles puntos de contaminación y definir el problema (coloraciones rojizas, rosadas y anaranjadas). De esta forma, en esta fase, se establecieron dos etapas.

En una primera etapa, durante un período de 3 años aproximadamente, se estudió y evaluó el proceso secundario de obtención de tripas.

En una segunda etapa, se trabajó en identificar el problema y sus posibles causas. Para ello, se realizó la evaluación sensorial del producto contaminado. Por otra parte, se recolectaron muestras de sal, producto y agua para analizar la incidencia del problema en el proceso industrial. Además, se realizaron una serie de estudios microbiológicos, físico-químicos, moleculares e histológicos para determinar el/los microorganismos actuantes, sus características y sus efectos sobre el producto.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1. ANALISIS Y EVALUACIÓN DE LOS PROCESOS**

#### **IV.1.1. Proceso Primario. Proceso industrial de obtención de intestino bovino**

El proceso de elaboración de la tripa salada consta de dos etapas que se distinguen en proceso primario y secundario. En ambos pueden observarse diferencias de un establecimiento a otro, o entre países y/o regiones, como se indicó anteriormente (apartado I.1).

Como parte de la primera fase de este trabajo, se estudió y evaluó el proceso primario de obtención de los intestinos. El mismo se encuentra comprendido dentro de la faena de animales bovinos, el cual es un proceso estandarizado, sujeto a sucesivas etapas que se repiten siempre de igual forma.

Para entender esta etapa del proceso, el trabajo se desarrolló en dos establecimientos de faena de bovinos durante una jornada de 8 horas en cada uno de ellos. Se observó el procedimiento de faena de los animales; se prestó especial atención a la evisceración y tratamiento del aparato digestivo. En esta etapa del estudio se observó el proceso que se realiza a los intestinos en el sector tripería del matadero, realizando los registros gráficos de las distintas etapas del

mismo. Se observaron los tipos de controles y puntos críticos de control (PCC), resultado del análisis de peligros del proceso, junto con los puntos de control identificados (Wijnker, 2013). Se observó además la extracción del íleon.

#### **IV.1.2. Proceso de obtención de sal industrial comestible a partir de sal importada**

En esta fase del trabajo se analizó el proceso de obtención de sal industrial comestible a partir de sal importada en un establecimiento procesador de sal. Dicho establecimiento se abastece de sal importada que, más tarde, es purificada, secada y envasada; y es uno de los proveedores de sal de las dos triperías estudiadas.

Se comprobaron los tipos de controles y puntos del proceso: puntos críticos de control (PCC).

También se recolectaron piedras de sal para realizar análisis petrográfico.

#### **IV.1.3. Proceso Secundario. Proceso industrial de obtención de tripa bovina salada**

Para la realización de esta fase de la tesis se trabajó con tres establecimientos de este rubro durante un período de 3 años, con jornadas de 8 horas y con una periodicidad de 3 veces por semana.

El estudio de esta etapa permitió conocer y entender el proceso realizado a la tripa bovina. Al igual que en el apartado

IV.1.1., se realizaron los registros gráficos de las distintas etapas del proceso. Además, se estudiaron los siguientes manuales y su implementación: Buenas Prácticas de Manufactura (GMP: Good Manufacturing Practices), Procedimientos Operativos Estandarizados de Higienización (SSOP: Procedures Operating Standard of Sanitization) y Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP: Hazard and Analysis Critical Control Points), y los registros que se desprenden de los mismos.

## **IV.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA**

### **IV.2.1. Análisis petrográfico de la sal**

Se tomaron muestras de piedras de sal para realizar análisis petrográfico (Müller, 1988).

Los análisis petrográficos son de práctica común para la determinación de la pureza de la sal (gema y marina), así como para el control de los minerales contaminantes. Asimismo, la utilización de láminas petrográficas para la búsqueda de microorganismos fósiles en diferentes tipos de rocas es de uso generalizado en micropaleontología. Es por ello que la técnica se aplica especialmente bien para el estudio de arqueas incluidas en sal, principalmente para la determinación de la densidad de microorganismos y su tipo de preservación. En

condiciones favorables permite determinar en qué etapa del proceso de evaporación fueron incluidas las arqueas mediante la observación de los minerales en los que se encuentran.

Para el análisis, se confeccionaron láminas delgadas (petrográficas), una lámina por muestra, y se siguieron los pasos según el procedimiento estándar de laminación para rocas con minerales solubles en agua (Humphries, 1994): (1) corte del espécimen de roca con sierra de discos diamantados marca SIMA (España) de 14 pulgadas para obtener una cara plana; (2) pulimento de dicha cara mediante abrasivo de carburo de silicio (carborundum) granulometría 800; (3) cementación de la cara pulida a portaobjeto de cristal, utilizando resina epóxica Araldite 2020; (4) impregnación del resto de la muestra con resina epóxica para sellar fracturas y porosidades; (5) reducción del espesor del espécimen a 100  $\mu\text{m}$  mediante el uso de máquina laminadora Conrad WOCO 50 (Clausthal-Zellerfeld, Alemania) (figura IV.1) con monoetilenglicol como medio refrigerante; (6) pulimento de la lámina hasta llegar a 30 $\mu\text{m}$  de espesor, como medio refrigerante se utilizó monoetilenglicol y como medio de limpieza isopropanol; (7) finalmente, la lámina se cubrió con un portaobjetos mediante el uso de resina epóxica. Los reactivos fueron adquiridos en un comercio local especializado en productos para laboratorios. Todos los equipos se encuentran en la Facultad de Ciencias de la UdelaR de Montevideo, Uruguay.



**Figura IV. 1.** Laminadora CONRAD WOCO 50.  
(Gentileza Dr. Claudio Gaucher Pepe).

La lámina así obtenida fue estudiada en el Laboratorio de Micropaleontología, Departamento de Paleontología, Facultad de Ciencias de la UdelaR, Montevideo, Uruguay, bajo un microscopio petrográfico polarizador LEICA DM LP (Wetzlar, Alemania) con cámara digital DFC 290 HD del mismo fabricante.

Dicho microscopio consta de objetivos de inmersión con aumento máximo de 1250 X, así como platina de conteo para determinación cuantitativa de composición de la muestra.

#### **IV.2.2. Inspección sensorial de la tripa**

Durante el período de estudio, en los establecimientos procesadores de tripas, se inspeccionaron más de 5000

tarrinas con tripas bovinas saladas prontas para su comercialización.

El objetivo fue identificar presencia o ausencia de tripas alteradas en distinto grado, aún en estadios visibles sólo en la superficie, observar sus características, investigar qué se hacía con ellas y cuantificar, dentro de lo posible, el problema.

Se realizó una evaluación sensorial de las tripas considerando parámetros aceptables como el color blanco a crema, el olor *sui generi* de la tripa y la textura suave, analizando, al tacto, la presencia de granos de sal en su superficie.

### **IV.2.3. Determinaciones microbiológicas**

Se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UdelarR durante un período de 3 años. El equipamiento utilizado fue el siguiente: (a) estufa de cultivo ELECTROLUX, (Modelo , 941/ 970 82 11, Suiza) (b) balanza Precise 3000 C- 6000 D (Montevideo, Uruguay); (c) agitador magnético Fisher Thermix Stirring Hot Plate Model 310 T (Fisher Scientific™, Waltham, USA); (d) autoclave Electric Pressure Steam Sterilizer (Wisconsin Aluminum Foundry Co., Inc. Manitowoc, USA) microscopio Cole-Parmer Modelo 48923-4 (Cole-Parmer International, Vernon Hills, USA) y equipamiento básico de laboratorio de microbiología.

Los muestreos se realizaron en base a la inspección del 100% de la mercadería pronta para su comercialización (mercado interno o exportación, éste último incluyó los que exigían salado 30 días, como también los que no lo hacían). Se tomaron muestras de 200 tarrinas que presentaban tripas con alteraciones y de 25 tarrinas con tripas sin alteraciones, como muestras testigo.

Para las determinaciones microbiológicas de microorganismos halófilos se utilizaron dos tipos de medios de cultivo:

- a) Medio de detección y aislamiento: el método utilizado para la determinación de halófilas extremas<sup>18</sup> fue el medio agar TLS (IRAM, 1988), propuesto por Yeannes *et al.* (2011) en productos de la industria pesquera. La Norma IRAM 15 139 (1988) denomina a este medio Agar TSL (Tryptona-Sal-Extracto de levadura) (Buenos Aires, Argentina) y sus componentes se detallan en la tabla IV.1. La composición del medio se basa en la capacidad de estos microorganismos de crecer en medios con altas concentraciones de sal, con un rango óptimo de entre 20 y 26 g/100 cm<sup>3</sup> y de producir pigmentación rosada, rojo y anaranjadas cuando se incuban a 37 °C durante aproximadamente 12 ± 3 días (IRAM, 1988; Yeannes

---

<sup>18</sup> Los microorganismos halófilos extremos se desarrollan en concentraciones de NaCl no menores a 15 g/100 cm<sup>3</sup>, mientras que la mayoría lo hace a concentraciones de entre 20 y 26 g/100 cm<sup>3</sup>.

*et.al.*, 2011). Las placas, tubos de siembras y repiques se incubaron junto a un reservorio de agua que evitó el desecamiento del agar.

- b) Medio de enumeración: para el recuento de las arqueas halófilas se utilizó el medio específico Agar Halófilico para halófilas extremas (tabla IV. 2), con un 25% del NaCl (APHA, 1992, 2001).

Muchas especies de microorganismos halófilos requieren bajos niveles de  $K^+$ ,  $Mg^{++}$  y otros cationes y aniones, además del NaCl (APHA, 1992, 2001). Los dos medios utilizados poseen estos cationes. Las halófilas extremas crecen óptimamente en medios que contienen entre 15 y 30% de NaCl y pertenecen, principalmente, a los géneros *Halobacterium* y *Halococcus* que producen pigmentos de color rojo o rosa brillante. El crecimiento es muy lento, incluso en condiciones óptimas y se lisan fácilmente cuando se exponen a concentraciones bajas de sal (menos del 10%), (APHA, 2001).

**Tabla IV.1.** Composición del medio Agar TSL (Tryptona-Sal-Extracto de levadura).

---

Triptona	5 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	250 g
Sulfato de magnesio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	20 g
Cloruro de Potasio (KCl)	5 g
Cloruro de calcio hexahidratado ( $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ )	0.2 g
Extracto de Levadura	4 g
Agar	17 g
Agua destilada	1000 cm <sup>3</sup>

---

**Tabla IV.2.** Composición del medio APHA para halófilas \*.

---

Casaminoácidos	10 g
Extracto de levadura	10 g
Proteosa-Peptona	5 g
Citrato trisódico	3 g
KCl	2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	25 g
NaCl	250 g
Agar	20 g

---

\* Los ingredientes se combinan con 1 litro de agua destilada (pH final 7.2).

#### **IV.2.3.1. Detección y aislamiento de arqueas halófilas en los componentes del sistema**

Para la detección y aislamiento de arqueas halófilas en los distintos componentes del sistema se utilizó la técnica mencionada en la norma IRAM 15 139 (1988). A continuación, se detalla la metodología seguida para cada uno de los componentes.

##### *Detección en tripa antes de salar, agua y ácido acético*

Para investigar el origen de la contaminación, se estudiaron los componentes del sistema que forman parte del producto apto para la comercialización: a) tripa antes de ser salada (30 muestras); b) agua (20 muestras) y c) ácido acético (20 muestras).

La tripa se sembró en superficie en medio agar TLS (IRAM, 1988) al 25%, ya que el crecimiento se da en condiciones de altas concentraciones de sal. Para el agua y el acético se sembró 0,1 ml en cada caso directamente sobre la placa de Petri con medio agar TLS (IRAM, 1988) al 25%.

##### *Detección en la sal*

El estudio se realizó de la siguiente forma:

- (a) Siembra en superficie de granos de sal que se colocaron directamente sobre el medio agar TLS (IRAM, 1988) en la placa de Petri (25 muestras).

(b) Siembra en superficie de sal en solución que se preparó con sal de un sólo origen y con un pool de sal de distintos orígenes (25 muestras en total). Se preparó una dilución decimal (1 en 10) usando buffer fosfato como diluyente. Se sembró 1 ml de dicha solución sobre la superficie de la placa. La siembra se realizó sobre medio agar TLS (IRAM, 1988) para halófilas extremas.

*Detección en las tripas bovinas saladas alteradas y muestras testigos*

Se efectuaron tomas de muestras de tripas prontas para la comercialización en dos triperías. Como se indicó antes, se seleccionaron 200 muestras de tripas alteradas y 25 muestras testigos de tripas saladas sin alteración.

Se colocaron pequeños trozos de tripas alteradas en la superficie de la placa de Petri con medio de cultivo para halófilas extremas (IRAM, 1988).

*Aislamiento de las colonias sospechosas*

A partir de las siembras de tripas alteradas y sal, y en medio para halófilas extremas (IRAM, 1988), se procedió al aislamiento de las cepas sospechosas mediante la técnica de siembra en estrías y posterior repique de éstas en agar inclinado. En ambos casos se utilizó el agar TLS (IRAM, 1988), descrito en el apartado IV.2.3.

#### **IV.2.3.2. Recuento de arqueas halófilas extremas**

Se realizaron recuentos de arqueas halófilas en la sal y en las tripas alteradas.

En el caso de la sal, se analizaron todos los lotes ingresados durante un año en dos establecimientos procesadores de tripas.

Para la obtención de los recuentos microbiológicos (ufc/g), para cada una de las muestras se prepararon diluciones decimales seriadas en una bolsa stomacher con agua peptonada (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España), homogeneizándola con un Stomacher LAB Blender 400 (Pbi International, Milán, Italia). El medio utilizado fue el indicado por APHA (2001) para halófilas extremas incubando a 37°C durante  $12 \pm 3$  días (ver apartado IV.2.3).

#### **IV.2.3.3. Detección de microorganismos patógenos: *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus***

Este estudio se realizó en uno de los establecimientos procesadores de tripas en el producto apto para la comercialización. El criterio de selección fue la fecha de producción mayor o igual a 30 días. Se extrajo una muestra semanal al azar durante un período de un año, es decir un total de 52 muestras en las que se buscaron ambos microorganismos, dado que *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* son bacterias patógenas que pueden estar presentes en el tracto digestivo de animales (Jouve, 1996).

Para la obtención de los recuentos microbiológicos (ufc/g), para cada una de las muestras se prepararon diluciones decimales seriadas en una bolsa stomacher con agua peptonada (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España), homogeneizándola con un Stomacher LAB Blender 400 (Pbi International, Milán, Italia).

Para *Salmonella* se siguió el procedimiento descrito en en la norma ISO 6579 (2002) con un preenriquecimiento en agua de peptona tamponada incubando a 37°C durante 18 h, enriquecimiento en medio Rappaport-Vassiliadis con soja (caldo RVS) (Montevideo, Uruguay) y en caldo Muller-Kauffmann tetrionato/novobiocina (Caldo MKTTn) (Montevideo, Uruguay). La incubación se realizó a 41.5 °C durante 24 h para el caldo RVS y a 37°C durante 24 h para el caldo MKTTn. A partir de los caldos de enriquecimiento, se realizó la siembra en placa en superficie utilizando dos medios sólidos selectivos: agar xilosa lisina desoxicolato (agar XLD) (Montevideo, Uruguay) y el agar Verde Brillante (agar BGA) (Montevideo, Uruguay), en ambos casos las muestras se incubaron durante 18-24 h a 37°C. Finalmente, la prueba de confirmación se realizó mediante siembra en agar inclinado TSI (agar triple azúcar hierro) (Montevideo, Uruguay) e incubando durante 24 h a 37°C.

Para la enumeración y detección de *Staphylococcus aureus* se siguió la metodología indicada en la norma ISO 688-1 (1999) realizándose recuentos en placa a partir de diluciones

decimales seriadas sembrando 0.1 mL en agar de Braird-Parker (agar BP) (Laboratorios Britania, Montevideo, Uruguay) e incubando a 37°C durante 48 h.

#### **IV.2.4. Determinación de pH y $a_w$ en tripas bovinas saladas prontas para comercializar**

Se estudió la evolución durante dos años en el establecimiento que acidificaba su salmuera. Se realizaron controles periódicos (1 de cada uno por mes) en un total de 104 muestras de estos dos parámetros en los productos finales almacenados para su comercialización con diferentes fechas de producción escogidos al azar.

Para medir el pH se utilizó un peachímetro Orion Star A215 de Thermoscientific (Waltham, USA). El método utilizado fue el de la AOAC (AOAC, 981.12).

El medidor de actividad de agua fue un aparato Rotronic Hygropalm HC2-AW (Rotronic AG, Bassersdorf, Switzerland) El método utilizado fue el de la AOAC (AOAC 98.18).

#### **IV.2.5. Pruebas bioquímicas bacteriológicas**

Para identificar las arqueas halófilas presentes en las muestras se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, glucosa, oxidasa (Carter, 1969), reducción de nitrato, crecimiento en gelatina (Mc. Faddin, 1993).

## **IV.2.6. Estudios de morfología celular**

### **IV.2.6.1. Frotis y tinción GRAM**

Con el objetivo de observar la morfología bacteriana y la reacción a la tinción GRAM se realizaron más de 30 frotis en láminas porta objetos extendiendo el material (tripas alteradas), con diluyente estéril, secado al aire caliente y fijación. En lugar de fijar por calor se realizó la fijación con 2% (w / v) de ácido acético (Aromaco, Montevideo, Uruguay) durante 30 minutos (Bergey's, 2001) y luego se efectuó la tinción GRAM.

### **IV.2.6.2. Microfotografía**

Los frotis se observaron al microscopio óptico y fueron fotografiados en el Laboratorio de Micropaleontología, Departamento de Paleontología, Facultad de Ciencias de la UdelaR. El microscopio utilizado fue un Leica DMLP con cámara MPS 30 y objetivo de inmersión 100x (Montevideo, Uruguay).

### **IV.2.6.3. Microscopía electrónica**

Para observar la morfología celular de los microorganismos aislados se tomaron fotografías con un microscopio electrónico de barrido del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias de la UdelaR.

Para ello, se procesaron tres muestras de tripas bovinas saladas, extraídas en distintos momentos. Las muestras presentaban limo coloreado en su superficie. Se realizaron cortes en trozos más pequeños, previo a su fijación.

La preparación del material siguió los protocolos estándares para especímenes biológicos vivos. Primero, se realizó una fijación con Glutaraldehído EMS (Electron Microscopy Supplies, USA) al 2,5 % por 1 hora. Las muestras se lavaron 2 veces con buffer fosfato, centrifugando a baja velocidad y eliminando el sobrenadante. Luego, el material fue deshidratado en el siguiente gradiente de metanol al 50% por 10 minutos, al 70% por 10 minutos, al 90% por 10 minutos y al 100% por 10 minutos, por 3 veces. Las muestras en metanol (Emilio Benzo, Uruguay) al 100% se colocaron en un aparato de secado de punto crítico de CO<sub>2</sub> (Praxair, Uruguay). Se realizaron mezclas con CO<sub>2</sub> líquido seguidas de evacuación de la mezcla de éste con metanol, para así sustituir progresivamente el metanol por CO<sub>2</sub> líquido puro. El proceso fue el siguiente: una mezcla de 20 minutos seguida de evacuación de 2 minutos y medio, y sucesivas mezclas de 5 minutos con evacuaciones de 2 minutos y medio hasta que sólo se observó CO<sub>2</sub> líquido (hielo seco) en la evacuación. Luego se cubrieron con oro (SPI, USA) a 30 mA durante 120 segundos. Se montaron en tacos de aluminio en un aparato "Sputter Coater" de Dentom Vaccum y se observaron a 20 KeV en alto vacío.

Los especímenes se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM- 5900LV obteniendo imágenes de electrones secundarios digitalizadas a diferentes aumentos.

#### **IV.2.6.4. Estudios histológicos**

Este estudio se realizó en la Dirección de Laboratorio Veterinario (DILAVE) del Departamento de Treinta y Tres, Uruguay, dependiente del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

El estudio se realizó sobre 3 muestras de tripas: una muestra en buen estado y apta para la comercialización; una segunda muestra con coloración rosada pero sin grado de deterioro aparente; y una tercera muestra con evidente alteración estructural.

Las muestras de las diferentes tripas se lavaron con agua corriente para extraer la sal, se fijaron en formol bufferado al 10% durante 96 hrs, se deshidrataron en alcohol, se incluyeron en parafina, se cortaron a 5-7  $\mu\text{m}$  con un micrótopo Leica RM 2115 RTS (Alemania) y se colorearon con Hematoxilina (Spectrum Chemical MFG.CORP., Canadá) y Eosina (Biopack, Argentina). Se observaron en microscopio óptico Olympus BX51 (Japón).

### IV.2.7. Caracterización molecular

Este estudio fue realizado a partir de tres muestras en el Laboratorio de Biotecnología Molecular, Sección Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la UdelaR. Se extrajo el ADN de cultivo de bacteria utilizando el Kit Wizard DNA extraction kit (Promega). Se realizó la amplificación por PCR del gen del ARNr de 16 S utilizando los cebadores específicos para el Dominio Archaea 21 F y 1392 R y el siguiente ciclo de PCR indicado en la tabla IV.3.

**Tabla IV.3. Ciclo de PCR**

---

<b>Gen Amplificado</b>	<b>16S Archae</b>
	95°C 5'
	95°C 1'
	58°C 1'
	72°C 2'
	25 ciclos
	72°C 4'
Cebadores específicos	21F 1392R

---

Para la purificación del producto de PCR se utilizaron las columnas de purificación QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Duesseldorf, Germany). La cuantificación del producto de PCR se realizó por comparación con marcador de peso molecular en gel de agarosa 1% teñido con Bromuro de etidio. Utilizando el cebador 21F se realizó la reacción de secuenciación. Se hizo una corrida de secuencia utilizando el secuenciador 377 ABI. Se hizo la corrección manual de las secuencias y se compararon con los bancos de datos utilizando Blast Search de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1 EVALUACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE INTESTINO

Como se indicó antes, el proceso **primario** se realiza en el establecimiento de faena. En Uruguay, dicho proceso debe ajustarse a las normas oficiales Decreto 369 de 1983 (Uruguay) y sus modificaciones, y a las normas equivalentes de los países compradores. Asimismo, cada establecimiento cuenta con sus propios controles de inocuidad a través de las GMP, SSOP y HACCP.

En las empresas evaluadas, en el proceso primario, se procede a ligar el esófago (figura V.1a), y atar el recto (figura V.1b) del animal a fin de que, al realizar la evisceración, no se produzca la salida del contenido del aparato digestivo.

Las vísceras se vuelcan a dos bandejas, una de vísceras rojas (pulmones, corazón, hígado, vesícula biliar, bazo, páncreas y riñón) y otra de vísceras verdes (esófago, rumen, retículo, omaso, abomaso, intestino delgado, ciego y colon) (figura V.2). Si los intestinos son aptos, luego de la reinspección en mesa de vísceras, se envían al sector tripería del establecimiento de faena (matadero), donde se continúa con el proceso específico que conduce a la obtención final de tripas bovinas saladas.



**Figura V.1.** (a) Detalle del atado del esófago y (b) atado de culatoto (recto) en playa de faena (Gentileza: Dr. Daniel Pérez Gasgi).



**Figura V.2.** Detalle de la separación de vísceras rojas y verdes en playa de faena (Gentileza: Dr. Daniel Pérez Gasgi).

Cabe mencionar que las vísceras, la cabeza y la carcasa del animal durante la faena deben estar identificadas y sincronizadas entre sí. De esta forma, cualquier problema encontrado en el animal postmortem permite el retiro de las

vísceras correspondientes. Dicho procedimiento se siguió en todos los establecimiento evaluados.

Posteriormente, se separa el intestino del resto de los componentes del aparato digestivo y se envía al sector tripería del establecimiento<sup>19</sup>.

El intestino llega al sector unido por el mesenterio y el tejido adiposo. Se lava inmediatamente por lluvia o inmersión en agua caliente para evitar el endurecimiento de la grasa y el manchado de la capa serosa. Se extrae el páncreas y el recto (culato) y se separa el intestino grueso y delgado (figura V.3).



**Figura V.3.** Detalle de la separación del intestino delgado del grueso (Gentileza Sr. Carlos Baptista).

---

<sup>19</sup> Sector donde se procesa el intestino en un establecimiento de faena.

Con relación al intestino delgado, a la llamada **tripa vacuna de orilla**, se realizan las siguientes actividades:

*(a) Desorillado y desebedo*

Es la operación por la cual se separa a cuchillo el intestino delgado del tejido mesentérico (desorillado) y grasa mesentérica (desebedo). Por otro lado, entre este procedimiento y el destapado (ver más adelante), se realiza la extracción del íleon, considerado uno de los materiales específico de riesgo (MER). Para ello, se corta una porción de 210 cm desde la porción distal del intestino delgado, medida desde el ciego, que se descarta (figura V.4).



**Figura V.4.** Detalle de la operación de desorillado y desebedo (Gentileza Sr. Carlos Baptista).

*(b) Vaciado*

El vaciado tiene como fin evacuar el contenido intestinal. Puede realizarse de forma mecánica o manual, pero debe hacerse rápidamente para evitar que el contenido contacte con la superficie de la tripa, manchándola y, por tanto, depreciando el producto. El vaciado manual consiste en la extracción del contenido intestinal mediante presión ejercida por la mano al deslizar la tripa entre los dedos. Esta etapa se realiza bajo una lluvia constante de agua para evitar el manchado de la tripa. El agua utilizada y el contenido intestinal extraído se eliminan hacia los efluentes verdes para su posterior tratamiento. En el vaciado mecánico se sustituye la acción manual por rodillos que presionan el intestino al pasar entre ellos, logrando el mismo resultado que la acción manual. Se debe cuidar de no estirar excesivamente el intestino para no producir alteraciones en la pared (figura V.5).



**Figura V.5.** Detalle de la operación mecánica de vaciado.

(c) *Virado*

El virado es el proceso por el cual se invierte la tripa, de forma tal que la parte interna que contiene la mucosa intestinal (sarro), pasa a ser la parte externa. La maniobra consiste en tomar un extremo del intestino, invaginarlo al mismo tiempo que se le agrega agua y colgarlo pinchado en una ganchera (el pincho atraviesa desde la mucosa hacia la serosa). En el saco formado por la serosa en su interior y la mucosa en su exterior, se introduce el intestino y se agrega agua que, por su peso, tracciona al resto que continúa su pasaje a través de la luz, invirtiéndose. El virado se realiza a efectos de facilitar la posterior extracción del sarro (mucosa), quedando luego de desarrado una superficie lisa y uniforme que mejora la presentación de la tripa (figura V.6).

El desarrado generalmente se realiza en los establecimientos procesadores de tripas (triperías), (ver apartado V.3 b).



**Figura V.6.** Detalle de la operación de virado.

Con relación al intestino grueso, a la llamada **tripa vacuna de salame**, se realizan las siguientes actividades:

*(a) Destapado*

El destapado consiste en separar el intestino grueso de la grasa del mesenterio donde se encuentra contenido. Dicha tarea se realiza a cuchillo sobre una mesa y con un velo de agua caliente permanente para evitar el endurecimiento de la grasa y el manchado de la capa serosa. Se procede a la separación del ciego (tripón) y salame, cuidando de no perforar el intestino (figura V.7).



**Figura V.7.** Detalle de la operación de destapado.

*(b) Vaciado*

Se vacía el contenido intestinal introduciendo un pico con agua por uno de sus extremos, evacuándolo hacia el extremo opuesto, ayudado por la mano. Se debe cuidar la presión de agua utilizada y evitar tracciones violentas que puedan generar alteraciones de la pared definidas como zonas de transparencias o estrías que consisten en desgarros del tejido (figura V.8).



**Figura V.8.** Detalle de la operación de vaciado.

(c) *Desebado*

Es la remoción del tejido adiposo del intestino grueso. Se cuelga la tripa salame de un gancho fijo y se retira la grasa con una tijera, operación que también exige cuidado para evitar la formación de ventanas (ver apartado I.4.2), que se producen cuando se retira junto con la grasa parte del tejido de la pared (figura V.9).



**Figura V.9.** Detalle de la operación de desebedo de tripa salame.

(d) *Virado*

Este proceso se realiza de forma similar a lo indicado para la tripa orilla (figura V.10).



**Figura V.10.** Detalle de la operación de virado.

Por otro lado, con relación al ciego, al llamado “**tripón**”, las etapas del proceso son similares a las realizadas en la tripa salame: destapado, vaciado, deseado y virado, siendo el deseado más fácil porque tiene menos tejido adiposo y es más corto.

Independientemente del tipo de tripa obtenido, las dos últimas etapas del proceso son el enfriado y envasado.

En todos los establecimientos evaluados el **enfriado** se realizaba por inmersión en agua fría inmediatamente luego de procesada la tripa. En lo que respecta al **envasado**, se colocan en tarrinas plásticas a las que se agrega agua con hielo; se tapan y transportan. Hay empresas que acopian las tripas y las congelan envasadas en bolsas de nylon aptas para su uso en alimentos para así ser transportadas, no siendo este el sistema más frecuente.

Los resultados de la evaluación del proceso primario establecen el siguiente diagrama de flujo (figura V.11), donde se identifican los puntos de control (PC) antes mencionados y el PCC1 (punto crítico de control).

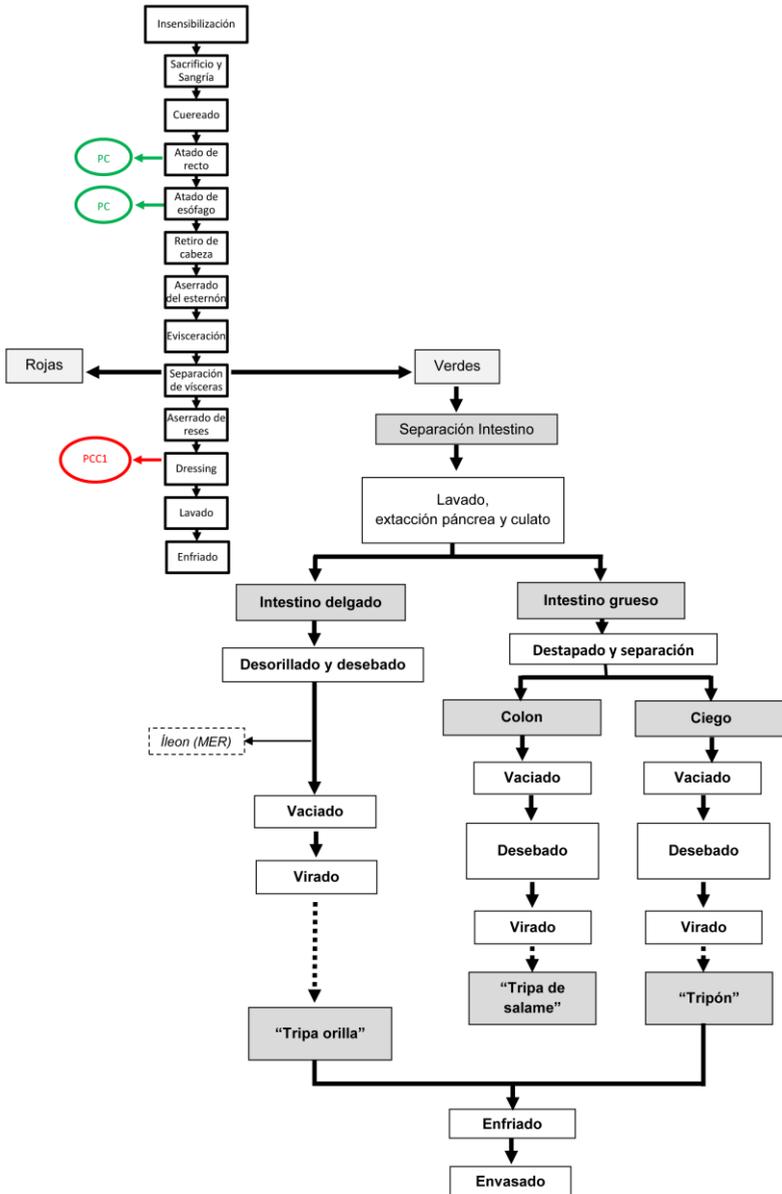
Los **controles** del proceso primario son, por un lado, los que corresponden a las **Buenas Prácticas de Manufactura (GMP)**: a) insensibilización del animal, b) tiempo transcurrido entre insensibilización y degüello, c) degüello, d) cuereado (desollado), e) atado de recto (culato), f) retiro de genitales y ubres, g) atado de esófago, h) evisceración, i) control higiénico

sanitario de vísceras rojas y verdes en sincronización con carcaza y cabeza.

Luego de la división de la carcasa, se controla el PCC1 que corresponde a cerotolerancia a presencia de contenido gastrointestinal y leche. El monitoreo de este punto se realiza por medio de inspección visual de cara interna y externa del 100% de las carcasas. Las etapas antes mencionadas en las Buenas Prácticas apuntan a lograr la cerotolerancia en este punto.

El PCC2 no se encuentra en esta etapa, sino que se realiza a la salida de la cámara de enfriado, donde se almacena la carne de 24 a 36 hs para cumplir con el proceso de maduración de la misma (transformación de músculo en carne). El límite crítico de este PCC es 7°C en el centro térmico de la carcasa.

En resumen, luego del análisis del proceso primario en los establecimientos evaluados se concluye que el mismo se encuentra estandarizado, respetándose las etapas y controles, ya sea desde el punto de vista de la inocuidad como de la calidad.



**Figura V.11.** Diagrama de flujo del proceso primario según la observación del mismo; (PC): Puntos de Control;(PCC1): Puntos Críticos de Control.

Por lo tanto, no se encontró en las etapas observadas posibilidad de ingreso de contaminantes responsables de la alteración de la tripa, más allá de los microorganismos ya presentes en el intestino, que no producen las alteraciones antes descritas (apartado II). Por tanto, se decidió continuar las observaciones en el establecimiento procesador de tripas (proceso secundario).

## **V.2. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE SAL INDUSTRIAL COMESTIBLE A PARTIR DE SAL IMPORTADA**

La materia prima que se procesa en dicho establecimiento es sal marina importada de distintos países (figura V.12). Se transporta en barcos a granel desde el país de origen y se traslada en camiones desde el puerto al establecimiento.



**Figura V.12.** Depósito de sal a la espera de su procesamiento.

La materia prima se pasa por zaranda previamente, se vuelca en una tolva y asciende por medio de elevadores hasta un secador cilíndrico rotatorio de acero inoxidable. El secador produce una cortina de sal, purificándola y elevando su temperatura a 120°C. Para que esto se realice en forma homogénea, en toda su masa, el equipo cuenta con paletas internas de 80 cm. A la salida del secador hay imanes para eliminar restos metálicos.

Es un proceso continuo en el cuál circulan 3400 kg de sal por hora. Un sistema de turbina y ciclónaje absorbe las impurezas que se van desprendiendo del producto a lo largo del pasaje por el secador rotativo, mediante una fuerte cortina de aire (Figura V.13). El aire saliente pasa por un sistema lavador de gases que consiste en que el aire atraviese una cortina de agua antes de salir al exterior de forma de retener las finas partículas de sal que son arrastradas por el aire y así evitar su salida al exterior de forma de no poluir el medio ambiente. Posteriormente, la sal pasa por un sistema de imanes que retienen partículas metálicas que podrían provenir de la carga y descarga de sal.



**Figura V.13.** Línea de purificación y secado de sal.

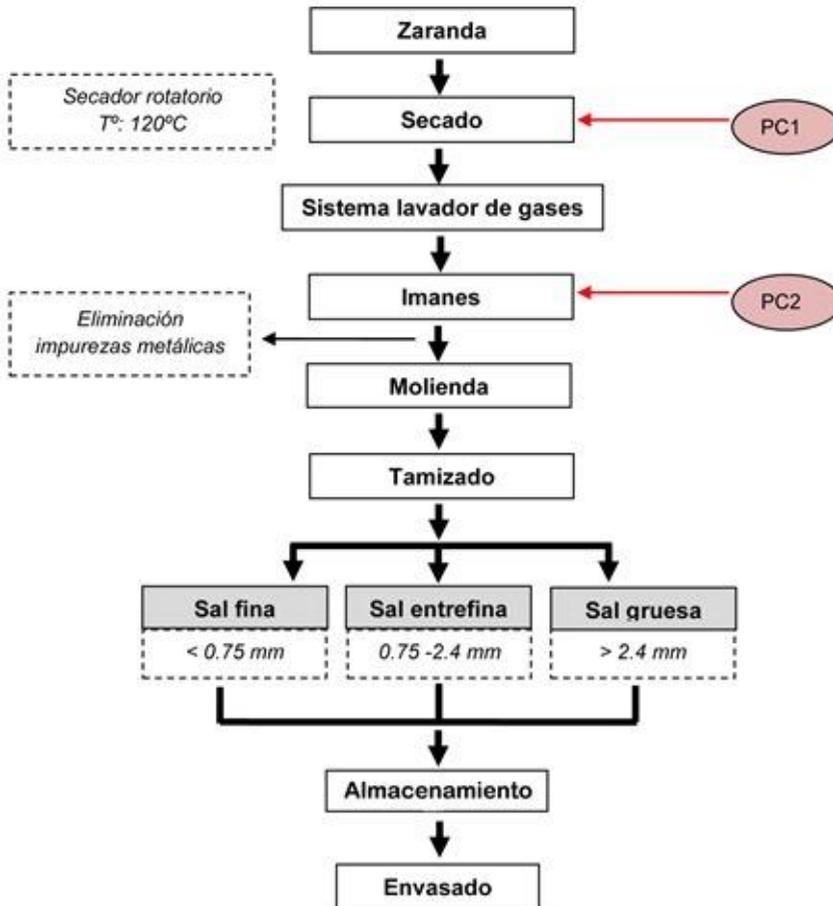
La sal proveniente del secador es molida y conducida a un sistema de zarandas con mallas de diferente graduación. Se separan las sales de diferente granulometría: fina ( $< 0.75$  mm), entrefina ( $0.75$  a  $2,4$  mm) y gruesa ( $> 2,4$  mm), almacenadas en silos de acero inoxidable hasta su envasado. Dicha granulometría es propia de la empresa estudiada. El envasado de sal de uso industrial, que es la utilizada para el salado de las tripas naturales, se realiza en bolsas de 25 Kg selladas e identificadas. La granulometría utilizada con este fin fue la gruesa y la fina. De esta forma, se cumple la totalidad del ciclo sin que el producto, luego de refinado, entre en contacto con la mano del hombre.

En la figura V.14 se muestra el diagrama de flujo del proceso observado.

Se controlan los parámetros del proceso de secado, que se registran en la planilla diaria del secador. La sal seca se analiza en laboratorios externos y, según la información proporcionada por control de calidad, en el lapso de 15 años no se registraron desvíos en el resultado de arqueas halófilas, manteniéndose siempre en  $< 10$  UFC/g (Método APHA).

En resumen, se observó que la mayoría de la sal ingresada al establecimiento era de origen marino y provenía de Argentina y Brasil. El objetivo del proceso térmico al que se somete la sal es el secado de la misma, sin embargo, dicho proceso no esteriliza la sal.

Se determinó que sólo contaba con HACCP el proceso para la sal comestible, que adiciona yodo y/o flúor. El PCC se ubica en esta etapa.



**Figura V.14.** Diagrama de flujo del proceso de obtención de sal comestible a partir de sal importada (PC: puntos de control).

Para la sal de uso industrial no hay controles, más allá de las buenas prácticas que apuntan a un buen secado y a la extracción de restos metálicos.

El proceso del secado disminuye el  $a_w$ , no obstante, no tiene efecto alguno sobre los microorganismos responsables de la alteración de las tripas bovinas saladas, dado que los mismos viven en condiciones de baja  $a_w$  (Madigan *et al.*, 2009). Por otra parte, la sal no se esteriliza. En este sentido, Yeannes *et al.* (2011) proponen el uso de sal esterilizada para eliminar los microorganismos halófilos extremos responsables de las alteraciones en anchoítas. Son necesarios mayores estudios en estos sentidos, especialmente, considerando la existencia de arqueas halófilas termófilas (Madigan *et al.*, 2009).

### **V.2.1. Análisis petrográfico**

El análisis petrográfico de la sal es particularmente relevante en este estudio, ya que no solo permite determinar la composición de la misma, sino también la posible presencia de arqueas en las muestras analizadas.

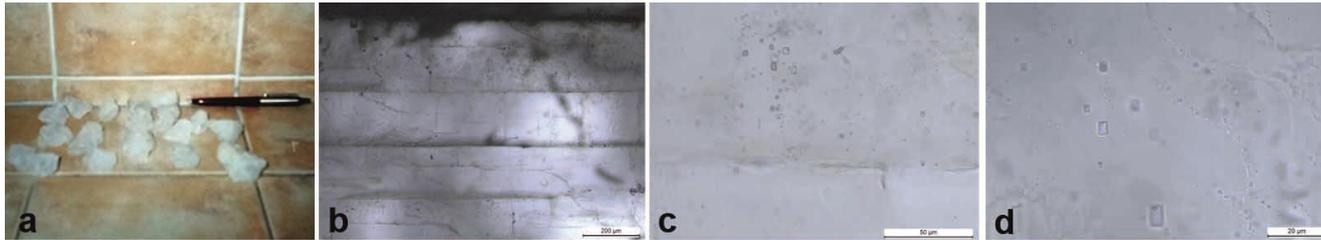
El 100% de las muestras analizadas resultaron ser prácticamente halita (NaCl) pura.

No se detectaron otros minerales típicos, como yeso o calcita. En la figura V.15a se pueden observar algunas de las muestras analizadas. La figura V.15b muestra una vista general de un cristal de halita (NaCl) con típicos clivajes a 90 grados.

En las figuras V.15c y V.15d se muestran algunos detalles, como pequeños cristales cúbicos de halita incluidos, algunas inclusiones fluidas (“burbujas”) y un clivaje que cruza horizontalmente la imagen.

En cuanto a la presencia de arqueas dentro de la muestra, se observó que su densidad es extremadamente baja,  $<100$  unidades/cm<sup>3</sup>, siendo muy difíciles de detectar en lámina delgada.

Por lo tanto, y en base al análisis petrográfico de la sal utilizada para la elaboración de tripas saladas de vacuno, se concluye que una cantidad extremadamente baja de arqueas halófilas podría ser suficiente, en condiciones óptimas de crecimiento, para desarrollarse y alterar las características del producto salado, en este caso, tripas vacunas. Esto implicaría, a su vez, que las medidas para evitar la contaminación con arqueas halófilas en la sal deberían extremarse. En este sentido, en el apartado anterior se mencionó la posibilidad de esterilizar la sal, según lo sugerido por Yeannes *et al.* (2011). Sin duda, se trata de consideraciones que exigirían mayores estudios.



**Figura V.15.** En a) muestras de sal analizadas; b) vista general de un cristal de halita (NaCl) con típicos clivajes a 90 grados; c) detalle del anterior mostrando pequeños cristales cúbicos de halita incluídos, así como algunas inclusiones fluídas (“burbujas”). Se observa también un clivaje que cruza horizontalmente la foto; d) imagen a máximo aumento mostrando pequeños cristales incluídos y trenes de inclusiones fluídas.

### V.3 EVALUACIÓN DEL PROCESO INDUSTRIAL DE PROCESAMIENTO DE TRIPA BOVINA

El proceso **secundario** se realiza en el establecimiento procesador de tripas y consta de las siguientes etapas:

(a) *Recepción*

Las tripas vacunas provenientes de animales sanos y de establecimientos de faena con inspección veterinaria oficial permanente son transportadas en camiones isotérmicos o refrigerados, según sea la distancia a recorrer, contenidas en tarrinas plásticas; con hielo, si se trata de tripas frescas o sin hielo, si se trata de tripas saladas. En ambos casos las tarrinas son cerradas. Si las distancias son muy largas pueden transportarse congeladas en bolsas. Al ingresar al establecimiento procesador de tripas pueden ir a cámara de frío o, si se van a utilizar al día siguiente, se colocan en piletas de acero inoxidable con hielo. En el caso de estar congeladas, se descongelan antes de usar. Estas pautas están establecidas en las Buenas Prácticas de Manufactura del establecimiento y concuerdan con las normativas oficiales con respecto al mantenimiento de la cadena de frío.

(b) *Desarrado*

Posteriormente, se procede al desarrado<sup>20</sup>, que consiste en extraer la capa mucosa (sarro) que recubre la pared intestinal por su lado interno. Para ello, la tripa ya viene virada desde el establecimiento de faena, quedando la mucosa expuesta a la máquina desarradora (figura V.16). A seguir, se hace pasar entre rodillos dentados, regulables, al tiempo que cae sobre ella una lluvia de agua constante. En algunos casos, esta etapa se realiza en el frigorífico. En ambas situaciones, se cumplen las Buenas Prácticas de Manufactura establecidas por la empresa, de la misma forma que en las etapas siguientes.



**Figura V.16.** Proceso de desarrado de tripa bovina.

---

<sup>20</sup> La tripa puede desarrarse (retiro de la capa mucosa) en el frigorífico o enviarse para virar y desarrar en el establecimiento procesador de tripas. Para su traslado, se acondicionan en tarrinas plásticas con hielo y si la distancia es mayor, se congelan.

(c) *Clasificado y enmadejado*

Las tripas ya desarradas se colocan en tarrinas con hielo y pasan a las mesas de clasificación para evaluar el calibre (diámetro exterior de la tripa o tubo intestinal) y la calidad de las mismas (figura V.17), según las alteraciones de la pared antes mencionadas (apartado I.4.2). El calibrado se realiza insuflando aire comprimido en el interior del intestino y comparando con una escala que se ubica en cada mesa (calibre) (figura V.18).



**Figura V.17.** En establecimiento procesador de tripas se observan las tripas desarradas en el transcurso de su clasificación por calidad y calibre.



**Figura V.18.** Detalle del proceso de calibrado de la tripa desarrada insuflando aire comprimido en su interior y comparando con una escala ubicada en la mesa.

El aire comprimido emerge de un pico ubicado en cada mesa de trabajo<sup>21</sup>. El calibrado se realiza de a tramos cortos (2 a 5 metros, aproximadamente) (figura V.19).



**Figura V.19.** Detalle del proceso de calibrado de la tripa desarrada.

<sup>21</sup> En el caso de la tripa ovina, el calibrado se realiza con agua en lugar de aire.

Cuando en un tramo se encuentran distintos calibres, se corta la tripa y se clasifican por separado, según sean los calibres. Una vez calibrado, se miden los trozos y se arman las madejas (unidad de comercialización)<sup>22</sup>.

El largo de las madejas depende de las especificaciones del cliente, puede ser, a modo de ejemplo, de 18, 30 y 50 metros. Con relación al calibre, las empresas fijan sus rangos de calibre y son variables. Nuevamente, a modo de ejemplo, tripa orilla 35/38 mínimo y máximo de 49 +; tripa salame -50 a + 65; y tripones desde -100 a +140 (expresados en mm).

Posteriormente, se identifican. Generalmente, para la identificación por calidad y calibre se utilizan hilos plásticos de distintos colores (figura V.20). Los códigos de colores de los hilos también varían según las empresas. Cada empresa desarrolla su codificación característica que forma parte de su dinámica o manejo interno. No hay reglamentaciones específicas con respecto a calibres, metraje de las madejas y códigos de colores.

A esta primera identificación se agrega la de trazabilidad<sup>23</sup> que puede ser muy variada como, por ejemplo,

---

<sup>22</sup> En el caso de las piezas que se comercializan por unidades, una madeja equivale a cierta cantidad de unidades del mismo tipo. Es el caso del tripón y del culato que, generalmente, van atados de a 5 unidades.

<sup>23</sup> La trazabilidad o rastreabilidad se define como el rastreo de los alimentos para seguir su desplazamiento a través de la o las etapas de producción, transformación y distribución (*Codex Alimentarius*). La trazabilidad en la tripa es difícil de realizar, ya que se clasifican y organizan madejas según su calidad y calibre, o sea que la madeja estará conformada de varios trozos de intestinos procedentes de distintos animales que, a su vez, proceden de lotes de distintos frigoríficos. Al envasar las tripas, este

aros de colores. Si bien al arribar al establecimiento, las tripas llegan con una primera identificación de trazabilidad que acompaña los procesos anteriores, aquí se sustituye por la identificación que acompañará a cada madeja cuando se comercialice.



**Figura V.20.** Detalle del proceso de identificación de las madejas, una vez calibradas y armadas según las exigencias del cliente. En la figura pueden observarse, en segundo plano en las mesas, los hilos de colores. En primer plano, se utiliza un hilo rojo.

---

procedimiento se vuelve más complejo, ya que un envase va a contener determinada calidad y calibre pero procedencias de distintas fechas de producción y de frigoríficos distintos. En general, se coloca en la tarrina correspondiente la fecha de producción del día que se completa y cierra el envase.

(d) *Salado y escurrido*

Una vez calibradas, se salan a mano cada una de las madejas con sal de primer uso (salazón seca). Se debe realizar cuidando que la sal llegue a toda la madeja, en especial a la zona donde se ata la madeja, donde es más difícil que entre la sal (figura V.21).



**Figura V.21.** Proceso de salado a mano de las madejas luego de la calibración.

El objetivo del proceso de salado es reducir el contenido de agua en la tripa natural. De esta forma, el agua se combina con la sal y queda muy poca agua disponible para el crecimiento bacteriano. Luego de saladas, las madejas se

acondicionan en prensas formando capas con sal entre medio de ellas y se dejan reposar durante un mínimo de 24 horas.

En su base, las prensas deben permitir que escurra la salmuera que se forma por deshidratación de la tripa, de forma que las madejas que se encuentran debajo de toda la pila escurran también y no queden embebidas en salmuera (figura V.22.).



**Figura V.22.** (a) Tripa orilla salada y (b) tripón salada previo a su almacenamiento.

*(e) Sacudido y envasado*

Al día siguiente, se retiran las madejas de las prensas y se sacuden para retirar el exceso de sal de las mismas. Luego

se trasladan al área de envasado y se colocan en tarrinas plásticas, previamente forradas en su interior con bolsas de nylon. Se cubren con salmuera de 24° Bé. La salmuera también puede ser acidificada con ácido acético de calidad alimentaria con un pH no mayor a 4. Se cubren con sal en la superficie y se cierra la bolsa de polietileno y se tapa la tarrina. La misma se identifica con un número que permitirá saber rápidamente, a través del sistema informático de trazabilidad, la información del producto correspondiente. Las tarrinas son estibadas en un depósito a temperatura ambiente hasta su comercialización. Pocas veces se depositan en cámaras de frío debido a los costos implicados en función del volumen ocupado.



**Figura V.23.** Tripas Bovinas saladas almacenadas en tarrinas cerradas.

Además, se estudiaron los siguientes manuales y su implementación: Buenas Prácticas de Manufactura (GMP: Good Manufacturing Practices), Procedimientos Operativos Estandarizados de Higienización (SSOP: Procedures Operating Standard of Sanitization) y Sistema de Análisis de Peligros y

Puntos Críticos de Control (HACCP: Hazard and Analysis Critical Control Points) y los registros que se desprenden de los mismos. Las normativas nacionales y las internacionales exigen estos “Sistemas de Gestión de la Inocuidad”.

El estudio concluyó que las empresas cumplen con los procedimientos para garantizar la inocuidad del producto. Las tres empresas estudiadas fijaron su PCC en la salmuera que se agrega a las tripas saladas ya envasadas. En una de las triperías, la salmuera se acidificaba con ácido acético calidad alimentaria y el límite crítico era  $\text{pH} < 4$ , mientras que como procedimiento de GMP se elaboraba la salmuera saturada y se controlaba la densidad de la misma. En las otras dos empresas, el límite crítico se estableció en la densidad igual a 25° Bé. Durante el período de estudio, en ningún momento se observó desviación de ese PCC.

El programa HACCP ofrece a la industria las herramientas para evitar problemas de inocuidad en los alimentos porque mantiene, en todo momento, el proceso bajo control (Bertacchi, 2000).

En el HACCP de las empresas se observó que los peligros significativos eran de orden microbiológico (bacterias patógenas) (Figura V.24). Dentro de ellas, cabe destacar el *Staphylococcus aureus*, patógeno oportunista, tolerante a la sal, resistente a la desecación, que puede crecer en productos con una actividad de agua baja como 0.85 (contenido de sal del 15%) (ICMSF, 1996). Por otra parte, con relación al género

*Salmonella*, cuyo recuento en heces es mayor que en el contenido ruminal (ICMSF, 1998), la salmonelosis es la zoonosis más difundida en el mundo (Acha & Szyfres, 1986). Existen estudios que indican que los microorganismos del género *Salmonella* son eliminados después de 21 días de salazón seca de las tripas contaminadas naturalmente (mantenidas a 6°C). Sin embargo, al combinar la acción conservante de la salmuera saturada y manteniendo el pH en 4 con ácido acético, se pueden eliminar en 24 horas a 25°C (ICMSF, 1985).

Por tanto, y en base a los riesgos microbiológicos identificados en el HACCP, se optó por considerar como microorganismos indicadores a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.* Así, el estudio de ambos patógenos en las tripas bovinas saladas se consideró significativo para determinar si se eliminaban con el salado en seco y con la salmuera saturada acidificada con ácido acético, a pesar de depositarse a temperatura ambiente.

Cabe mencionar que los microorganismos responsables de la alteración en la coloración y estructura de la tripa no fueron considerados, pero debemos recordar que el objetivo del HACCP es la obtención de un alimento inocuo.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPA DEL PROCESO	PELIGRO	PCC	LÍMITES CRÍTICOS	MONITOREO	FRECUENCIA	ACCIÓN CORRECTIVA	REGISTRO	VERIFICACIÓN
Recepción de las tripas provenientes de los establecimientos de faena.	Microbiológico	1	Presencia de:  - contenido gastrointestinal  - alteraciones del intestino  - coloraciones anormales	Visual.  Personal de recepción	En cada descarga	Rechazo de la materia prima o de la porción de materia prima que exceda los límites críticos.	Registro en planilla de ingreso: - controles realizados en cada partida y - rechazos	De los registros y de los rechazos. Frecuencia: 2 veces/día.
Envasado con salmuera acidificada	Microbiológico	2	pH inferior a 4 salmuera mínimo 24° Bé.	Medición del pH y del contenido de sal en la solución utilizando peachímetro y aerómetro de Baumé.  Personal de envasado.	Continuo en cada tarrina donde se prepara la salmuera.	Agregado de sal, ácido acético o agua según corresponda.	Registro en planilla de: controles realizados y acciones correctivas	De los registros y medición del pH y salinidad del 10% de la producción diaria.

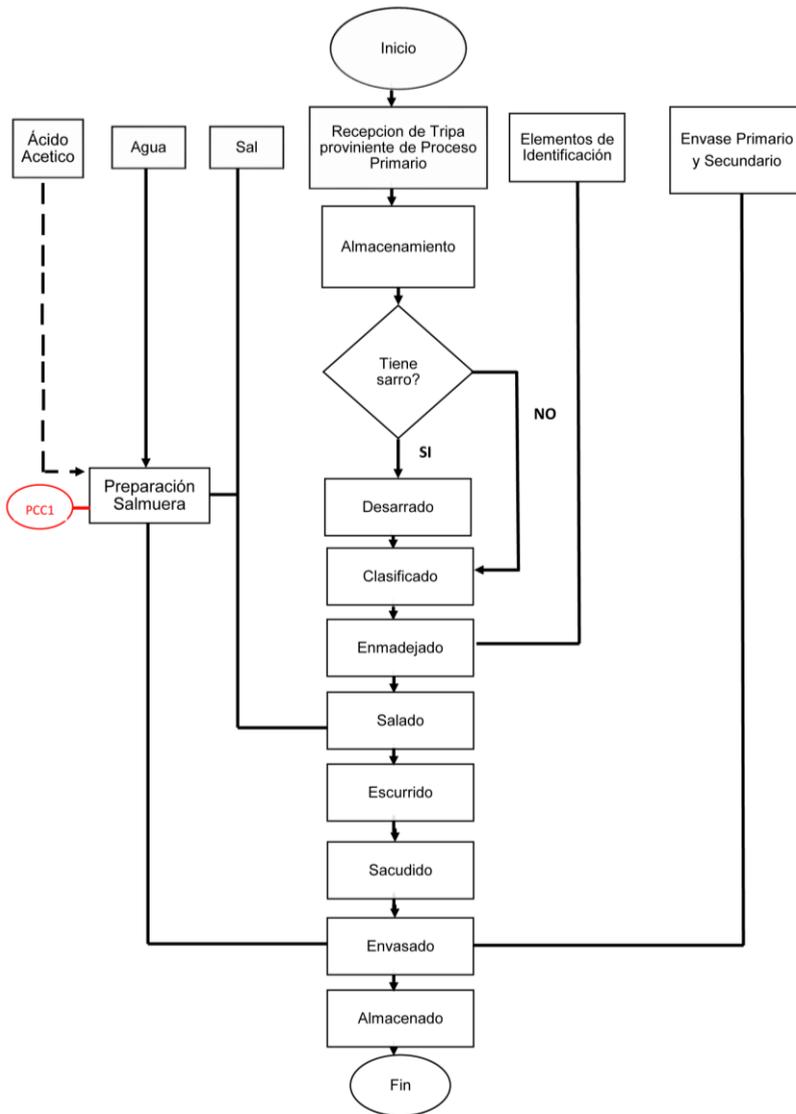
**Figura V.24.** Puntos críticos de control del proceso de elaboración de tripas bovinas saladas (Bertacchi, 2000).

En la figura V.25 se muestra el diagrama de flujo del proceso secundario observado en las empresas evaluadas. El estudio del proceso permitió, además, conocer los valores de recuperación por animal (tabla V.2). Estos valores, si bien no hacen al tema en sí, son relevantes para un cálculo de pérdidas económicas producidas por las alteraciones aquí descritas para trabajos de investigación futuros, pues se trata de rendimientos promedio de producción de la industria de la tripa en Uruguay.

**Tabla V.1.** Valores de Producción por animal\*.

<b>Tipo de Tripa</b>	<b>Metros</b>
Tripa Orilla	26-30
Tripa Salame	6 a 7
Tripón	0.80-1
Culato	0.40 a 0.80

\*\*\*(\*) Estos valores presentan variaciones según la edad del animal; para animales jóvenes son menores; para vacunos lecheras serían mayores.



**Figura V.25.** Diagrama de flujo del proceso secundario de acuerdo a las observaciones realizadas; (PCC1): Punto crítico de control.

El estudio de esta etapa permitió conocer y entender el proceso realizado a la tripa bovina. A pesar de las diferencias observadas (por ejemplo, con relación a la composición de la salmuera), el proceso de elaboración de las tripas bovinas básicamente fue el mismo y se encuentra estandarizado.

Más allá del Análisis de Peligros realizado en el HACCP de los establecimientos, se estudió el proceso especialmente para identificar el ingreso de contaminantes al sistema que pudieran provocar las alteraciones definidas (apartado II) en las tripas bovinas. Se determinó que el único aditivo agregado al producto fue la sal, ya sea durante el salado en seco de las madejas, aproximadamente 1,400 Kg de sal por madeja, como también en la elaboración de la salmuera saturada.

#### V.4. INSPECCIÓN SENSORIAL DE TRIPAS LISTAS PARA SU COMERCIALIZACIÓN

La inspección sensorial de las tripas se basó en el color, olor y textura al tacto (ver apartado IV.2.2). En los tres establecimientos estudiados, se encontraron tripas con las alteraciones características.

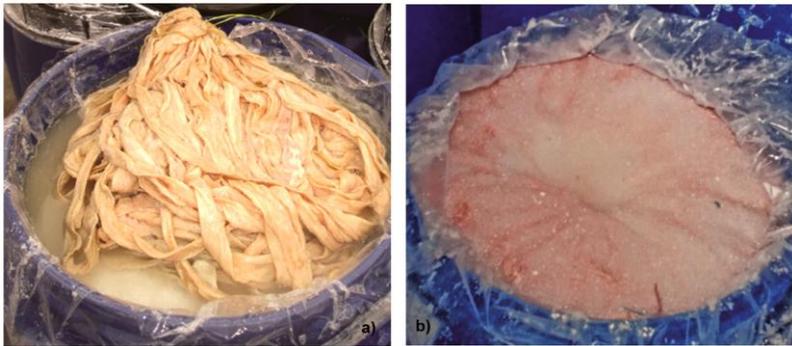
En lo referente al **color**, se estableció como aceptable el rango de blanco a crema (figura V.26 a). Las coloraciones anómalas detectadas fueron rosada, roja y anaranjada (figura V.26 b, V.27. y V.28).

Respecto del **olor**, la mayoría de las tripas alteradas presentaban un olor desagradable, repugnante, que se propagaba rápidamente en el ambiente.

En relación al **tacto**, la mayoría de las madejas de tripas alteradas presentaban un limo viscoso, coloreado, adherido a su superficie (figura V.29). En los casos con mayor tiempo de almacenamiento, en los que incluso faltaba salmuera en la superficie, las tripas eran ásperas al tacto. Las alteraciones encontradas en las tarrinas de tripas aptas para la comercialización comenzaban en la superficie y no se extendían más allá de la mitad de la tarrina. Las características del producto, salado y las alteraciones sensoriales encontradas coinciden con alteraciones similares descritas en alimentos producidas por arqueas halófilas (Czerner, 2011).

Las arqueas halófilas extremas secretan proteasas y

lipasas (Matthey, 2015), provocando destrucción de los tejidos. Según Price & Schweigert (1994), causan pérdidas en la resistencia de la tripa. Por otra parte, Duran *et al.* (2008), mencionan también que el poder proteolítico de estos microorganismos puede debilitar la pared de la tripa, situación que se acentúa con temperatura elevada.



**Figura V.26.** a) Tripas bovinas saladas aptas para su comercialización; b) Coloraciones rosadas y naranjas en tripas bovinas alteradas almacenadas en salmuera.



**Figura V.27.** Coloraciones observadas en tripas alteradas.



**Figura V.28.** Detalle de la coloración rojo anaranjada en tripa y granos de sal.



**Figura V.29.** Coloración anaranjada y aspecto áspero.

En referencia a la incidencia del problema se realizó una cuantificación en los establecimientos con los siguientes resultados.

En un total de 5000 tarrinas inspeccionadas en tres establecimientos, entre un 2,3 % y un 3% de las muestras analizadas presentaban alteraciones en las tripas almacenadas en salmuera. En el establecimiento A, de 3000 tarrinas inspeccionadas, el 3 % presentaba la alteración; en el establecimiento B, de 1500 tarrinas, se presentaron alteraciones en un 3% y en la empresa C, de 500 tarrinas inspeccionadas se encontraron alteraciones en un 2,3%.

Las madejas con estas alteraciones tenían dos destinos posibles:

- a) Aquellas que presentaban solamente la sal y la salmuera coloreada en la superficie de la tarrina o el limo coloreado, sin otras alteraciones, eran reprocesadas. El reproceso consistía en el lavado de la tripa con salmuera saturada, posterior salado en seco, escurrido y envasado nuevamente con salmuera saturada.
- b) Las madejas de tripas que presentaban mayores alteraciones eran eliminadas como residuos. Las madejas que se descartaban constituían aproximadamente un 0.5% del total y representaban pocas madejas por tarrina (entre 2 y 4 madejas por tarrina problema).

Otra observación interesante es que se encontraron tarrinas con coloraciones rosadas en la sal y la salmuera de superficie con tan sólo 20 días de almacenamiento y, en algunos casos, a un mes de envasadas para su comercialización (figura V.30).



**Figura V.30.** Tripas con 20 días de almacenamiento. Se observa la salmuera y la sal de la superficie coloreada.

Al aumentar el tiempo de almacenamiento, se observó un incremento en la intensidad de las alteraciones, por lo cual, las tripas afectadas, en su mayoría, no pueden ser reprocesadas y deben ser eliminadas de la cadena productiva.

Las alteraciones se encontraron también en mercadería de hasta un año y medio de producidas. No se observaron más allá de ese tiempo, pues no se encontraron tripas con fechas de producción anteriores. En este último sentido, Félix *et al.* (2006) investigaron la presencia de bacterias que podrían causar modificaciones irreversibles y no deseables en características sensoriales que limitarían la vida útil en anchoítas saladas, así como algunos casos de toxicidad del producto final por formación de histamina. Precisamente, entre los microorganismos responsables del deterioro se encontraron *Haloarculas spp* y *Haloferax spp*, dos géneros presentes en las tripas bovinas alteradas analizadas en el presente trabajo por estudios moleculares (apartado V.9).

## **V.5. DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS**

Los estudios microbiológicos y las pruebas bioquímicas se realizaron con el objetivo de identificar la presencia de microorganismos halófilos extremos como posibles agentes responsables de las alteraciones mencionadas (apartado V.4) en tripas bovinas.

A tal efecto, se analizaron los componentes del sistema en estudio (sal, agua, ácido acético y tripas sin salar) y en las tripas saladas. La metodología utilizada se describe en el apartado IV.2.3.

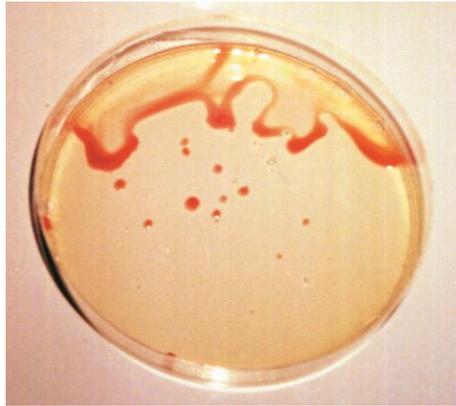
### **V.5.1 Detección y cuantificación de arqueas halófilas en los componentes del sistema**

La metodología seguida para la detección de arqueas halófilas en los distintos componentes del sistema (agua, ácido acético y tripas sin salar) se describe en el apartado IV.2.3.1.

Como era de esperar, a excepción de la sal, en las muestras de agua, ácido acético y tripas sin salar, no se observó crecimiento bacteriano, lo que indica que en dichos componentes no había presencia de arqueas halófilas.

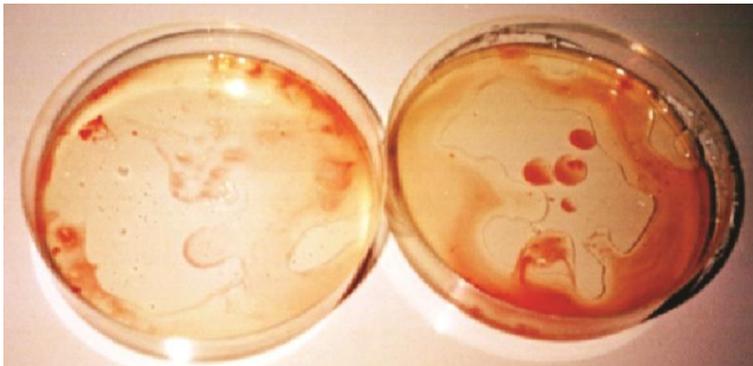
En lo que respecta a la sal, sí se observó presencia de arqueas halófilas, puesto que se detectó la aparición de colonias mucosas de coloraciones características rosadas, rojizas o anaranjadas (Prandl *et al.*, 1994) en medio TSL.

Con relación a la sal en grano sembrada en superficie, se observó crecimiento de halófilas en un 30% de las muestras analizadas (figuras V.31).



**Figura V.31.** Crecimiento observado en pool de sal.

En relación a la siembra en superficie de sal en solución se observó crecimiento en el 70% de las muestras analizadas. El período de incubación fue entre 7 y 27 días (figura V.32 y V.33).



**Figura V.32.** Siembra en superficie de sal en solución.



**Figura V.33.** Sal en medio con 20% de NaCl con crecimiento de halófilas a los 27 días.

Esta última muestra, que demoró más en desarrollarse, se correspondió con una prueba donde se utilizó un 20% de sal en el medio en lugar de 25%.

La cuantificación de las arqueas halófilas (en agar halofílico, APHA 2001), se realizó en cada lote de sal ingresado durante un año en dos triperías, siguiendo la metodología indicada en el apartado IV.2.3.3. Los recuentos obtenidos fueron siempre  $< 10$  ufc / g (límite de sensibilidad de la técnica).

Es decir, no se detectó la presencia de halófilas por encima del límite de sensibilidad de la técnica. Las partidas de sal provenían de 4 proveedores y se trataba de sal marina importada de distintos países de origen.

Se concluye que la cantidad de microorganismos existentes en la sal es muy baja, como se desprende de los resultados de la petrografía (apartado IV.2.1).

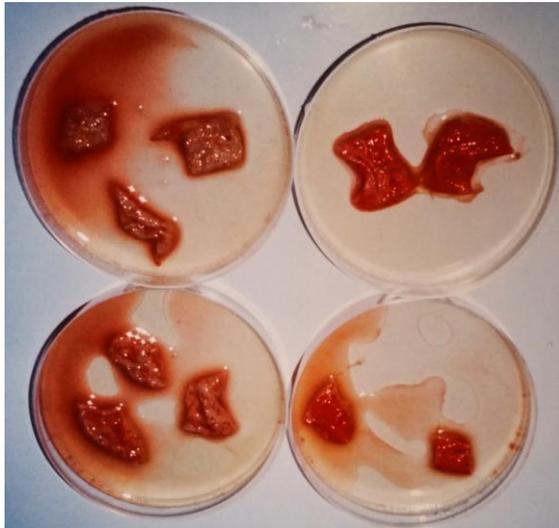
Las referencias bibliográficas muestran que microorganismos encontrados en cristales de yeso halita (formas minerales del sulfato de calcio y el NaCl) están activos porque han sido capaces de incorporar carbono y nitrógeno por períodos de hasta un año (Ramírez *et. al.*, 2004). Se han observado bacterias halotorantes en cristales de sal de 250 millones de años de edad, que han sido cultivadas con éxito. Este hecho muestra la sorprendente resistencia de las halófilas, incluso luego de períodos prolongados de tiempo; de hecho, organismos del tipo Halobacterium son tan halófilos que sólo pueden crecer asociados a cristales de sal (Madigan *et al.*, 2009).

#### **V.5.2. Detección de arqueas halófilas en tripas bovinas saladas**

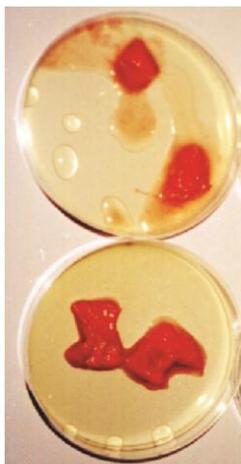
En el caso de la tripas bovinas ya saladas (producto terminado), también se evaluó la presencia de arqueas halófilas siguiendo la metodología descrita en el apartado IV.2.3.3. En este caso se analizaron tripas sin alteraciones (control) y tripas que presentaban las típicas coloraciones rosáceas, anaranjadas o rojizas.

Los resultados obtenidos indicaron ausencia de arqueas halófilas en el 100% de las muestras control. Mientras que para las muestras de tripas que presentaban las alteraciones

características, se observó desarrollo de colonias típicas de arqueas halófilas extremas en el 90% de las mismas (figuras V.34 y V.35). Así, se pudo observar una intensificación del color de las muestras al sembrarlas en medio TLS (IRAM, 1988) y la aparición de colonias coloreadas típicas. Al sembrarse en un medio para halófilas extremas, que aporta 25% de NaCl y bajos niveles de  $K^+$ ,  $Mg^{++}$  se desarrollaron colonias típicas y se incrementó la coloración producida por los pigmentos carotenoides, producidos en grandes cantidades por las Halobacterias (Das Sarma & Aurora, 2001).



**Figura V.34.** Aumento de la intensidad del color en las tripas alteradas y desarrollo de colonias en medio para halófilas extremas.

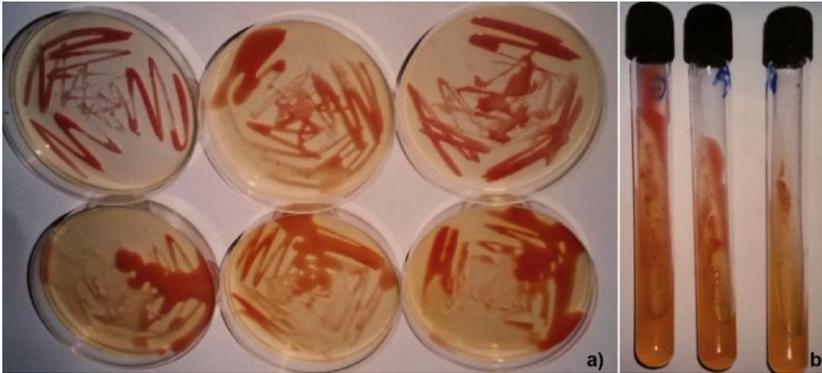


**Figura V.35.** Desarrollo de colonias en tripas alteradas sembradas en superficie.

### **V.5.3. Aislamiento de arqueas halófilas**

A partir de las siembras en placa con agar TLS de las tripas alteradas y de la sal se aislaron las colonias sospechosas mediante siembra en estrías y repique en agar TLS. El objetivo fue obtener cultivos puros para realizar estudios complementarios de identificación.

Como se puede apreciar en la figura V.36, se logró aislar las cepas sospechosas, sin observarse problemas en el desarrollo de las cepas (figura V.36 a y b). En un sólo caso el crecimiento fue dudoso.



**Figura V. 36.** a) Repique en medio para halófilas extremos; b) Repique en agar inclinado ambos con desarrollo de la coloración característica.

#### **V.5.4. Cuantificación de arqueas halófilas en tripas bovinas saladas alteradas y no alteradas**

Una vez identificada la presencia de arqueas halófilas en tripas con alteraciones de color (ver apartados V.5.2), se procedió a cuantificarlas utilizando la metodología descrita en el apartado IV.2.3.2. Además, también se realizaron recuentos en las tripas saladas sin alteraciones aparentes (control).

Los recuentos observados para las tripas no alteradas listas para comercializar fueron de entre  $<10$  ufc/g y 100 ufc/g.

En las muestras de tripas alteradas estudiadas se encontraron valores muy variables desde 3 log ufc/gr a 5,95 log ufc/g.

### **V.5.5. Detección de patógenos (*Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus*) en tripas saladas**

El objetivo en la búsqueda de estos patógenos, que pueden estar presentes en el tracto digestivo de animales (Jouve, 1996) según ya se mencionó en el apartado IV.2.3.6, fue estudiar su comportamiento luego del proceso y con relación a la posible existencia de arqueas halófilas extremas en la sal.

Los resultados de los muestreos semanales realizados a las tripas saladas aptas para la comercialización durante un período de un año para *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* mostraron ausencia de *Salmonella* para todas las muestras analizadas y  $< 100$  ufc para *Staphylococcus aureus* (límite de sensibilidad de la técnica).

El *S. aureus* compite mal con otras bacterias; por ello, rara vez causa intoxicación alimentaria en un producto crudo (ICMSF, 1996). Por otra parte, el almacenamiento prolongado a temperatura ambiente con alto contenido de sal (es decir baja  $a_w$ ), puede reducir los niveles de patógenos entéricos (ICMSF 2011).

En suma, no se encontraron estos patógenos en ninguna de las muestras. Por lo tanto, se puede concluir que la tecnología de barreras (salado en seco y salmuera saturada para bajar el  $a_w$  y conservar el producto y pH ácido) fue efectiva

para eliminar a los microorganismos patógenos, incluido el *Staphylococcus aureus*, que es halotolerante.

Por otro lado, no fue el caso para los contaminantes (arqueas halófilas) responsables de las alteraciones en la tripa. Por el contrario, el método de conservación de elección resultó ser la vía de ingreso de los contaminantes al sistema.

## V.6. ANÁLISIS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas bioquímicas realizadas con la finalidad de identificar las arqueas halófilas detectadas en las diferentes muestras analizadas indicaron que el 100% de las muestras estudiadas resultaron ser oxidasa, catalasa, glucosa y reducción de nitratos positiva y no presentaron crecimiento en gelatina.

El género *Haloarcula* es descripto por Bergey's (2001) como oxidasa y catalasa positivo, según la especie hidrolizan o no la gelatina y producen o no indol. Por otra parte, con relación al género *Haloferax*, la mayoría de las especies hidrolizan la gelatina y sí reducen el nitrato y producen indol, pero también hay especies que no lo hacen. Por otra parte, Cui *et al.* (2010) describen un nuevo género, *Halogranulum*, catalasa, oxidasa y positivos, que puede variar en referencia al indol y la gelatina. Por otra parte, los microorganismos del

género *Haloterrigena* son halófilas extremas, catalasa y oxidasa positivas.

Dada la diversidad de microorganismos halófilos que pueden ser aportados por la sal de distinto origen, se consideró que las pruebas bioquímicas únicamente servían de orientación, dada la gran diversidad de géneros y especies.

Por tanto, se destaca la necesidad de realizar otro tipo de análisis (identificación a nivel molecular), en algunas de las muestras aisladas, de preferencia de sal de distinto origen, para poder identificar los microorganismos implicados en las alteraciones características de las tripas bovinas saladas.

## V.7 DETERMINACIÓN DEL pH Y $a_w$

Del estudio del  $a_w$  y pH en tripas bovinas saladas listas para su comercialización (distintas fechas de producción), realizados durante un año para conocer sus valores, una vez almacenados, se desprende que los niveles de  $a_w$  (a 20 °C) oscilaron entre 0,87 y 0,79, y los de pH (a 25°C) entre 6,1 y 3,9. En las figuras V.37 y V.38 se muestran los gráficos correspondientes.

A medida que baja el  $a_w$ , las posibilidades de crecimiento de las bacterias disminuyen pero, en el caso de los extremófilos, igual pueden crecer (Davis *et al.*, 1995; Madigan & Martinko, 2009).

Según Ventosa (1994), las halobacterias son un grupo de procariontes muy bien adaptados a vivir en ambientes con alta salinidad, siendo capaces de crecer óptimamente en soluciones saturadas de NaCl. Hoy en día, se sabe que los ambientes que hasta hace poco eran considerados inhabitables por el hombre son colonizados por microorganismos extremófilos que pueden adaptarse a nichos ecológicos definidos como ambientes extremos (Ramírez *et al.*, 2006; Castro Piña *et al.*, 2011). Como se indicó antes, los ambientes hipersalinos son un tipo de ambiente extremófilo con un alto nivel de estrés osmótico y una fuerte presión de selección (Castell González, 2010).

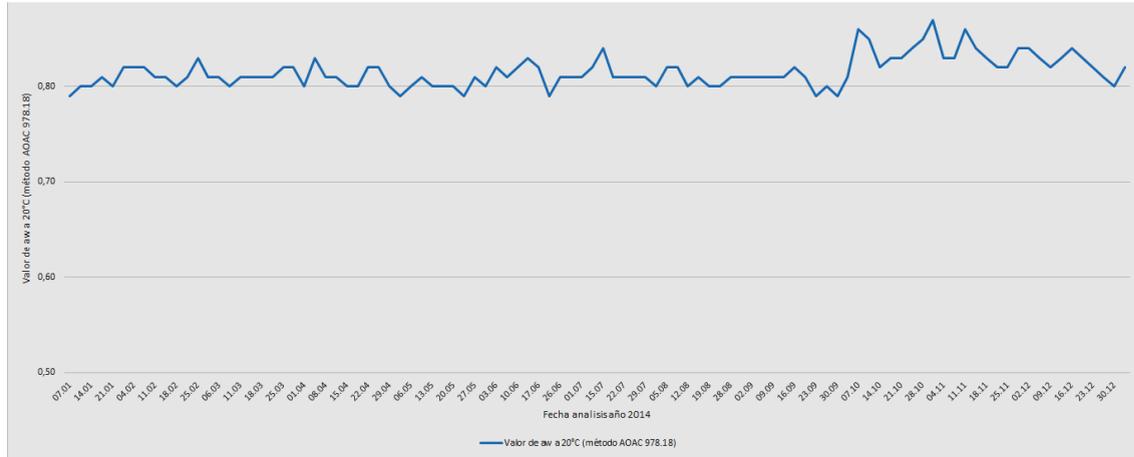


Figura V. 37. Gráfico control de valores de  $a_w$  a 20°C.

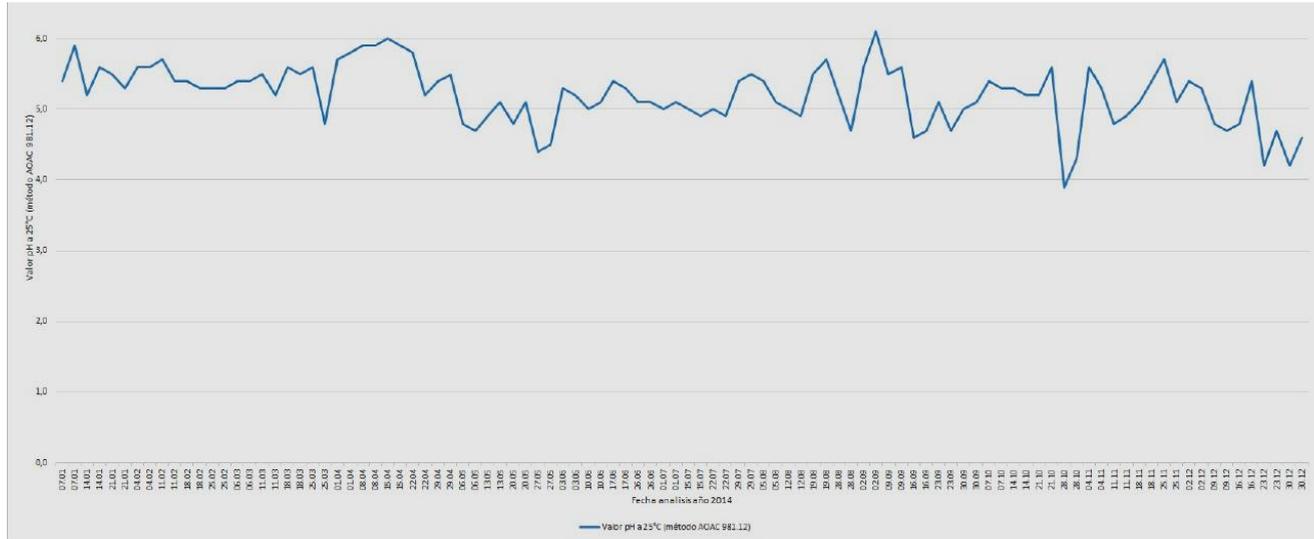


Figura V. 38. Gráfico control de valores de pH a 25°C.

Por otro lado, Wijnker (2006) comprobó que las propiedades antimicrobianas de la sal (NaCl) usadas para conservar tripas naturales son suficientes para reducir la contaminación bacteriana (excepto las esporas de *Clostridium*), muy por debajo de los niveles aceptables en un nivel de actividad de agua de 0,85 o menor durante un período de almacenamiento de 30 días. En relación al pH, el rango de crecimiento es amplio, para *Haloterrigena* el rango de pH en el que pueden crecer es de entre 5 y 10, para *Haloferax* y *Haloarcula* es entre 5 y 8 (Bergey's, 2001).

Estos resultados permiten concluir que, a pesar del  $a_w$  bajo y el pH ácido, los microorganismos halófilos igual se desarrollan, confirmando su capacidad de crecimiento en condiciones extremas.

## **V.8. ESTUDIOS DE MORFOLOGÍA CELULAR**

### **V.8.1 Frotis, tinción GRAM y microfotografías**

Con el objetivo de apreciar la morfología bacteriana de las arqueas halófilas y su comportamiento frente a la tinción GRAM, se realizaron frotis y se tiñeron siguiendo la metodología descrita en los apartados IV.2.6.1 y IV.2.6.2.

En la figura V.39a se aprecian cocos y bacilos. Este frotis corresponde a un aislamiento realizado de un pool de sal de distintos orígenes. La coexistencia de cocos y bacilos puede

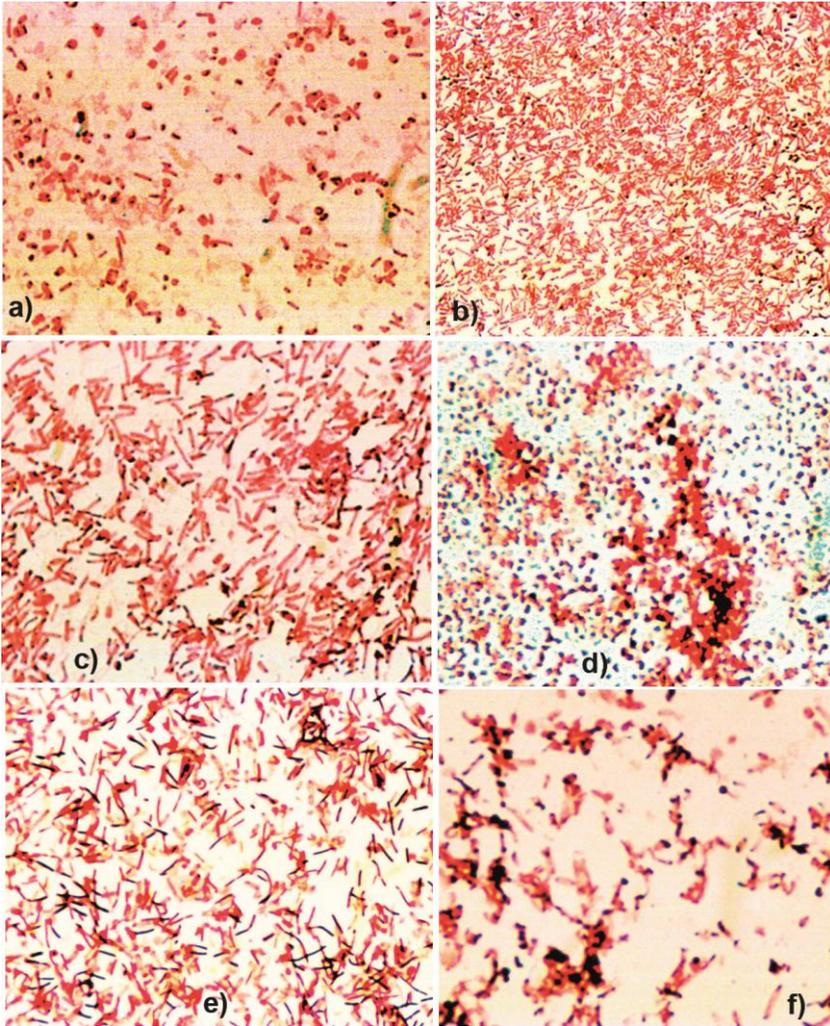
deberse a que la sal, de distintos orígenes, aporta diferentes microorganismos, pero también puede ser consecuencia de su gran pleomorfismo (Bergey's, 2001).

En la figura V.39b se observan innumerables bacilos GRAM negativos. En este caso, el cultivo fue un repique de tripa que presentaba alteraciones típicas. La figura V.39c corresponde al mismo cultivo pero la densidad de bacilos fue menor.

En la figura V.39d se aprecia gran cantidad de cocos; se trata de un frotis correspondiente a un aislamiento a partir de un pool de sal, en este caso, no se presentan morfologías variadas.

En la figura V.39e se observan bacilos GRAM positivos y GRAM negativos, en este caso, el cultivo de origen fue una tripa alterada. Incerti & Ramos Cormenzana (1996) y Piñar *et al.* (2002) describen microorganismos halófilos GRAM variables, es decir, el mismo microorganismo puede manifestarse como GRAM positivo o negativo.

Por último, en la figura V.39f se observan bacilos y cocos GRAM negativos juntos, en este caso, también se trató de una muestra de sal.



**Figura V. 39.** a) Bacilos y cocos. Origen: Pool de sal; b) Innumerables bacilos GRAM negativos. Origen: tripa alterada (1er repique); c) el mismo frotis, Bacilos GRAM negativos a menor densidad. Origen: tripa alterada (1er repique); d) Muchos cocos. Origen: Pool de Sal; e) Bacilos GRAM positivos y GRAM negativos. Origen: tripa alterada (1er repique); f) Bacilos y cocos GRAM negativos juntos. Origen: Pool de sal (1er repique).

En la figura V.40a, se observa que los bacilos GRAM negativos y GRAM positivos coexistentes en un mismo frotis corresponden al 25,9% de las muestras, al igual que los bacilos y cocos GRAM negativos también presentes en un mismo frotis. Los bacilos GRAM negativos también corresponden a un 25,9%. Los cocos GRAM positivos constituyen un 14,8%. Finalmente, encontramos un 3,7% de los frotis con bacilos y cocos GRAM positivos coexistiendo; el mismo porcentaje corresponde a cocos GRAM negativos.

Si comparamos las figuras V.40b (frotis de tripas) y V.40c (frotis de pool de sal) se observan diferencias tanto en la tinción como en la morfología. En la sal no encontramos frotis que contengan bacilos GRAM negativos y GRAM positivos juntos, ni frotis con cocos GRAM negativos. En tripas no encontramos frotis de cocos GRAM positivos ni de bacilos y cocos GRAM positivos coexistiendo. Por tanto, en el caso de las tripas alteradas, se observaron fundamentalmente formas bacilares tanto GRAM positivas como negativas; mientras que en el caso de la sal se detectaron cocos y bacilos GRAM negativos.

Una vez más, se confirma el gran pleomorfismo descrito para las halobacterias (Bergey's, 2001; Mata, 2006), aunque las formas observadas fueron cocos y bacilos, no se observaron otras descripciones, como triángulos, discos y cuadrados, entre otras. El comportamiento variable ante la tinción GRAM fue descrito en la bibliografía relevada (Oren,

2000; Bergey's 2001; Madigan, 2009). Como se ha mencionado antes, en el caso de pool de sal se podría asumir que las formas detectadas pertenecen a distintos microorganismos, coexistiendo GRAM positivos y GRAM negativos, pero también puede ser un mismo microorganismo comportándose como GRAM variable.

En la comparación entre frotis de sal y de tripas no se llegó a otra conclusión más que a la constatación y registro de los porcentajes de morfologías y comportamiento frente a la tinción GRAM.

.

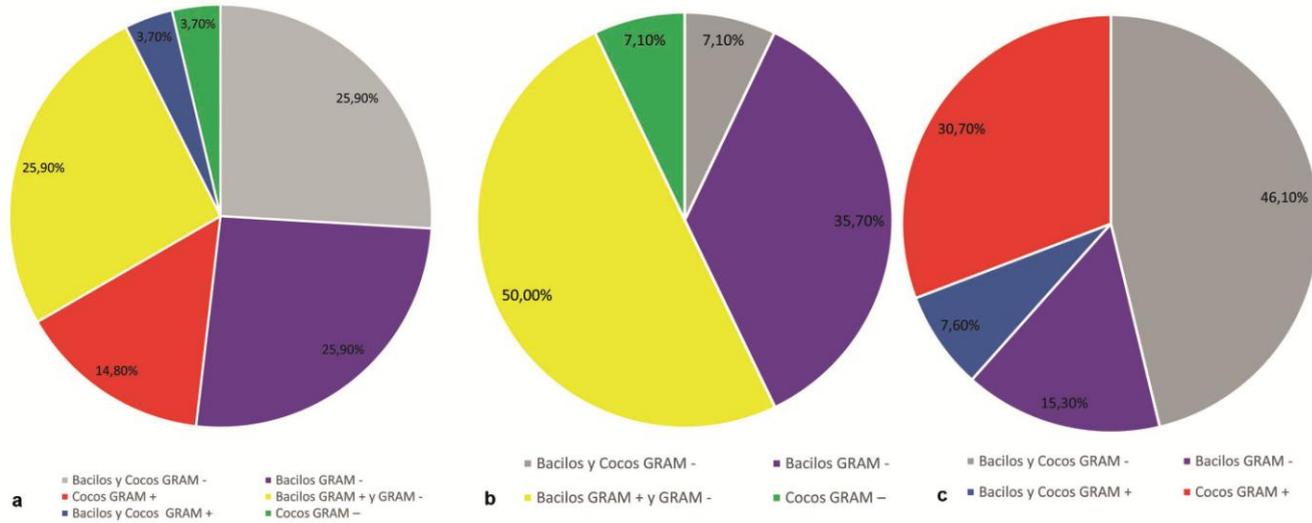
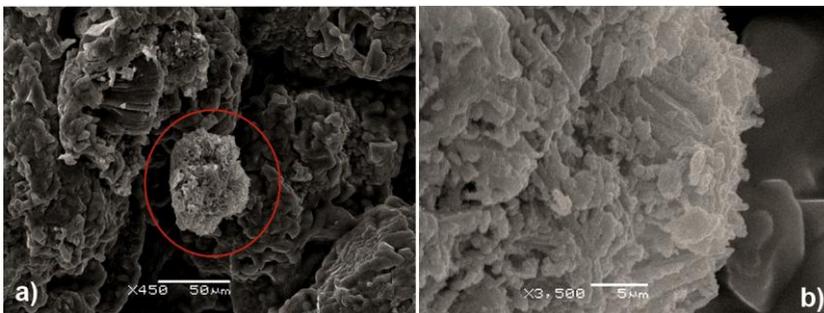


Figura V. 40. Resultados de las morfologías y respuestas GRAM en a) tripas y sal; b) tripas y c) pool de sal.

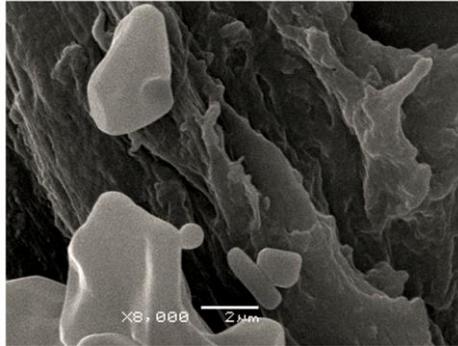
## V.8.2 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía de barrido permitió observar bacilos y, en forma destacada, la formación de biopelículas o biofilms (figuras V.41 a V.45), siendo ésta una observación relevante, pues no hemos encontrado bibliografía que describan estos hallazgos en tripas bovinas.

Las biopelículas observadas en distintas etapas de desarrollo son coincidentes con la viscosidad que cubre las superficies de las tripas alteradas en la evaluación sensorial del producto y con las observaciones realizadas en los cortes histológicos de las tripas alteradas (ver apartado V.8.3). En la figura V.41 a y b se aprecia un biofilm maduro. Otro aspecto a destacar es la presencia de grandes cantidades de cristales de sal (figura V.42).



**Figura V. 41.** a) Biopelícula muy madura; b) A mayor aumento.



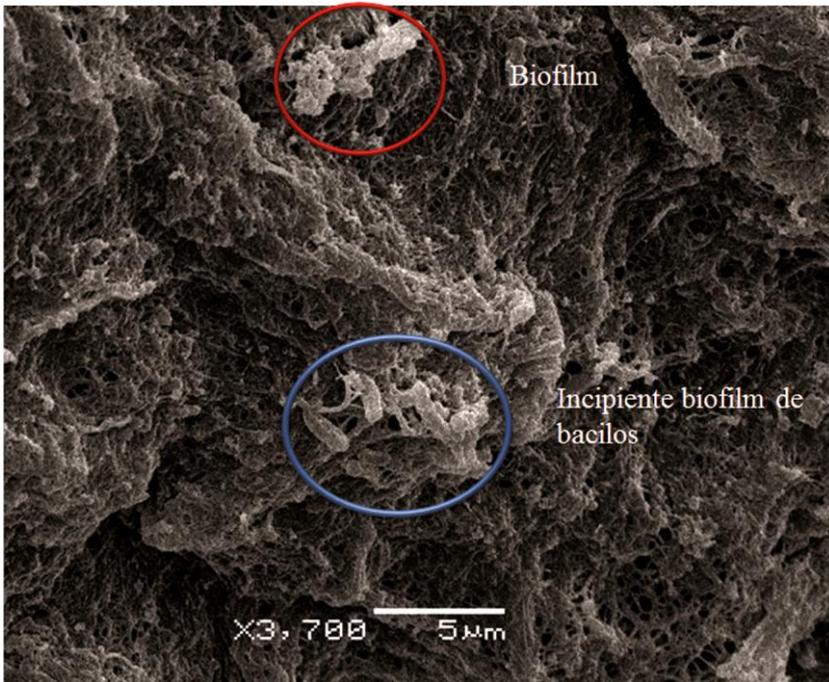
**Figura V. 42.** Presencia de muchos cristales de sal.

Según Lasa (2004), los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo. La formación de un biofilm comienza con la adhesión de algunas bacterias a determinada superficie, según puede observarse en las figuras V.43. y V.44., donde se destacan formas bacilares y biofilms incipientes y maduros.

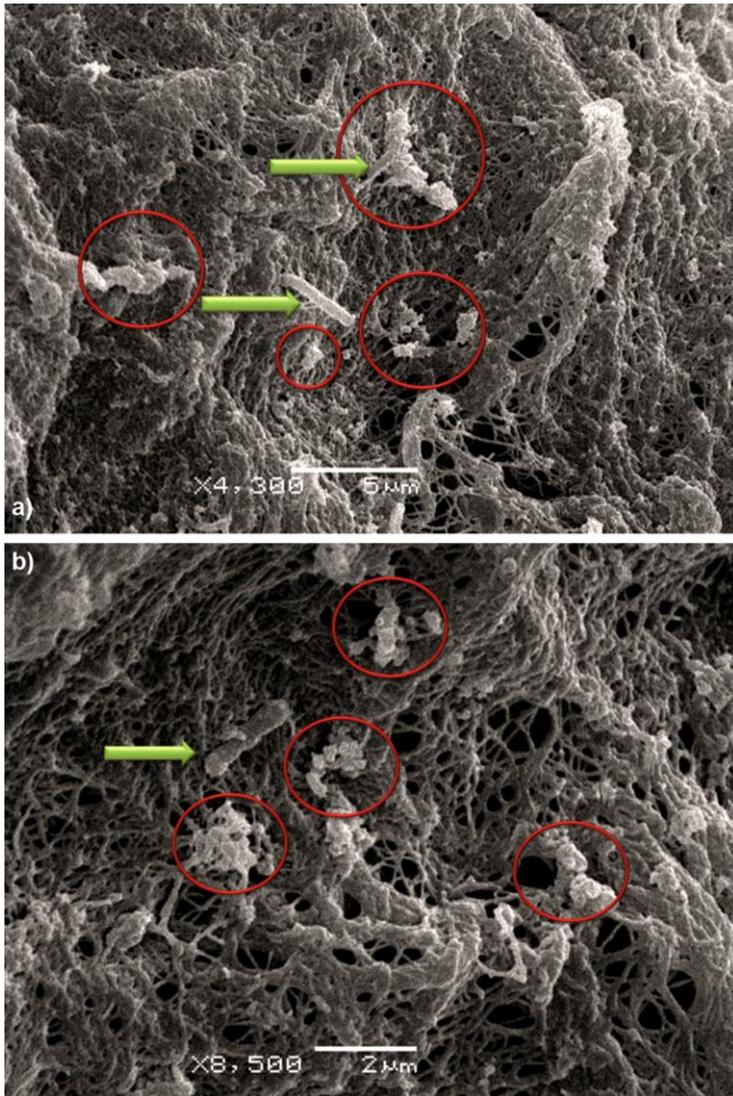
En las fases iniciales de formación de las biopelículas el fenómeno es reversible, pero si el proceso de adhesión continúa, las bacterias comienzan a formar la estructura básica del biofilm, las microcolonias (Figura V. 44). También se establecen comunicaciones físicas entre ellas (nanotúbulos) y con las superficies a través de las cuales se envían señales químicas para organizarse y comenzar la formación de exopolisacáridos; los mismos están constituidos por hidratos de carbono, siendo producidos y liberados por las bacterias, que

favorecen la viabilidad celular (Quesada *et al.*, 1993; Mata Gómez, 2006; Villar & Reyes, 2015).

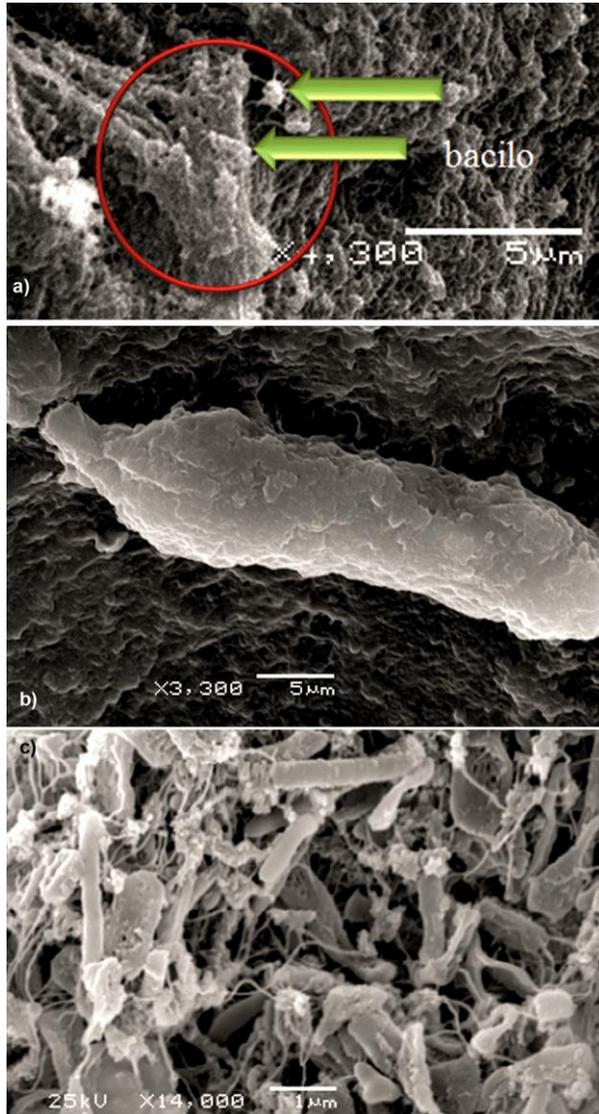
La composición del biofilm varía en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente, como se mencionó antes, por exopolisacáridos secretados por las propias células que forman parte del mismo. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de lisis de las bacterias (Villar & Reyes, 2015). En la Figura V. 45a se puede apreciar un biofilm maduro y un bacilo adhiriéndose a la pared del tejido a través de nanotubos (conexiones entre células que inician el proceso de formación de biofilms) y en la figura V.45b, se observa un biofilm maduro con su cubierta de exopolisacárido (la matriz de exopolisacáridos no permite distinguir células individuales).



**Figura V. 43.** Se indica una incipiente biopelícula de bacilos en círculo azul y una biopelícula madura en círculo rojo.



**Figura V. 44.** a) y b) Biopelículas incipientes señaladas en círculos rojos y bacilos señalados en verde.



**Figura V. 45.** a) El círculo rojo indica una biopelícula madura. Las flechas verdes señalan un bacilo adhiriéndose a la pared del tejido a través de nanotubos; b) biopelícula muy madura con gruesa cubierta de exopolisacáridos; c) bacilos.

### V.8.3 Estudio histológico

El estudio histológico de las tripas en distintas etapas de alteración y en comparación con la tripa “normal” permitió describir las alteraciones a nivel de las distintas capas de su estructura (figuras V.46 a V.48).

En la figura V.46. se pueden observar los distintos tipos de muestras analizadas desde el punto de vista histológico: tripa normal (sin muestras de alteración), tripa alterada con coloración rojiza pero recuperable y tripa con alteraciones importantes, por lo que debe de ser descartada para su uso en alimentación.



**Figura V. 46.** Muestras en preparación para histología. Arriba: tripa normal; al medio, tripa con coloración roja pero recuperable; abajo, tripa para descartar.

En la figura V. 47 se observa la estructura histológica de la tripa “normal”, a nivel del intestino delgado, que muestra una muy buena preservación de la estructura celular y tisular con la coloración de H & E. Como se mencionó en la introducción (apartado I.3), la pared de la tripa se compone por una capa muscular lisa interna con dirección circular (M) y una capa muscular longitudinal externa (M), separadas por tejido conectivo con fibras colágenas, vasos sanguíneos y el plexo nervioso. En la superficie se ubica la capa serosa, formada por tejido conjuntivo laxo revestido por remanente de mesotelio peritoneal y no se observan microorganismos en su superficie. La capa mucosa no existe en ninguna de las muestras, ya que la tripa fue desarrada (procedimiento mediante el cual se elimina la mucosa) (Castro *et al.*, 1981).

La figura V. 48, corresponde a tripa con alteraciones, pero considerada recuperable por la industria, también la coloración fue H & E. Se aprecia pérdida de detalles tisulares a nivel de la capa muscular (M) y gran cantidad de arqueas cocoides en la superficie peritoneal en el área donde estaba el color rojo.

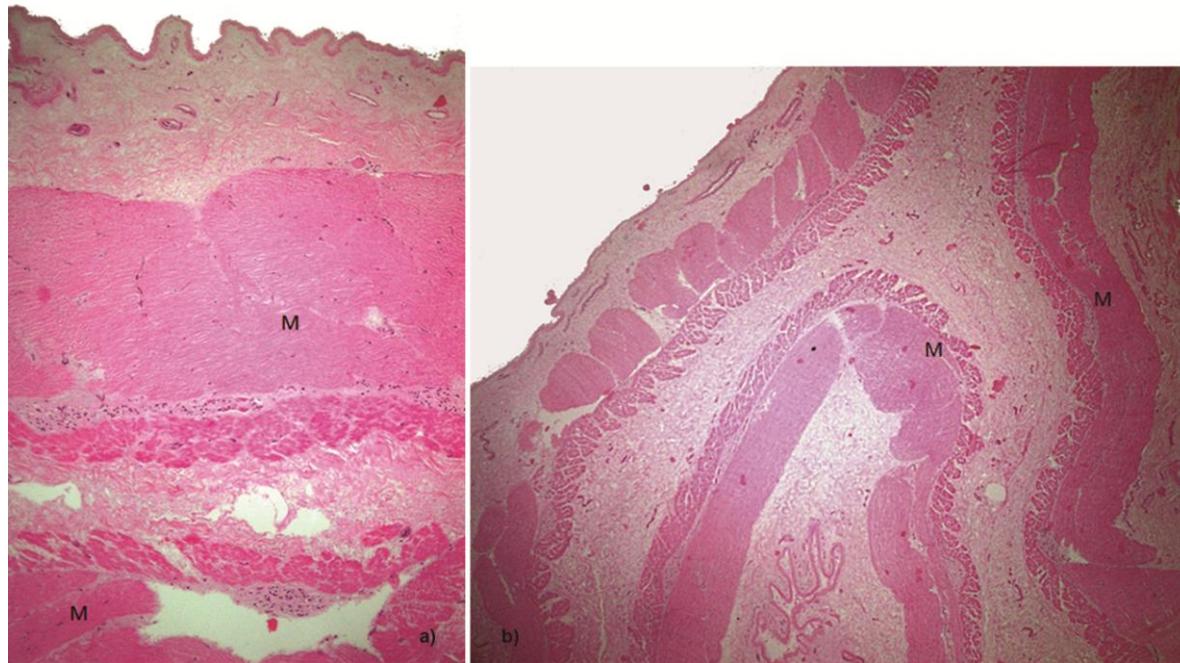
La tripa alterada que se descarta, (figura V. 49), presenta la pared rota, desgarrada, sin detalles tisulares, con separación de tejidos (R) y tiene bacterias en la superficie visceral que invaden la pared. El grado de deterioro es muy grande e irreversible. Así, los microorganismos van más allá de la superficie y penetran en el tejido muscular. Esto está

asociado a las alteraciones del tejido que pierde su estructura original, siendo un proceso irreversible. Este último hecho estaría relacionado con la capacidad de proteólisis y lipólisis de estos microorganismos (Wijnker, 2009).

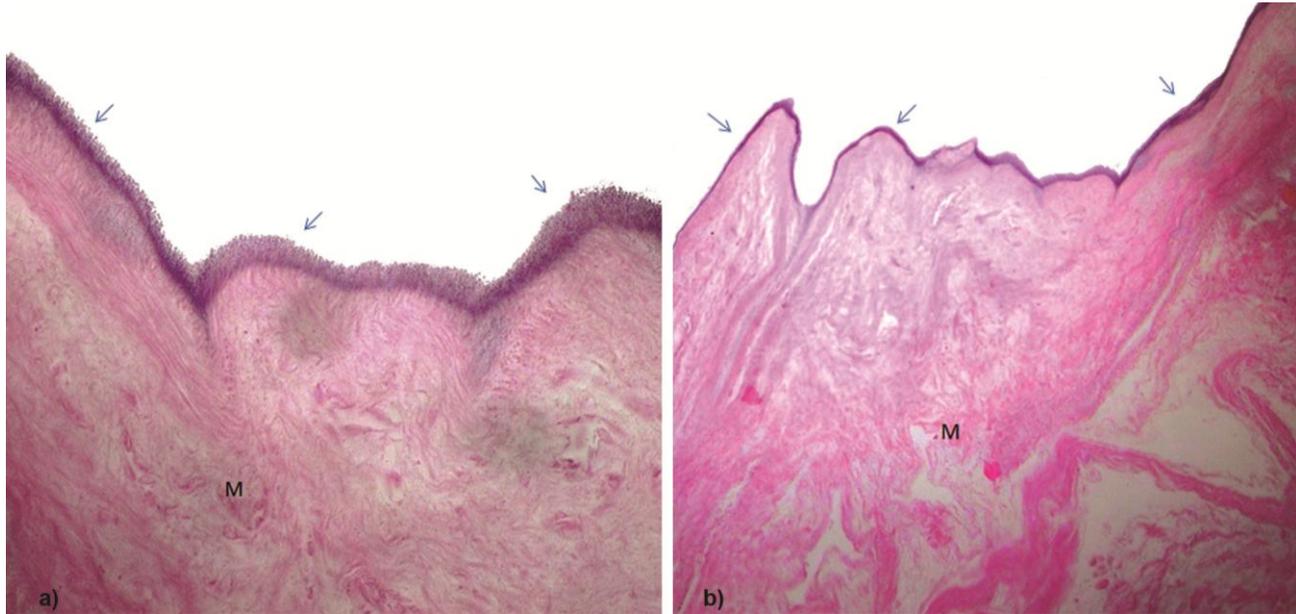
En las dos últimas figuras, se puede ver como las arqueas forman un verdadero biofilm sobre la superficie serosa. Así, se observan las arqueas basofílicas, de forma más notoria en la figura V. 48 porque la estructura se mantiene a pesar de las alteraciones.

Este hallazgo viene a corroborar la existencia de los biofilms observados con la microscopía de barrido (apartado V.8.2) y cabe destacar que no hay ninguna referencia bibliográfica al respecto en tripas bovinas saladas.

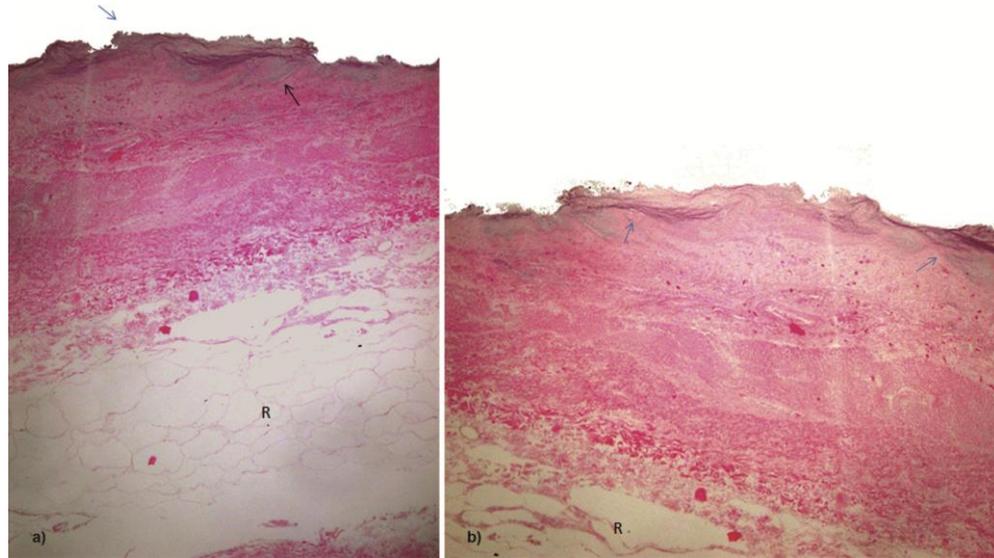
Por último, la figura V. 50 corresponde a la aplicación de la tinción GRAM sobre los cortes histológicos mostrando las arqueas Gram negativas, al igual que la pared intestinal, el tejido muscular y las arqueas se observan del mismo color. Las flechas señalan infiltración de halófilas en el tejido.



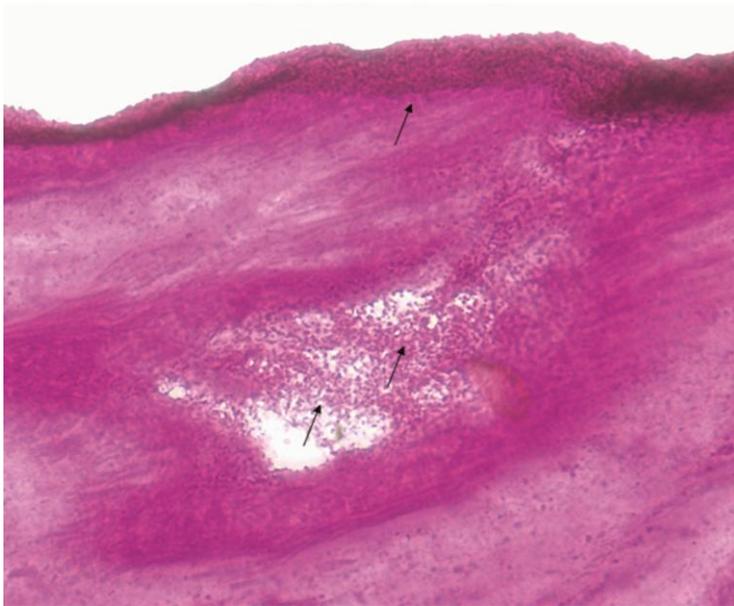
**Figura V. 47.** a) Tripa “normal” con preservación de detalles tisulares; M: capa muscular lisa; b) Tripa “normal” con preservación de estructura histológica y detalles tisulares; M: capa muscular lisa (H&E x100).



**Figura V. 48.** a) Tripa con pocas alteraciones, se reprocesa. Presenta pérdida de detalles tisulares (M) y arqueas cocoides en superficie visceral; b) Tripa con pocas alteraciones con pérdida de detalles tisulares (M) y arqueas en superficie visceral (flechas; H&E x100).



**Figura V. 49.** a) Tripa alterada que se descarta con pérdida de detalles tisulares, ruptura y separación de los tejidos (R) y arqueas en superficie visceral invadiendo la pared; b) Tripa alterada que se descarta con pérdida de detalles tisulares, ruptura y separación de los tejidos (R) y arqueas en superficie visceral invadiendo la pared (flechas; H&E x100).



**Figura V. 50.** Al aplicar la tinción GRAM, el tejido muscular y las arqueas se observan GRAM negativas. Las flechas señalan infiltración de halófilas.

## V.9 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

En base a los resultados obtenidos en el apartado V.6 se consideró conveniente utilizar métodos moleculares de identificación. Puesto que en taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada, se utilizó esta herramienta en el presente estudio.

Así, se analizaron tres cepas aisladas; de las tres cepas se obtuvo ADN genómico y el producto de PCR de tamaño esperado de acuerdo con los cebadores utilizados dirigidos al gen del ARNr de 16S de Archaea.

Se secuenció el producto de PCR y se obtuvieron las siguientes secuencias:

### **Cepa 1**

```
ATCggaGTCCGaTTTAGCCATGCTACCCGCNCGAaTTTAGAccCGg
cagtTAaTgCTCAGTAACacGTGGCCAAACTACCCTNCAGACCGcaAt
AcCCTcggGAAACTGAGGCCAATACCGGATiCaCTCTNACGCTGGA
gtGCCcAgAGtGAGAAACGcTCCGGCGCTGCAGGATGgGGCTGCG
GCCGATTAGGTAGATGGTGGGGTAACGGCCCACCATGCCATAA
TCGGTACaGGTTGTGAGAGCAAGAGCCTGGAGACGGAATCTGAG
ACAAGATAACGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTT
TACTGTACGACAGTGCATAGGGGGACTCCGAGTGTGAGGG
CATATAGCCCTCgCTTTTgTGCACCGTAAGGTGGTaCACGAACAA
GGACTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCA
GTCCAAGTGATGGCCGATaTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGC
T
```

### **Cepa 2 (Halo 1)**

```
CCTGGAaTGGGNAAAGCcCGAAACGCTCCGGCGCCATAGGATGt
GGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCACCGT
GCCATAATCGGTACGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACG
GAATCTGAGACAAGATtCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCG
CGAAACCTTTACTACTGCACGcaAGTGCGATAAAGGGACTCCaAGT
GCGAAGGCATATAGtCcTCgCTTTTGNNCACCGTAAGGTGGTGCA
CGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGcGGTAAT
ACCGGCAGCtCGAGTGATGaCCGATATTATTGGGCCTAAAGCGTC
CGTAGCTGGCCA
```

### Cepa 3 (Halo 2)

```
CTACCCTACAGAGAACGATAACCTCGGGAAACTGAGGCTAATAG
TTCATACNNGGAGTCATGCTGGAATGCCGACTGCCCGAAACGCTC
AGGCGCTGTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGG
GGTAACGGCCACCGTGCCGATAATCGGTACGGGTTGTGAGAG
CAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTA
CGGGGCGCAGCAGGCCGCGAAACCTTTACACTGCACGCAAGTGC
GATAAGGGGACCCCAAGTGCGAGGGGCATATAGTCCTCGCTTTTC
NCNACTGTAAGGNGGTTCGNGGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGG
TGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCTCAAGTGATGACCGAT
aTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCCGGCCACGAAGGTTTCAT
```

Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando la herramienta Blast search y la base 16S rRNA Bacteria and Archaea

De acuerdo con esta comparación se obtuvieron los resultados que se muestran en las tablas V.3 a V.5, donde se destacan los resultados para los que se obtuvo el menor *e-value* y mayor homología; se muestra también el número de acceso de las secuencias más cercanas depositadas en la base de datos (NCBI).

Estos resultados muestran que las tres cepas analizadas presentaron secuencias diferentes con alta homología con secuencias de archaeas halófilas

Según los resultados del análisis, para ninguna de las cepas fue posible inferir la especie. Para las cepas 1 y 2 no fue posible asignar especie porque el porcentaje de similitud de las

secuencias fue menor al 97%. Con respecto a la cepa 2, tampoco fue posible determinar el género, pues su secuencia presentó la misma homología con secuencias de organismos de dos géneros diferentes (*Halogramum* y *Haloterrigena*).

Para la cepa 3, no se pudo asignar especie porque presentó una alta similitud con secuencias de dos especies diferentes (99%), con *Haloferax lucentense* y *Haloferax alexandrinus*, sin embargo se puede asegurar que pertenece al género *Haloferax*.

En conclusión, y de acuerdo con el análisis de las secuencias, las tres cepas fueron diferentes y presentaron secuencias con alta homología con las secuencias de géneros de Archaeas halófilicas (*Haloarcula*, *Halogramum* o *Haloterrigena* y *Haloferax*), siendo todas halófilas extremas.

Los organismos del género *Haloarcula* (Torreblanca *et al.*, 1986; Oren *et al.*, 1999) son extremadamente pleomórficos, y pueden presentar formas triangulares, cuadradas y discos irregulares, según ya se indicó antes. Presentan tinción GRAM negativa; pueden o no ser móviles, aerobias o anaerobias facultativas; oxidasa y catalasa positiva. Su pH óptimo de crecimiento es de 5 a 8. Sus células contienen bacterioruberina y pigmentos retinales.

Por otra parte, los organismos del género *Haloferax* comparten el pleomorfismo, presentan tinción GRAM negativa, ensayos de oxidasa y catalasa positivas; sus células contienen

bacterioruberina y pigmentos retinales, al igual que *Haloarcula* (Bergey's, 2011).

Con relación a la tercera cepa caracterizada como perteneciente al género *Halogramum*, debe destacarse que no se encontró clasificada como género en el Bergey's Manual of Systematic and Bacteriology (2011).

El género *Halogramum* fue definido por Cui *et. al.* (2010, 2011), basado en la descripción de una sola especie, *H. rubrum*. El *Halogramum* es un nuevo género dentro de la familia *Halobacteriaceae*. Kim *et al.* (2011) aislaron el *Halogramum salarium* sp. y en 2012 Cui *et. al.* (2010, 2011) reportaron los *Halogramum gelatinilyticum* sp. y *Halogramum amylolyticum*. Los organismos del género *Halogramum* presentan también tinción GRAM negativa; células pleomórficas y son halófilas extremas (Kim *et. al.*, 2012).

El género *Haloterrigena* presenta también pleomorfismo y son GRAM negativas (Bergey's, 2011). Frecuentemente, producen coloraciones rojas a las salmueras.

**Tabla V.2.** Resultados de la comparación de las secuencia del gen del ARNr de 16S con Cepa 1.

**Cepa 1** (492 nucleótidos analizados)

Max score	E-value	Identity	
Haloarcula tradensis strain HST03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	94%	NR_116664.1
Haloarcula argentinensis strain JCM 9737 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	94%	NR_044335.1
Haloarcula argentinensis strain arg-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	94%	NR_028218.1
Haloarcula japonica strain JCM7785 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	94%	NR_116082.1
Haloarcula hispanica strain Y-27 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	94%	NR_028159.1
Haloarcula salaria strain HST01-2R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	94%	NR_116667.1
Haloarcula marismortui strain ATCC 43049 rrnC operon, partial sequence; and 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	94%	NR_074201.1

**Tabla V.3.** Resultados de la comparación de la secuencia del gen del ARNr de 16S con Cepa 2.

**Cepa 2 (Halo 1) (363 nucleotidos analizados)**

Max score	E value	Ident	Accession
Halogramum amylolyticum strain JCM 16428 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2e-162	96%	NR_113451.1
Halogramum amylolyticum strain TNN58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2e-162	96%	NR_117280.1
Haloterrigena thermotolerans strain PR5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2e-162	96%	NR_028173.1
Natrinema pellirubrum strain JCM 10476 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	3e-161	96%	NR_113528.1
Haloterrigena hispanica strain DSM 18328 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	3e-161	95%	NR_113508.1
Natrinema pellirubrum strain DSM 15624 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	3e-161	96%	NR_102444.1
Natrinema pellirubrum strain JCM 10476 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3e-161	96%	NR_118137.1
Natrinema pellirubrum strain JCM 10476 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3e-161	96%	NR_112856.1
Haloterrigena jeotgali strain A29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	3e-161	96%	NR_115945.1

**Tabla V.4.** Resultados de la comparación de la secuencia del gen del ARNr de 16S con Cepa 3

**Cepa 3 (Halo 2)** (434 nucleótidos analizados)

Max score	e-value	Ident	Accession
Haloferax lucentense strain JCM 9276 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	99%	NR_113443.1
Haloferax alexandrinus strain JCM 10717 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	99%	NR_113438.1
Haloferax alexandrinus strain KCTC 12962 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	NR_117054.1

## VI. CONCLUSIONES

### VI.1. CONCLUSIONES

1. En los establecimientos estudiados, tanto a nivel de faena como en los procesadores de tripas, se constata que, a pesar de adoptarse todas las medidas necesarias para garantizar la inocuidad del producto, con GMP, SSOP y HACCP, se presentan alteraciones sensoriales y estructurales en tripas bovinas prontas para la comercialización
2. Las alteraciones se presentan en la salmuera, en la sal que cubre la tripa en la superficie de la tarina y en la tripa misma, incluso a partir de los 20 días de envasado y se observan a pesar de la acidificación de la salmuera, del salado (seco y húmedo), procedimiento que sí afecta a microorganismos patógenos como *Salmonella* y/o *Staphylococcus aureus*.
3. Tras el análisis del **proceso primario** en los establecimientos evaluados se concluye que el mismo se encuentra estandarizado, respetándose las etapas y controles, ya sea desde el punto de vista de la inocuidad como de la calidad. Por lo tanto, no se ha encontrado en las etapas observadas posibilidad de ingreso de contaminantes responsables de la alteración de la tripa, más allá de los microorganismos ya

presentes en el intestino, que no producen las alteraciones antes descritas.

4. Del análisis del **proceso al que se somete la sal** se concluye que se controlan los parámetros del proceso de secado, pero que el mismo no tiene como finalidad esterilizar la sal. Cabe destacar que la sal que se utiliza en la elaboración de tripas saladas es considerada de uso industrial y calidad alimentaria. No está sometida a controles, más allá de las buenas prácticas que apuntan a un buen secado y a la extracción de contaminantes físicos, como restos metálicos. No obstante, las empresas realizan análisis de detección de arqueas halófilas siendo los recuentos inferiores a  $< 10$  UFC/g. Por otra parte, el análisis petrográfico de la sal revela una densidad extremadamente baja de este tipo de microorganismos:  $< 100$  unidades/cm<sup>3</sup>. Por lo tanto, una carga muy baja de halófilas es suficiente para que, dadas las condiciones necesarias para su crecimiento, puedan desarrollarse exitosamente. Esa baja carga de microorganismos también podría explicar la no alteración en forma uniforme de las tarrinas examinadas que llegan a ser, solamente, un 2 a 3 % del total.
5. El estudio del **proceso secundario** ha permitido conocer y entender el proceso realizado a la tripa bovina. A pesar de las diferencias observadas (por ejemplo, con relación a la composición de la salmuera),

el proceso de elaboración de las tripas bovinas es similar, independientemente de la empresa evaluada, y se encuentra estandarizado. Tras investigar el ingreso de contaminantes al sistema, que pudieran provocar las alteraciones consistentes en coloraciones rojizas en las tripas bovinas, se determinó que el único aditivo agregado al producto fue la sal, ya sea durante el salado en seco de las madejas, como también en la elaboración de la salmuera saturada. Además, en base a los peligros microbiológicos identificados en el análisis de peligro del Plan HACCP, se optó por considerar como microorganismos para monitoreo del proceso de obtención de tripas vacunas saladas al *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.* Así, el estudio de ambos patógenos en las tripas bovinas saladas nos permite monitorear si el proceso fue efectivo y se eliminaron los patógenos con el salado en seco y la salmuera saturada acidificada con ácido acético grado alimentario, a pesar de depositarse a temperatura ambiente.

6. Con respecto a las características de las alteraciones, cabe destacar que su color varía entre el rosado, rojo y anaranjado. El olor que desprenden es muy desagradable. Al tacto se detecta un limo viscoso, coloreado y adherido a su superficie y con el tiempo, si no se acondicionan nuevamente y se agrega salmuera,

la superficie se seca y las tripas se tornan ásperas al tacto.

7. La detección de arqueas halófilas en los componentes del sistema (tripas no tratadas con sal, agua, ácido acético y sal), como posibles responsables de dichas alteraciones, sólo se da en la sal, tanto en estado sólido como líquido. En efecto, estos microorganismos están presentes en un 30% de las muestras de sal sólida y en un 70% de las muestras de salmueras analizadas. El período de incubación fue entre 7 y 27 días.
8. En el caso de las muestras de tripas alteradas, la presencia de arqueas se detecta en el 90% de las muestras analizadas con recuentos que oscilan entre 3 y aproximadamente 6 log de ufc/g, mientras que en las tripas sin alteraciones este grupo de microorganismos no se detecta.
9. Los microorganismos responsables de la alteración se desarrollan a niveles de  $a_w$  de entre 0,87 y 0,79 y de pH de entre 6,1 y 3,9 confirmando su capacidad de crecimiento en condiciones extremas.
10. Se ha comprobado que no hay un único microorganismo responsable del deterioro, sino que se trata de distintos géneros y especies de arqueas halófilas extremas. Se concluye que el origen de la sal aportaría el tipo de microorganismo, por lo que podrían encontrarse otros

géneros y especies, como las descritas por otros autores.

11. Las cepas identificadas como responsables de las alteraciones objeto de esta tesis son tres cepas distintas pertenecientes a los géneros de Archaeas halófilicas (*Haloarcula*, *Halogranum* o *Haloterrigena* y *Haloferax*), siendo todas halófilas extremas.
12. Se observó la formación de biopelículas o biofilms producidas por arqueas halófilas extremas en tripas bovinas saladas, resultados que no han sido encontrados en la bibliografía consultada, ya sea para tripas saladas u otro tipo de alimentos. Las biopelículas alteran la estructura tisular a nivel de la capa muscular conforme avanza la invasión de las arqueas. Así, las tripas alteradas, que se descartan, presentan la pared desgarrada, con separación de tejidos. No obstante, es importante destacar que el biofilm también está presente en las tripas alteradas que luego se “recuperan”. De modo que, si bien a simple vista, luego del proceso de recuperación, su aspecto es normal, su histología muestra lo contrario. Por tanto, serán elementos de contaminación al agregarse a otras tarrinas con el producto.
13. De esta forma, cuando las alteraciones en color, olor, y textura en las tripas saladas no son identificadas a tiempo se produce un deterioro irreparable que

implica una pérdida económica que no es particularmente considerada por la industria en general.

## **VI.2. REFLEXIONES**

Es, de algún modo, paradójico que el mismo método de conservación elegido, que permite preservar el producto, sea el que introduzca los microorganismos responsables del deterioro; microorganismos que, por otra parte, escapan al análisis de peligros del HACCP, no siendo mencionados en ninguno de los establecimientos estudiados. Al respecto, es válido preguntarse si se trata de un posible error en el análisis de peligros o, simplemente, no deben ser considerados pues no se trata de microorganismos patógenos para la salud humana.

## **VI.3. RECOMENDACIONES**

Es posible afirmar que la industria procesadora de tripas naturales es una de las grandes damnificadas por la aparición de arqueas halófilas extremas. En este sentido, se trata de un problema subestimado a nivel industrial; tal vez, porque no se llevan registros de las tripas eliminadas por el deterioro provocado por estos microorganismos, y tampoco se registra la cantidad de madejas recuperadas. *Por lo tanto, se*

*recomienda realizar registros periódicos para cuantificar el problema.*

Con relación a las madejas recuperadas, las mismas son sometidas a un reproceso que implica lavado, salado, escurrido y vuelta a envasar. Además de los insumos, el tiempo y el costo de mano de obra que dichos procesos conllevan, se plantea una gran interrogante sobre su efectividad. Asimismo, los estudios histológicos confirman la formación del biofilm sobre la superficie de la tripa y la penetración de las arqueas al interior de los tejidos; de esta forma, la eficiencia del reproceso es relativa. Tampoco se realiza un seguimiento cuando se reenvasan las tripas reprocessadas. *En este sentido, se recomienda como una buena práctica no reprocessar la tripa ya que el problema, según se describe, está instalado en los tejidos a través del biofilm. Si, de todas formas, la empresa decide reprocessar el producto, se aconseja envasarlo en la misma tarrina donde surgió el problema, es decir, con las mismas madejas que compartían y no presentaron alteraciones, realizando un seguimiento semanal para observar su evolución.*

En el contexto descrito por la presente investigación, *las medidas para evitar la contaminación con bacterias halófilas en la sal deben extremarse*, dada la capacidad de unos pocos microorganismos de generar una nueva colonia al disolverse la sal. Si aún así, durante el método de obtención de sal se

contaminan, sería preciso buscar formas de eliminar estos microorganismos. Hasta el momento, algunas de las soluciones planteadas se relacionan con la esterilización de la sal que permita eliminar los microorganismos halófilos. Se trata de un proceso que no es exigido por las normas del *Codex Alimentarius* y es necesario investigar dado que, por otra parte, hay arqueas halófilas extremas termófilas.

En el caso de que la sal no sea previamente esterilizada, se deberían explorar otras posibilidades, como las planteadas por Birbir *et al.* (2015, 2015b), mediante el uso de corrientes eléctricas para esterilizar las salmueras. Esta metodología es económica, rápida y permite la completa erradicación de las arqueobacterias halófilas extremas (proteolíticas y lipolíticas). Se utiliza corriente alterna con una baja diferencia de potencial de entre 5 y 7 V y una cantidad de corriente de 2A que es aplicada a la salmuera mediante dos electrodos de platino. Según este autor, luego de un minuto de aplicar corriente, la población de halófilas baja de  $10^3$ - $10^4$  UFC/mL a cero. El método fue aplicado exitosamente en la industria del cuero. En la industria de tripas naturales este método podría implementarse de forma sencilla y a bajo costo, luego de un corto período de experimentación. Adicionalmente, tendría la ventaja de que se podría usar sal de cualquier origen, ya que la esterilización eléctrica permitiría eliminar cualquier contaminación con halófilas.

De no adoptarse las medidas antes sugeridas, *la industria debería adoptar medidas preventivas*, como revisar periódicamente la producción, siendo de fácil observación, pues el problema investigado comienza en la sal y salmuera en la superficie y, a medida que avanza, deteriora las tripas depositadas en la tarrina comenzando con las madejas que se encuentran en la superficie. De este modo, una inspección de las tarrinas almacenadas, con relativa periodicidad, puede evitar el avance de un deterioro que aumenta a medida que se incrementa el lapso transcurrido entre la fecha de producción y el almacenamiento del producto.

Por último, en función de las investigaciones realizadas en otros alimentos contaminados por arqueas halófilas extremas, sería interesante plantear el *análisis de presencia de histamina* en tripas bovinas saladas con las alteraciones aquí descritas. La histamina es una de las aminas biógeas que se puede encontrar en alimentos y actuar sobre los sistemas respiratorio, cardiovascular, gastrointestinal, hemato-inmunológico y piel, y puede encontrarse en productos pesqueros, pero también en queso, vegetales, productos cárnicos y bebidas alcohólicas, entre otros (Paredi & Yeannes, 1987; Yeannes *et al.*, 2011). En caso de observarse resultados positivos, habría que replantear el hecho de incluir a los microorganismos halófilos dentro del análisis de peligros del HACCP.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amo V.A. (1980). Materias primas usadas en la salazón. En su: *Industria de la carne. Salazones y chacineras* (pp. 49-66). Barcelona: Aedos.
- Adams, M.R & Moss M. (1995). Food Microbiology. London: The Royal Society of Chemistry Publishing.
- APHA. (1992). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association.
- APHA. (2001). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association.
- Bakker, W.A.M., Houben, J.H., Koolmees, P.A., Bindrich, U. & Sprehe, L. (1999). Effect of initial mild curing, with additives, of hog and sheep sausage casings on their microbial quality and mechanical properties after storage at difference temperatures. *Meat Science*, 51, 163-174.
- Barbosa, C.G.V., Pothakamury, U.R., Palou, E. & Swanson, B.G. (1998). Conservación no térmica de alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Benezet, A., Botas, M., Olmo, N., Pedregal, P. & Flórez, P. (2001). Coloración anormal de un embutido por causas microbiológicas. *Alimentaria*, 45-47.
- Bergey's. (2001) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 1). Springer Science: New York.
- Bertacchi, M. (2000). Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control en un

- Establecimiento Procesador de Tripas Bovinas. En: P. Fito, A. Chiralt, A. Andrés & N. Martínez Navarrete (Orgs.). *Investigación del postgrado del IAD-DTA*. (pp. 215-231). Valencia: Universidad Politécnica de Valencia Ediciones.
- Birbir Y., Anik S., Birbir M. & Caglayan P. (2015). Annihilation of extremely halophilic archae in hide preservation salt using alternating electric current. *Johnson Matthey Technol. Rev.*, 59(2), 109-119.
- Birbir Y., Anik S., Birbir M. & Caglayan P. (2015b). Application of alternating electric current in leather industry to kill extremely halophilic archae found in brine solutions. *Journal of automation and control engineering*, 3(4), 343-346.
- Birbir M. & Bailey D.G. (2001). Controlling the grown of extremely halophilic bacteria on brine-cured cattle hides. *J Soc Leather Technologists Chem*, 84(5), 201-204.
- Birbir M., Kallenberger W., Ilgaz A. & Bailey D.G. (1996). Halophilic bacteria isolated from brine-cured cattle hides. *J Soc Leather Technologists Chem*, 80, 87-90.
- Board, R.G. (1988). Inhibición del crecimiento microbiano. En su: *Introducción a la microbiología moderna de los alimentos* (pp. 41-44). Zaragoza: Editorial Acribia.
- Brown, H.J. & Gibbons, N.E. (1955). The Effect of Magnesium, Potassium and Iron on the growth and morphology of red halophilic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 1, 486-494.
- Canales, P.E., Chávez, E.L. & Zavaleta, A.I. (2014). Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2, 150 -157.

- Carter, G.R. (1969). Procedimientos de Diagnóstico en Bacteriología y Micología Veterinarias. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Castell González, S.E. (2010). Análisis de las comunidades microbianas asociadas a tapetes hipersalinos de la laguna rosada de Uaymitun, Yucatán, México. Tesis de Maestría. Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, México.
- Castillo, L. & Barragán, B.E. (2011). Aplicaciones Biotecnológicas de Microorganismos Halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, 4(2), 45-54.
- Castro, L.E., Ithurralde, J.J. & Sparano, D. (1981). Tripas Bovinas. INAC: Montevideo, Uruguay.
- Castro Piña L., Flores Gallegos A.C., Rodríguez Vidal A., Aguilar González M.A., Aguilar González N.A. & Rodríguez Herrera R. (2011). Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de cuatro Ciénegas Coahuila, México. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(5), 33-43.
- Coretti, K. (1986) *Embutidos: Elaboración y Defectos*. Alzey: Verlag der Rheinheissischen Druckwerkstatte.
- Cui, H.L., Gao, X., Sun, F.F., Dong, Y., Xu, X.W., Zhou, Y.G., Liu, H.C., Oren, A., & Zhou, P.J. (2010). *Halogramum rubrum* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a marine solar saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1366–1371.
- Cui, H.L., Yang X., Gao X. & Xu X.W. (2011). *Halogramum gelatinilyticum* sp. nov. and *Halogramum amylolyticum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern, and

emended description of the genus *Halogramum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 61, 911-915.

Czerner, M. (2011). *Aspectos Tecnológicos de la Maduración de Anchoita (Engraulis anchoita) Salada. Efecto de la Composición Química y Otras Variables Tecnológicas*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Czerner, M. & Yeannes, M.I. (2014). Bacterial Contribution to Salted Anchovy (*Engraulis anchoita* Hubbs & Marinni, 1935) Ripening Process. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 23, 102–114.

Das Sarma, S. & Arora, P. (2001). *Encyclopedia of Life Sciences* (pp.1-9). Natural Publishing Group.

Davis, B.D., Duldecco, R., Eisen, H.N. & Ginsberg H.S. (1995). *Tratado de Microbiología*. Barcelona: Editorial Salvat.

Delfino, V.A. (1989). *Tecnología de la Industria Frigorífica Cárnica*. Buenos Aires: Publitex Ediciones.

Doolittle, W.F. (1997). What are the archaeobacteria and why are they important? *Biochem. Soc. Symp.*, 58, 1-6.

Duran, F., Cuellar, N., Alba, C. *et al.* (2008). *Ciencia, Tecnología e Industria de Alimentos*. Colombia. Editorial: Grupo Latino Editores.

Dyce, K.M., Sack, W.O. & Weising, C.J.G. (2007). *Tratado de anatomía veterinaria*. Río de Janeiro: Elsevier.

Fehlhaber, K. & Janetschke, P. (1995). Comportamiento de los microorganismos bajo los factores de influencia de los alimentos. En su: *Higiene veterinaria de los alimentos* (pp. 25-26). Zaragoza: Editorial Acribia.

- Félix, M.M., Ramírez, E. & Yeannes, M.I. (2006). Bacterias halófilas extremas deteriorantes en anchoíta salada. *Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos*, 24, 2-6.
- Félix, M., Ramírez, E. & Yeannes M.I.. (2007). Bacterias halofilas extremas deteriorantes en anchoíta salada. *Trabajo de Investigación*. Mar del Plata: Departamento de Química, Argentina.
- Flores M.L., Zavaleta A.I., Zambrano Y., Cervantes L. & Izaguirre V. (2010). Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. *Ciencia e Investigación*, 13(1), 42-46.
- Forrest, J.C., Aberle, E.D., Hedrick, H.B., Judge, M.D. & Merkel R.A. (1975) *Principles of Meat Science*. San Francisco: Freeman and Company.
- Frazier, W.C. & Westhoff, D.C. (1993). *Microbiología moderna de los alimentos*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Girard, J.P. (1991). *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Hartmann, R., Hans-Dieter, S. & Oesterhelt C. (1980). *Anaerobic growth of halobacteria*. *Proc. Nastl. Acad. Set. USA*, 77(6), 3821-3825.
- Hughes, C.C. (1994). *Guía de Aditivos*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Humphries, D.W. (1994). *Methoden der Dünnschliffherstellung*. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 86 S.
- Huss, H.H. (1997). *Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros*. FAO Documento Técnico de Pesca 334, Roma, FAO, pp. 16-73.

- [ICMSF] (1980a). International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Association of Microbiological Societies. *Ecología Microbiana de los Alimentos. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos*. Orlando: Academic Press.
- [ICMSF] (1980b). International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Association of Microbiological Societies. *Ecología Microbiana de los Alimentos. Productos alimenticios*. New York: Academic Press.
- [ICMSF] (1985). International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Association of Microbiological Societies. *Ecología Microbiana de los Alimentos. Vol. 2. Productos alimenticios*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- [ICMSF] (1996). International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Association of Microbiological Societies. *Microorganismos de los Alimentos 5. Características de los Patógenos Microbianos*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- [ICMSF] (1998). International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Association of Microbiological Societies. *Microorganismos de los Alimentos 6. Ecología Microbiana de los Productos Alimentarios*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- [ICMSF] (2011). International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Association of Microbiological Societies. *Microorganisms in Foods 8. Microbial Ecology of Food Commodities*. New York: Springer.
- Incerti, C. & Ramos Cormenzana, A. (1996) Aislamiento de microorganismos halófilos procedentes de ríos,

- pantanos y aguas residuales de la provincia de Granada. *Ars Pharm*, 37(2), 253-60. +Cormenzana 143
- Jay, J.M., Loessner, M.J. & Golden, D.A. (2005). *Microbiología moderna de los alimentos*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Jouve, J.L. (1996). *La Qualité Microbiologique des Aliments. Maîtrise et critères*. París: Polytechnica Editorial.
- Jungk, R.A. (1972). What you should know about curing ingredients?. *Western Meat Industry*, 11-21.
- Kamekura, M. & Kates, M. (1988). Lipids of Halophilic Archaeobacteria. *Halophilic Bacteria*, 2, 25-54.
- Kamekura, M. (1998). Diversity of extremely halophilic bacteria. En su: *Extremophiles* (pp.289-295). Berlin: Springer Verlag.
- Kamekura, M. & Kates, M. (1999). Structural Diversity of Membrane Lipids in Members of Halobacteriaceae. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 63, 969-972.
- Karmas, E. (1974). *Sausage Casing Technology*. Food Tecnology Review (USA), N° 14. London: Noyes Data Corporation.
- Kim K.K., Lee K.C. & J.S. Lee J.S. (2011). *Halogramum salarium* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from sea salt. *Syst. Appl. Microbiol*, 34, 576-580.
- Kim, K.K., Lee, K.C. & Lee, J.S. (2012). Draft genome sequence of the extremely halophilic archaeon *Halogramum salarium* B-1<sup>T</sup>. *J. Bacteriol*, 194, 6659.
- Kis Papo, T & Oren, A. (2000). Halocins: are they involved in the competition between halobacteria in saltern ponds?. *Extremophiles*, 41, 35-40.

- Kondaiah, N., Panda, B. & Chatierjee, A. K. (1979). Some aspects of the manufacturing techniques for sausage casings. *Indian Food Packer*, 36-39.
- Kushner, D.J. & Kamekura, M. (1988). Physiology of Halophilic Eubacteria. En su: *Halophilic Bacteria* (pp. 109-138). Florida: CRC Press.
- Kushwaha, S.C., Juez Pérez, G., Rodríguez Valera, F., Kates, M. & Kushner, D.J. (1982). Survey of lipids of a new group of extremely halophilic bacteria from salt ponds in Spain. *Canadian Journal of Microbiology*, 28, 1365-1371.
- Lasa Uzcudun I. (2004). Biofilms bacterianos. *Actualidad SEM* 37, 14-18.
- Lopes Barbosa, R. (1973). *Perfil Analítico do Sal*. Ministério das Minas e Energia, Departamento Nacional da Producao Mineral. Río de Janeiro. Boletín N° 21, 1-11.
- Madhwaraj, S., Nair K.K.S, Kadkol, S.B. & Baliga, B.R. (1980). Preservation of Salted Casings. *Journal of Food Science and Technology*, 17, 273-275.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, D.P. (2009). *Brock Biología de los Microorganismos*. Madrid: Pearson Education.
- Mata Gómez, J.A. (2006). Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salpiger*. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. Granada, España.

- Mc. Faddin, J.F. (1993). Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Tijuana, México: Editorial Médica Panamericana.
- Montoya L. & Ramírez Jiménez S.I. (2013). Vida microscópica en mundos salados. *Ciencia y Desarrollo*. Disponible en: <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/264/articulos/vidas-microscopicas-mundos-salados.html>.
- Montville, T.J. & Matthews, K.R. (2009). Microbiología de los alimentos. Introducción. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Mossel, D.A.A., Moreno, B. & Struijk, C.B. (2006). *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Müller, G. (1988). Salzgesteine (Evaporite). En: H. Füchtbauer (Ed.), *Sedimente und Sedimentgesteine* (pp. 435-500). Schweizerbart: Stuttgart.
- Müller, S.G. & Ardoino, M.A. (1983). Procesamiento de Carnes y Embutidos. Elaboración, Estandarización, Control de Calidad. Proyecto Gestión de Calidad en Fábricas de Embutidos. OEA (Organización de Estados Americanos)- GTZ (Agencia Alemana para el Desarrollo).
- Norton, C.F., Mc Genity, T.R. & Grant, W.D. (1993). Archaeal halophiles (halobacteria) from two British salt mines. *Journal of General Microbiology*, 139, 1077-1081.
- Oren, A., Ventosa, A. & Grant, W.D. (1997). Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order Halobacteriales. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(1), 233-238.
- Oren, A., Ventosa, A., Gutiérrez, M.C. & Kamekura, M. (1999). Haloarcula quadrata sp. Nov., a square, motile archaeon isolated from a brine pool in Sinai (Egypt). *International Journal of Systematic Microbiology*, 49, 1149-1155.

- Oren, A. & Litchfield, C.D. (1999). A Procedure for the enrichment and isolation of Halobacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 173, 353-358.
- Oren, A. & Rodríguez Valera, F. (2001). The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiology Letters*, 36, 123-130.
- Oren, A. (2000). *Biological processes in the Dead Sea as influenced by short-term and long-term salinity changes*. *Arch. Hidrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol* 55, 531 - 542.
- Ordoñez, J.A, Cambero, M.I., Fernández, L. et al. (1999). Tecnología de los Alimentos Volúmen I *Componentes de los alimentos y Procesos*. Madrid: Editorial Síntesis.
- Prandl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T. & Sinell H. (1994). *Tecnología de Higiene de la carne*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Paredi, M.E. & Yeannes, M.I. (1987). Histamina en productos pesqueros. *Revista de Ciencias Agrarias*, 3(1-2).
- Pauling, C. (1982). Bacteriophages of Halobacterium halobium: isolation from fermented fish sauce and primary characterization. *Canadian Journal of Microbiology*, 28, 916-921.
- Pellegrini, E.A., Silvestre, A.A. & Ochoa, D.L. (1986). Inspección y control de productos zoogenos. En su: *Carnes y Derivados* (pp. 436-443). Argentina: Hemisferio Sur.
- Piñar G., Laiz L., Lubitz W. & Saiz Jiménez C. (2002). "Estudio comparativo de comunidades bacterianas en monumentos mediante técnicas moleculares y

- microbilógicas” En: Biodeterioro de Monumentos de Iberoamérica. Madrid: España Editorial.
- Porcelli, M.C. (1985). Distintos tipos de tripas usadas en la elaboración de embutidos. *Noticiteca*, 15(87), 21-29.
- Price J.F. & Schweigert B.F. (1994). Ciencia de la Carne y de los productos cárnicos. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Priest, F.G. (1994). Taxonomy and phylogeny of moderately halophilic bacteria. En su: *Bacterial Diversity and Systematics*. (pp. 231-239). New York: Plenum Press.
- Prince, J.F. & Bernard, S.S. (1994). *The Science of Meat and Meat Products*. Connecticut: Food & Nutrition Press.
- Quesada, E., Bejar, V. & Calvo, C. (1993). Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia*, 49(12), 1037-1041.
- Ramírez, N., Sandoval, A.H. & Serrano J.A. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, Vol. 24(1-2), 12-23.
- Ramírez N., Serrano J.A. & Sandoval H.T. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37(3), 56-71.
- Ripoll, A. (1992). *Salado de pescado*. Informe técnico nº44. Montevideo: Instituto Nacional de Pesca (INAPE).
- Rodríguez Valera F., Ruiz Berraquero, F. & Ramos Cormenzana, A. (1980). Behaviour of mixed populations of halophilic bacteria in continuous cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, 26(11), 1259-1262.

- Rodríguez Valera F., Ruiz Berraquero F. & Ramos Cormenzana, A. (1980b). Isolation of Extremely Halophilic Bacteria Able to Grow in Defined Inorganic Media with Single Carbon Sources. *Journal of General Microbiology*, 119, 535-538.
- Rodríguez Valera, F. (1992). Biotechnological potential of halobacteria. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 58, 135-147.
- Salvat. (1974). *Diccionario Médico*. Mallorca, Barcelona: Salvat Editores.
- Sanz, C. (1967). *Enciclopedia de la Carne*. Madrid: Espasa & Calpe Editores.
- Savic, Z. & Savic, I. (2002). Historia de la Industria de la Carne y Embutido. Disponible en: <http://www.eurocasing.com.ar/eurocasing/public/files/upload/Historia.pdf>
- Sinell, H.J. (1981). *Introducción a la Higiene de los Alimentos*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Sisson, S. & Grossman, J.D. (1982). *Anatomía de los animales domésticos*. Barcelona: Salvat Editores.
- Sousa, C.P. & Souza, C.W.O. (1997). Microorganismos de Ambientes Extremos e sua Potencial Aplicacao a Biotecnologia. *Boletín Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(2), 148-164.
- Sperber, W.H. (1983). Influence of Water Activity on Foodborne Bacteria - A Review. *Journal of Food Protection*, 46(2), 142-150.
- Tehei, M. & Zaccai, G. (2005). Adaptation to extreme environments: Macromolecular dynamics in complex systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1724, 404-410.

- Torreblanca, M., Rodríguez Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M. & Kates, M. (1986). Classification of Non-alkaliphilic Halobacteria Based on Numerical Taxonomy and Polar Lipid Composition, and Description of Haloarcula gen. nov. Haloferax gen. nov. *Journal of Systematic and Applied Microbiology*, 8, 89-99.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. & Case, C.L. (2010). *Microbiology: An Introduction*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Trindade de Oliveira, L. A. (1982). Análise microbiológica de sal empregado na elaboração do charque. *Higiene Alimentar*, 1(2), 104-110.
- Varnam, A.H., Arnam, A.H. & Sutherland, J.P. (1995). *Carne y Productos Cárnicos. Tecnología, Química y Microbiología. (Alimentos Básicos Serie 3)*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Venkatesh, M.G. (1982). Guidelines for the Establishment of Solar Salt facilities from Seawater, Underground Brines and Salted Lakes. UNIDO (United Nations Industrial Development Organization), IS.330, pp. 2-26.
- Ventosa, A. (1994). *Taxonomía y filogenia de bacterias halófilas moderadas*. Bacterial Diversity and Systematic. New York. Plenum Press New York. 231- 242.
- Ventosa, A. (1989). *Taxonomía y ecología de las bacterias halófilas*. Ponencia presentada en el XII Congreso Nacional de la Asociación Española de Microbiología, Pamplona, España.
- Ventosa, A. & Nieto, J.J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, 85-94.

- Ventosa, A., Rodríguez Valera, F., Poindexter, J.S. & Reznikoff, W.S. (1984). Selection for moderately halophilic bacteria by gradual salinity increases. *Canadian Journal of Microbiology*, 30, 1279-1282.
- Warriss, P.D. (2003). *Ciencia de la Carne*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Wijnker, J.J. (2013). *Guía de la comunidad de correctas prácticas de higiene y la aplicación de los principios APPCC en la producción de tripa natural*. European Natural Sausage Casings Association Versión III (ENSCA).
- Wijnker, J.J. (2009). *Aspects of quality assurance in processing natural sausage casings*. PhD thesis Utrecht University. Faculty of Veterinary. Utrecht: Utrecht University, Medicine, the Netherlands.
- Wijnker, J.J., Koop, G. & Lipman, L.J.A. (2006). Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiology*, 23, 657-662.
- Yeannes, M.I., Ameztoy, I.M., Ramírez, E.E. & Félix, M.M. (2011). Culture alternative medium for the growth of extreme halophilic bacteria in fish products. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(3), 561-566.