



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FÍSICA FUNDAMENTAL

**Aplicación de las radiaciones ionizantes a la preservación de alimentos:
efectos de la irradiación gamma y de electrones en los parámetros
físico-químicos de la castaña**

TESIS DOCTORAL

Resumen en Castellano

(Reglamento doctorado de 18 julio 2013)

Amílcar Manuel Lopes António

Dirigida por:

Dra. Begoña Quintana Arnés

Salamanca, 2014

DÑA BEGOÑA QUINTANA ARNÉS, PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD
DEL DEPARTAMENTO DE FÍSICA FUNDAMENTAL DE LA UNIVERSIDADE
DE SALAMANCA,

Autoriza la presentación de la tesis doctoral titulada “Ionizing radiation applications for food preservation: effects of gamma and e-beam irradiation on physical and chemical parameters of chestnut fruits”.

En Salamanca, a 27 de octubre de 2014

Fdo. Begoña Quintana Arnés

*Aos meus pais, irmãos e irmã:
que me ensinaram o que sou e
me apoiaram incondicionalmente.*

Resumen

La castaña es un fruto típico en el sur de Europa, en las zonas montañosas de los países mediterráneos y en Asia. En los países mediterráneos de la UE representa un mercado de más de cien mil toneladas, con un ingreso de varios millones de euros sólo a nivel de producción, valor que va aumentando a lo largo de la cadena de comercialización.

Las castañas pueden ser infestadas por larvas de diferentes especies lo que causa pérdidas de ingresos para los productores y para la industria alimentaria. Las castañas exportadas deben ser tratadas posteriormente a la cosecha para eliminar los insectos y gusanos, de manera que se cumpla con las regulaciones fitosanitarias del comercio internacional. Hasta hace poco, en la desinsectación de castañas postcosecha se utilizaba un insecticida químico, el bromuro de metilo, que ha sido prohibido en la UE desde marzo de 2010 debido a su toxicidad para los operadores y para el medio ambiente. Esta decisión dejó muy pocas alternativas a la agroindustria que procesa y exporta esta fruta.

En este contexto, la eliminación de insectos en las castañas por irradiación puede ser una alternativa viable, considerando que es una tecnología respetuosa con el medio ambiente y que podría ser utilizada si el producto tratado cumple con los otros parámetros de calidad específicos para este tipo de alimentos.

Aunque la irradiación de alimentos es ya una tecnología industrial utilizada en la preservación de varios productos alimenticios, su efecto en cada matriz debe ser estudiada y validada. Cualquier transformación de los alimentos deja marcas en el producto, pero en la mayor parte de los casos constituye un requisito para comer alimentos sanos. La irradiación de alimentos puede preservar algunos componentes y degradar otros. El balance de ventajas y desventajas, en comparación con otros procesos de conservación, se debe utilizar para seleccionar o no este tipo de tecnología de procesamiento, de manera que se proporcione al consumidor un producto que cumpla con los mejores criterios de calidad.

Estudios previos de los efectos en irradiación de castañas se realizaron principalmente en las variedades asiáticas, que tienen características organolépticas distintas a las europeas, abarcando un número limitado de parámetros. En esta investigación se presenta un estudio detallado de los efectos de la radiación gamma y de electrones a dosis de 0,25, 0,50, 1, 3 y 6 kGy en las propiedades físicas (deshidratación, color, textura) y químicas (valor nutricional, cenizas, proteínas, hidratos de carbono,

azúcares, grasa, ácidos orgánicos, tocoferoles, triacilgliceroles y energía total) en castañas de origen europea (*Castanea sativa* Mill.) de distintas variedades Cota, Judia y Longal de Portugal y dos variedades de Turquía y de Italia), tras ser almacenadas durante 60 días.

Con este estudio fue posible obtener resultados de los efectos de dos tecnologías de procesamiento por irradiación y de su viabilidad. Los parámetros físico-químicos de muestras de castañas irradiadas con radiación gamma y con electrones se compararon con muestras no irradiadas, estudiando también el efecto del tiempo del almacenamiento. Las principales diferencias encontradas en muestras irradiadas están relacionadas con el tiempo de almacenamiento o con las variedades. Sin excepción, el tiempo de almacenamiento ha causado cambios mayores en estos parámetros que ambos tipos de radiación, lo que confirma que esta tecnología, a las dosis aplicadas, no afecta la alta calidad de las castañas.

Se han detectado únicamente cambios cualitativos, reordenación de la estructura de las moléculas de ácidos grasos sin afectar a su contenido total ni a sus propiedades nutricionales. Además, por primera vez, fueron identificadas como indicadores del procesamiento por irradiación, lo cual supone una alternativa a los indicadores recomendados en las normas europeas para detección de alimentos irradiados.

Los dos tipos de radiación utilizados, gamma y electrones, parecen así constituir soluciones adecuadas, independientemente de las variedades de castañas y origen geográfico, lo que es un paso importante hacia la validación de estas tecnologías en el tratamiento postcosecha en castañas.

Este trabajo ha tocado diferentes áreas de investigación con el objetivo centrado en proponer una solución tecnológica a un problema planteado por la agro-industria, trayendo innovación a un producto alimenticio tradicional en algunas regiones de Europa. Así, se incluyó también en los apéndices un breve análisis de la viabilidad económica de la irradiación; en concreto del impacto del procesamiento con electrones en el precio de las castañas, teniendo en cuenta que para los consumidores esta tecnología podría tener más aceptación que la irradiación gamma.

En resumen, se ha hecho un estudio detallado de los efectos de la radiación gamma y de electrones en los parámetros físico-químicos de castañas europeas, proponiendo una tecnología alternativa que es respetuosa con el medio ambiente y que puede tener un impacto favorable en la economía de los productores de castañas europeas, garantizando al consumidor un alimento seguro.

Índice

Resumen	i
Figuras	v
Tablas	v
1. Radiaciones ionizantes en la preservación de alimentos	1
1.1. Irradiación gamma	2
1.2. Irradiación con electrones	4
1.3. Irradiación gamma <i>versus</i> electrones	6
2.1. Dosimetría	9
2.2. Sistemas dosimétricos	10
2.3. Aspectos de legislación y preocupaciones de los consumidores	15
2.3.1. Etiquetado	16
2.3.2. Aceptación por los consumidores	16
3. Irradiación de castañas	19
3.1. Antecedentes – estado de arte	20
3.2. Motivación	22
3.3. Objetivos	23
4. Metodología	25
4.1. Muestras	25
4.2. Irradiación	25
4.3. Parámetros físicos: color, textura y deshidratación	28
4.4. Actividad antioxidante	28
4.4.1. Actividad de eliminación de radicales DPPH	30
4.4.2. Poder reductor	31
4.4.3. Inhibición de la decoloración del β -caroteno	31
4.4.4. Ensayo TBARS	32
4.5. Fenoles y flavonoides totales	33
4.5.1. Fenoles	33
4.5.2. Flavonoides	33
4.6. Parámetros nutricionales	34
4.6.1. Proteínas	34
4.6.2. Grasas	34
4.6.3. Cenizas	34
4.6.4. Carbohidratos	34

4.6.5. Energía total.....	35
4.6.6. Azúcares	35
4.6.7. Ácidos grasos.....	35
4.6.8. Vitaminas.....	35
4.6.9. Ácidos orgánicos	36
4.6.10. Triglicéridos.....	37
4.7. Herramientas estadísticas y análisis de datos	38
5. Resultados.....	41
5.1. Efectos en los parámetros físicos	43
5.2. Efectos en los parámetros químicos y bioactivos.....	44
5.3. Efectos en los parámetros bioactivos	44
5.3.1. Actividad antioxidante.....	44
5.3.2. Fenoles y flavonoides totales.....	46
5.4. Efectos en los parámetros nutricionales	46
5.4.1. Azúcares	46
5.4.2. Grasas	47
5.4.3. Ácidos orgánicos	48
5.4.4. Proteínas	49
5.4.5. Vitaminas.....	50
5.4.6. Energía total.....	51
5.4.8. Triglicéridos.....	52
5.4.9. Minerales	55
6. Tablas resumen	57
7. Conclusiones.....	61
Referencias	65

Figuras

Fig. 1. Irradiador gamma (A) y sistema de transporte de cajas (B).....	3
Fig. 2. Cámara de irradiación gamma (A) y sistema de control de las fuentes (B).....	4
Fig. 3. Irradiación con electrones (A), castañas (B) y transportador (C).	5
Fig. 4. Dosímetros utilizados.....	11
Fig. 5. Cámara de ionización y electrómetro.....	11
Fig. 6. Preparación del dosímetro de Fricke.....	12
Fig. 7. Espectro de soluciones irradiadas y dosis vs. absorbancia en distintas posiciones.	12
Fig.8. Lectura de dosímetros Amber.....	13
Fig. 9. Dosimetria con la cámara de ionización.	14
Fig. 10. Dosimetria con Amber.....	14
Fig. 11. Tasa de dosis en la caja de irradiación.....	14
Fig. 12. Irradiación de castañas, dosímetros y posición de las fuentes de ⁶⁰ Co.	15
Fig. 13. Símbolo <i>Radura</i> y castañas irradiadas.	16
Fig. 14. <i>Castanea sativa</i> Mill. (variedades “Judia” y “Longal”).....	20
Fig. 15. Castañas con gusanos, hongos e insectos irradiados.....	20
Fig. 16. Irradiación gamma.	26
Fig. 17. Irradiación con electrones.	26
Fig.18. Calorímetro con las muestras y medición de temperatura.	27
Fig. 19. Colorímetro (A), texturometro (B), estufa (C).....	28
Fig. 20. Caracterización y preparación de muestras para análisis.....	28
Fig. 21. Extracción (A), filtración (B) y evaporación de solventes (C).	29
Fig. 22. Lector de microplacas y reacción de los extractos con el DPPH.....	30
Fig.23. Captación de radicales por el DPPH.....	30
Fig. 24. Ensayo de ferricianuro/azul de Prusia.....	31
Fig. 25. Metodo de la decoloración del β-caroteno.....	32
Fig. 26. Ensayo de TBARS.....	32
Fig. 27. Ensayo de fenoles (A) y flavonoides (B).....	33
Fig. 28. Columnas de extracción.....	34
Fig. 29. Aparatos de cromatografía utilizados en el trabajo.....	36
Fig.30. Cromatograma para identificación de sustancias.....	37
Fig.31. Variación en la textura de las castañas con la dosis de radiación gamma.	43
Fig.32. Efecto relativo de la irradiación en distintos parámetros.	45
Fig. 33. Estructura molecular de fenoles (A) y de flavonas (polifenoles) (B).	46
Fig. 34. Estructura de los ácidos grasos insaturados y posiciones más radiosensibles.	47
Fig. 35. Algunos ácidos grasos presentes en las castañas.	48
Fig. 36. Estructura de algunos ácidos orgánicos detectados en las castañas.....	49
Fig. 37. Posiciones más radiosensibles en un polipéptido.....	50
Fig. 38. Degradación por radiación del ácido ascórbico en ácido dehidroascórbico.	50
Fig. 39. Estructura molecular de los tocoferoles.....	51
Fig. 40. Degradación de triacilgliceroles con la radiación.....	53
Fig. 41. Análisis discriminante lineal de triacilgliceroles en castañas irradiadas.....	54

Tablas

Tab. 1. Composición media aproximada de la <i>Castanea sativa</i> Mill.....	42
Tab. 2. Métodos validados en identificación de castañas irradiadas.....	53
Tab. 3. Castañas irradiadas (especie, origen y dosis).....	58
Tab. 4. Parámetros físico-químicos, nutricionales y actividad antioxidante.....	59

1. Radiaciones ionizantes en la preservación de alimentos

El uso de la radiación ionizante para conservar los alimentos comenzó inmediatamente después del descubrimiento de este tipo de radiación. El descubrimiento de los rayos X ha ocurrido en 1895 y en 1896 H. Minsch, en Alemania, propuso el uso de este tipo de radiación para destruir microorganismos. La primera patente para la conservación de alimentos fue reclamada en 1905 por H. Lieber en EE.UU. y J. Appleby & A.J. Banks en el Reino Unido (Molins, 2001). En 1930, una patente para el uso de las radiaciones ionizantes en la conservación de alimentos fue atribuida en Francia a O. Wüst (IAEA, 2011). En 1898, J.J. Thompson descubrió el electrón y en el mismo año Pacronotti y Procelli han referido sus efectos en los microorganismos (Molins, 2001).

Debido a limitaciones técnicas, el uso de las radiaciones descubiertas no pasó inmediatamente a una fase comercial y sólo cincuenta años más tarde comenzó a escala industrial, impulsada primero por los gobiernos de EE.UU., Reino Unido, Alemania y la exURSS (Molins, 2001; Diehl, 2002).

Recientemente, la irradiación de alimentos ha tenido un incremento impuesto por las barreras comerciales fitosanitarias, para eliminar la presencia de insectos, y debido a accidentes de salud con los alimentos contaminados, por ejemplo con *Salmonella* o *Listeria*, exigiendo nuevos enfoques para garantizar la seguridad alimentaria sin comprometer la calidad del producto (Cabo Verde *et al.*, 2010; Antonio *et al.*, 2011a; Antonio *et al.*, 2013b).

La conservación de alimentos es un objetivo permanente, debido al crecimiento continuo de la población, la escasez de suelo y a los aspectos de seguridad alimentaria. Actualmente, se utilizan diferentes tecnologías de procesamiento para conservar los alimentos. El procesamiento por irradiación de alimentos, basado en el uso de radiación ionizante, se utiliza para extender la vida útil, retrasar el proceso de maduración, para descontaminar mediante la reducción de la presencia de bacterias y hongos o, a dosis más elevadas, para esterilizar productos alimenticios eliminando todos los microorganismos (Cabo Verde *et al.*, 2010).

El proceso de irradiación se conoce también como "pasteurización en frío", ya que no aumenta significativamente la temperatura de los productos alimenticios (Sádecká, 2007). Los componentes de los alimentos que son particularmente sensibles a los tratamientos térmicos (por ejemplo, a la esterilización con vapor), como compuestos

aromáticos en plantas medicinales o plantas comestibles, pueden ser descontaminados con esta tecnología (Sádecká, 2007; Pereira *et al.*, 2014).

La normativa europea autoriza utilizar tres tipos de radiaciones ionizantes para procesar alimentos: gamma; electrones y rayos X (E.U., 1999a). La radiación gamma proviene de la emisión espontánea de los isótopos de ^{60}Co o ^{137}Cs . La radiación de electrones (“*e-beam*”) es producida por la aceleración de electrones hasta la energía máxima permitida de 10 MeV; los rayos X son producidos por el impacto de electrones acelerados en un blanco metálico, con la consiguiente emisión de radiación de frenado (“*bremstrahlung*”) limitada a la energía máxima de 5 MeV para aplicaciones de irradiación de alimentos (E.U., 1999a).

Los tres tipos de radiaciones ionizantes tienen diferentes características, de las que depende la profundidad de penetración, pero todas se pueden utilizar para la conservación de alimentos, usando la configuración correcta adaptada al tipo o al volumen de alimentos a procesar. Los rayos X han sido la primera radiación ionizante que fue ensayada en la conservación de alimentos, sin embargo debido a la baja eficiencia de la conversión de energía de los electrones a los rayos X, sólo recientemente con el desarrollo de nuevas máquinas, esta técnica recuperó interés (Miller, 2005).

1.1. Irradiación gamma

Las primeras unidades industriales de irradiación gamma fueron construidas en EE.UU. en la década de 1960 y también en el puerto de Odessa, en la antigua Unión Soviética, ahora Ucrania, para la desinsectación de grano (Nordion, 2013).

La irradiación industrial gamma utiliza el radioisótopo cobalto-60 (^{60}Co), que tiene una vida media de 5,3 años y se desintegra mediante emisión beta y posterior desexcitación gamma en el núclido estable de níquel-60. La radiación beta es absorbida por las cápsulas metálicas que contienen al ^{60}Co emitiendo fotones con dos energías: 1,17 MeV y 1,33 MeV ($1 \text{ MeV} = 1,6 \times 10^{-13} \text{ J}$). El otro radionúclido autorizado para la irradiación gamma, cesio-137, tiene una vida media de 30,2 años y se desintegra en bario-137, emitiendo fotones de 0,66 MeV.

En una unidad industrial las fuentes gamma se almacenan en una piscina, en seco o con agua. Los productos se mueven a lo largo de una cinta que transporta automáticamente las cajas por dentro de un bunker, construido según las normas de radioprotección para garantizar la seguridad de los operadores (IAEA, 2010), donde

realizaran múltiples pases hasta alcanzar la dosis prevista. Después de que las cajas entren en el búnker, las fuentes de rayos gamma son elevadas a la zona donde se irradian los productos.

La planta industrial cuenta con varios sistemas de seguridad redundantes para asegurar que, cuando las fuentes están irradiando, nadie entre en el interior del búnker y, si esto ocurre, en el caso por ejemplo de alguna una emergencia, las fuentes caen automáticamente a la piscina. De señalar también que las fuentes de ^{60}Co nunca entran en contacto con el alimento irradiado, ya que están encapsuladas en barras de acero.

La actividad de las fuentes de radiación se mide en bequerelio, Bq , que nos da el número de desintegraciones o emisiones por segundo. La unidad tradicional para la actividad es el curio, $1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq}$. Una planta típica de irradiación industrial tiene una actividad de aproximada de 1 millón de curios (1 MCi). La tasa de dosis, la dosis por unidad de tiempo, y el rendimiento, la masa procesada por unidad de tiempo, están limitadas por la actividad de las fuentes. Los productos permanecen delante de las fuentes el tiempo necesario para suministrar la dosis prevista, que se expresa en Gray (Gy), que corresponde a julio por kilogramo.

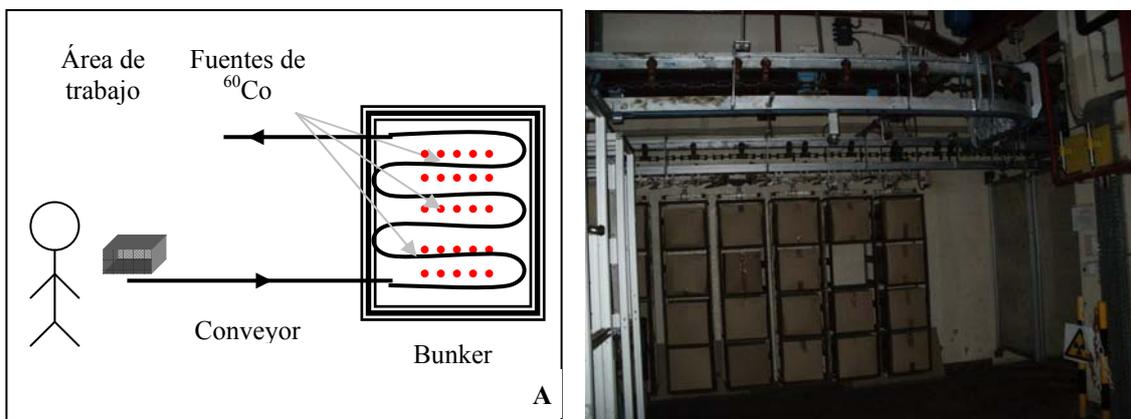


Fig. 1. Irradiador gamma (A) y sistema de transporte de cajas (B).

El rendimiento del proceso, masa por unidad de tiempo (M/t), es dada por la ecuación (Miller, 2005):

$$M/t = (P/D) \times F \quad (\text{ec. 1})$$

donde M/t se expresa en kg s^{-1} ; P es la potencia de la máquina, en W ; F es el factor de eficiencia de la irradiación y la utilización de la máquina (0,25 a 0,75); y D es la dosis, en Gy .

El rendimiento, M/t , es inversamente proporcional a la dosis administrada al producto. Dosis más altas significan menor rendimiento:

$$M/t = (const.) \times I/D \quad (\text{ec. 2})$$

La potencia, y consecuentemente el rendimiento, es directamente proporcional a la actividad de las fuentes:

$$P = (const.) \times A \times E / t \quad (\text{ec. 3})$$

donde la potencia efectiva, P, es la energía por segundo impartida al producto; A es la actividad total de las fuentes, en Bq, E es la energía media por desintegración, en J, y t es el tiempo de exposición, en s.

La cámara experimental gamma utilizada en este estudio, se basa en una máquina que tiene cuatro fuentes ^{60}Co , con una actividad total de 174 TBq (4,68 kCi), y con tasas de dosis entre 0,10 kGy h⁻¹ y 2,60 kGy h⁻¹ (en noviembre de 2013).

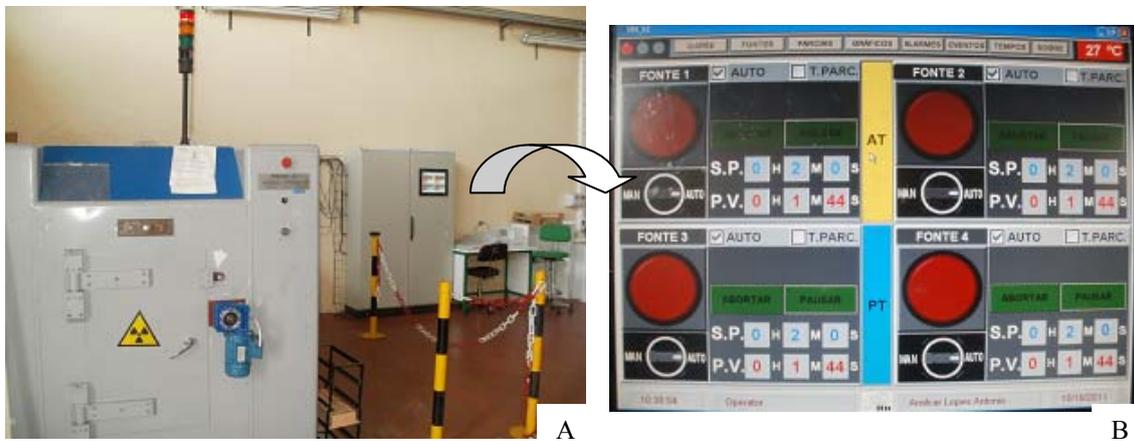


Fig. 2. Cámara de irradiación gamma (A) y sistema de control de las fuentes (B).

En la actualidad, hay en el mundo cerca de un centenar de plantas de irradiación gamma registradas en la base de datos de la AIEA (IAEA, 2013), que se utilizan para diversos fines: irradiación de los alimentos y esterilización de otros materiales, por ejemplo productos médicos desechables, productos farmacéuticos, etc. (Eustice, 2013; Kume & Todoriki, 2013).

1.2. Irradiación con electrones

Otro tipo de radiación ionizante utilizada para la conservación de alimentos son los electrones de alta energía, producidos en un cátodo y acelerados por un potencial eléctrico de corriente continua (CC) o por radiofrecuencia (RF).

Los aceleradores de RF son más compactos, lo que permite su uso en lugares pequeños, reduciendo los costes de instalación y de construcción (Lancker *et al.*, 1999). Estas máquinas también se pueden usar para producir rayos X, utilizando un blanco

metálico en frente del haz. Los rayos X son interesantes porque tienen una mayor profundidad de penetración en el producto (Auslender *et al.*, 2004; Cleland & Stichelbaut, 2013). Sin embargo, la baja eficiencia de conversión de energía en rayos X (Ziaie *et al.*, 2002; Deeley, 2004) impone algunas limitaciones económicas para el uso de este tipo de proceso de irradiación de productos alimenticios de bajo valor, debido al precio más alto de la máquina de irradiación y costes de su utilización.

La penetración de los electrones en los alimentos es directamente proporcional a su energía y, en estos equipos, se utiliza generalmente la energía máxima permitida de 10 MeV para obtener una buena uniformidad en la dosis y tener versatilidad para irradiar diferente tipo de productos alimenticios. Este valor límite se establece con el fin de que no se activen los núcleos y para no inducir así radiactividad en el producto (Miller, 2005).

Los productos irradiados pasan por un transportador bajo un haz vertical y se obtiene la dosis suministrada ajustando la velocidad de la cinta transportadora.

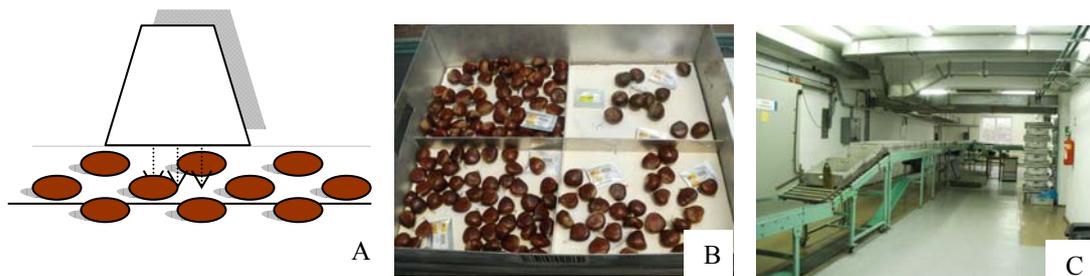


Fig. 3. Irradiación con electrones (A), castañas (B) y transportador (C).

En el proceso de irradiación con electrones los parámetros principales son: la energía de los electrones, que limita la profundidad de penetración; y la potencia del haz, que limita el rendimiento de la máquina.

En la irradiación de semillas, la configuración de la irradiación es en general una haz horizontal delante del cual los granos caen por gravedad (Zakladnoi *et al.*, 1982; EVONTA, 2014). Para irradiar castañas, la geometría recomendada es de un haz vertical y las frutas transportadas en una cinta. Con esta configuración es más fácil controlar la velocidad, garantizar la presencia de sólo una capa de frutas y, más importante, tener la versatilidad suficiente para permitir la irradiación de otros productos alimenticios u otros materiales.

Hay algunos sistemas de irradiación con electrones transportables, contruidos por diferentes compañías (Berejka, 2004; IAEA, 2011), pero debido a las limitaciones de

peso, blindaje de la radiación y costes del transporte, se limitan a energías de algunos cientos de keV o de pocos MeV, lo que limita su uso a aplicaciones de baja profundidad de penetración, como por ejemplo para el tratamiento de aguas residuales o de gases de combustión industriales (EBTech, 2013) y para el tratamiento superficial de semillas (EVONTA, 2014).

Los irradiadores de electrones son más complejos que los irradiadores gamma sin embargo, debido a varios factores, son cada vez más populares y son la primera opción, siempre que el producto pueda ser tratado por radiación de baja penetración. Y puesto que estos equipos se pueden usar también para producir rayos X, los cuales tienen una profundidad de penetración superior, justifica la creciente demanda de este tipo de máquinas, cuando el coste de operación y relación precio producto procesado sea viable.

En todo el mundo hay varios cientos de aceleradores de electrones utilizados para diferentes aplicaciones industriales, entre las que la irradiación de alimentos representa sólo una pequeña parte (Berejka, 2009).

1.3. Irradiación gamma *versus* electrones

Hay varias empresas que ofrecen diferentes diseños para plantas industriales gamma y de electrones para irradiación de alimentos, ajustados a las necesidades del producto y a las peticiones del usuario final (Berejka, 2009).

La opción por un irradiador gamma o de electrones debe tener en cuenta varios factores: el tipo y dimensiones del producto a irradiar, tiempo de utilización del equipo, costes de mantenimiento y el coste de la electricidad.

Comparando las dos tecnologías de conservación de alimentos: la radiación gamma produce bajas tasas de dosis, pero tiene una alta penetración que permite la irradiación de volúmenes más grandes, los electrones tienen una baja profundidad de penetración, pero tasas de dosis altas.

En las unidades de irradiación gamma el decaimiento del ^{60}Co es continuo, lo que hace recomendable su utilización las 24 h. Por otro lado, el aparato de electrones puede ser encendido o apagado cuando sea necesario.

El coste de ambas unidades para uso industrial comienza en 1 millón de euros y puede alcanzar el valor de 10 millones de euros (Balaji, 2013; Cokragan, 2013; Dethier, 2013; Stein, 2013). Sin embargo, si las unidades son operadas todo el año, el impacto en el precio final del producto puede ser aceptable y del orden de 2 a 10 céntimos de euro por kilogramo (Morrison, 1989).

Estas unidades están también, en general, dedicadas a esterilizar otros materiales, como por ejemplo dispositivos clínicos o farmacéuticos, lo que puede reducir el impacto de los costes de la instalación en el precio final del producto.

En la Unión Europea, el uso de estas tecnologías para procesar alimentos se limita a unos pocos países (E.U., 2011b), debido principalmente a la baja aceptación por los consumidores de este tipo de tratamiento, como se discutirá más adelante.

En la Unión Europea hay 16 plantas gamma y 6 plantas de electrones en 12 países, donde están autorizados para el procesamiento por irradiación diferentes productos alimenticios (E.U., 2011a). Existe también una lista relativamente reciente de 10 unidades de irradiación en 5 países fuera de la UE, autorizados a exportar al mercado europeo (E.U., 2002). En el mundo, hay más de cien unidades de plantas de irradiación gamma y de electrones, en unos 40 países, y para diferentes tipos de alimentos (IAEA, 2013). Y hay aún más unidades de irradiación dedicadas a aplicaciones industriales, como esterilización de dispositivos médicos y productos farmacéuticos; modificación de materiales; decontaminación de aguas residuales y de gases de combustión industriales (IAEA, 2004a).

La percepción o aceptación de los consumidores de la tecnología de procesamiento también se tiene en cuenta en la decisión final. Los electrones y los rayos X son cada vez más populares, ya que fácilmente se pueden conectar y desconectar, en comparación con la emisión permanente de radiación gamma por las fuentes de ^{60}Co , pero sobre todo debido a la asociación incorrecta por parte de los consumidores de los alimentos irradiados con radiación gamma con los radioisótopos que las emiten y con la contaminación radiactiva (Miller *et al.*, 2003).

Todavía, una planta de irradiación con electrones para alimentos se considera una inversión intensiva de capital, proveniente en su mayoría del coste del acelerador, de los sistemas de protección contra la radiación y del *hardware* para el manejo de los productos a irradiar (Miller, 2005). Si el acelerador de electrones está integrado en una unidad agroindustrial, otros costes podrían ser compartidos; por ejemplo, el sistema de manejo y la instalación del edificio. La posibilidad de construir un local con radioprotección para un acelerador de electrones móvil que pueda ser transportado a otras unidades industriales es un tema que puede también aumentar la tasa de depreciación y bajar el coste de la inversión (Catana *et al.*, 1995; Iacoboni *et al.*, 1998; Batskikh *et al.*, 1999).

2. Conservación de alimentos por irradiación

El procesamiento por irradiación de alimentos se utiliza casi desde el inicio de la presencia de los humanos en la tierra con el uso de la radiación solar para secar y preservar frutas, setas, hierbas o especias, que destaca por ser un proceso respetuoso con el medio ambiente y limpio (Khandal, 2010; Antonio *et al.*, 2012a; Fernandes *et al.*, 2012a).

El proceso de la tecnología de irradiación se basa en la física y la química de las interacciones de la radiación con la materia (Chmielewski *et al.*, 2006). En la interacción de la radiación ionizante con la materia el haz pierde intensidad al transferir su energía a los átomos o moléculas del producto generándose partículas secundarias cargadas.

2.1. Dosimetría

La interacción de fotones con la materia genera moléculas ionizadas y electrones, principalmente por efecto Compton (Singru, 1972; McLaughlin *et al.*, 1989; IAEA, 2009). La energía cinética total transferida a las partículas cargadas por unidad de masa del material se define como Kerma - energía cinética absorbida por la materia ($K = dE/dm$). Las partículas cargadas generadas por la radiación interactúan con el material por ionización o excitación de las moléculas.

El total de energía absorbida por unidad de masa se define como la dosis, D .

$$D = \int_0^{E_{\max}} \Psi(E) \frac{\mu_{en}}{\rho} dE \quad (\text{ec. 4})$$

En que $\psi(E)$ es el flujo de energía ($J m^{-2}$) de los fotones y μ_{en}/ρ es el coeficiente de absorción másico ($m^2 kg^{-1}$).

La dosis total absorbida se expresa en Gray, Gy, que representa la energía absorbida por unidad de masa, en $J kg^{-1}$:

$$D = \frac{E}{m} \quad (\text{ec. 5})$$

En la irradiación de alimentos se define aún: la dosis mínima, D_{\min} , como el valor que garantiza el efecto deseado; la dosis máxima, D_{\max} , como el valor por encima del cual el alimento puede no conservar sus características o el límite impuesto por la legislación; y la uniformidad de la dosis, la relación D_{\min}/D_{\max} .

La legislación Europea limita a 10 kGy el valor para la dosis máxima y el factor de uniformidad, D_{\min}/D_{\max} , a 3 (EU 1999a).

El *Codex Alimentarius*, en la norma general para alimentos irradiados (CODEX 2003), se refiere solo a la dosis mínima como la dosis necesaria para el objetivo tecnológico deseado, y la dosis máxima es la que garantiza la calidad y seguridad alimentaria del producto irradiado.

Hay otro parámetro importante en la interacción de la radiación con los materiales, principalmente en productos biológicos, que es la tasa de dosis, la dosis por unidad de tiempo. Los efectos en la materia o material orgánico no dependen sólo de la dosis, sino también de la tasa de dosis. De hecho, el tiempo para eliminar un microorganismo o el efecto en una reacción química depende de la tasa de dosis (Cabo Verde *et al.*, 2010).

En la preservación de alimentos por irradiación diferentes rangos de dosis tienen diferentes aplicaciones tecnológicas: inhibición de la germinación (0,05-0,15 kGy); desinsectación de insectos (0,15-0,5 kGy); retraso de procesos fisiológicos de maduración (0,25-1,0 kGy); eliminación de microorganismos (1-10 kGy); o esterilización total de alimentos (10-50 kGy) (ICGFI, 1999).

Actualmente, en el mundo se procesan alrededor de 400.000 toneladas de alimentos por irradiación, con casi la mitad, 186.000 toneladas, para eliminar insectos (Kume *et al.*, 2009). En la UE, según el último informe, el total de alimentos procesados por irradiación fue alrededor de 8.000 toneladas, principalmente productos cárnicos, de los cuales alrededor de 1.200 toneladas para descontaminación de especias y hierbas aromáticas (E.U., 2011b).

2.2. Sistemas dosimétricos

El tratamiento por radiación depende de un buen sistema dosimétrico. Los dosímetros son una herramienta práctica para medir la dosis, la energía por masa depositada por una fuente de radiación en un material particular, líquido, sólido o gaseoso, donde la dosis se expresa en Gray (Gy).

La Agencia Internacional de Energía Atómica, AIEA, estableció un programa de dosimetría de dosis en 1977 (Mehta, 1998) y desde entonces se han aprobado varias normas para el uso industrial del tratamiento por irradiación en alimentos (Farrar IV, 1999).

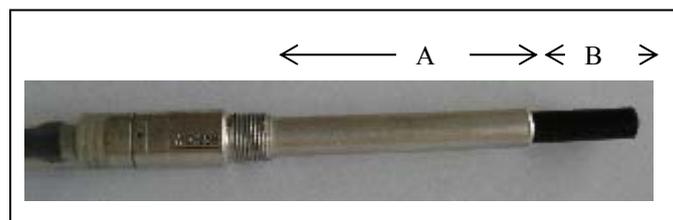
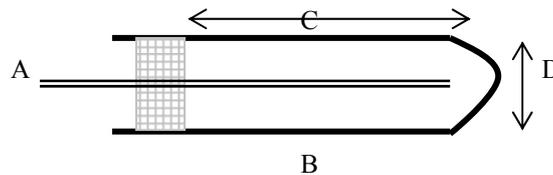
En este trabajo se han utilizado tres tipos de dosímetros para el control de la irradiación de alimentos y para la caracterización de la instalación de irradiación:

cámara de ionización (patrón primario); solución líquida Fricke (patrón de referencia); y dosímetro de polimetilmetacrilato (dosímetro de rutina).



Fig. 4. Dosímetros utilizados.
(Amber perspex (A), Fricke (B) y cámara de ionización (C)).

Un proceso de irradiación es precedido por la caracterización de la tasa de dosis dentro de la cámara. Esto se puede hacer usando varios sistemas dosimétricos que miden la interacción de la radiación con un material (gas, líquido o sólido), en que es posible convertir en dosis ese cambio de la corriente (detector de cámara de ionización) o color (dosímetros líquido o sólido).



(A – 55 mm, diametro 8.5 mm; B – 25 mm, diametro 7 mm)



Fig. 5. Cámara de ionización y electrómetro.

El dosímetro líquido más popular es la solución Fricke, una solución acuosa de sulfato ferroso de amonio (ASTM, 1992).



Fig. 6. Preparación del dosímetro de Fricke.

Con la radiación ocurre la conversión de los iones Fe^{2+} en iones Fe^{3+} y el cambio de absorbancia espectrofotométrica de la solución, siendo este cambio proporcional a la dosis de irradiación, que será en este caso equivalente a la dosis absorbida en agua por tratarse de un dosímetro acuoso. La dosis se estima midiendo la absorbancia de una solución irradiada a aproximadamente 303 nm por comparación con una solución no irradiada, en un espectrofotómetro de doble haz. Utilizando diferentes tiempos de exposición a la radiación y a partir de un gráfico absorbancia *versus* tiempo, la pendiente de la curva en un punto permite obtener la tasa de dosis para esa posición.

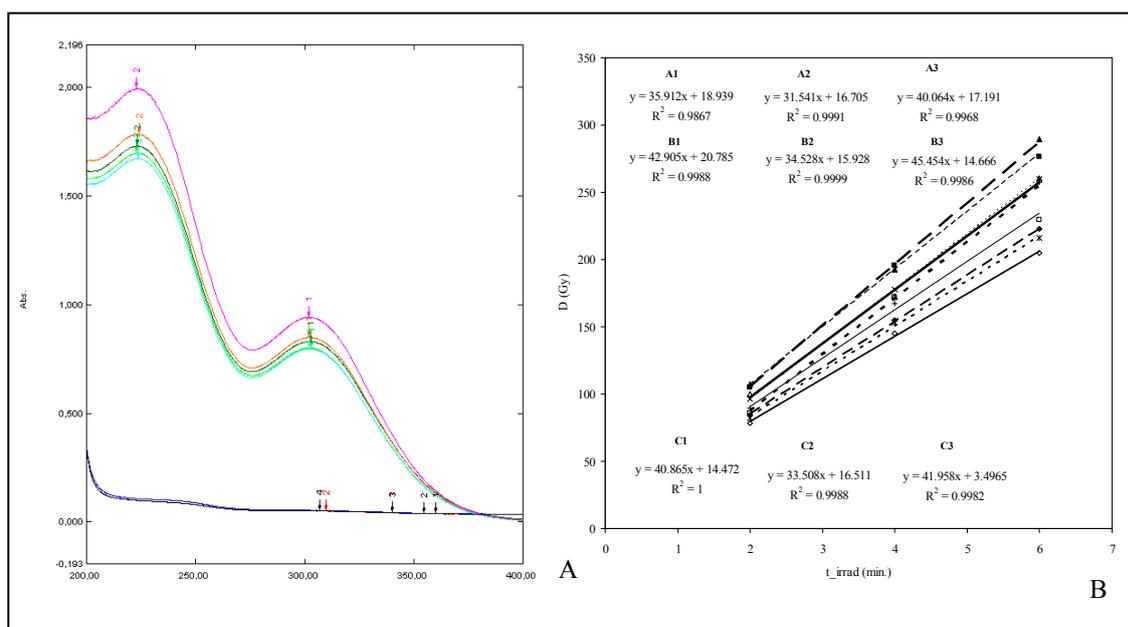


Fig. 7. Espectro de soluciones irradiadas y dosis vs. absorbancia en distintas posiciones.

Los dosímetros sólidos son de diferentes materiales; por ejemplo, polimetilmetacrilato con un colorante impregnado que cambia de color con la radiación (ICRU, 2008). La dosis se calcula a partir de una curva de calibración, donde se mide la absorbancia específica a una longitud de onda seleccionada (ASTM, 1989). En el caso de los dosímetros de polimetilmetacrilato, la absorbancia específica se mide a 603 nm en el rango de 1-10 kGy y a 651 nm en el rango de 10-30 kGy.

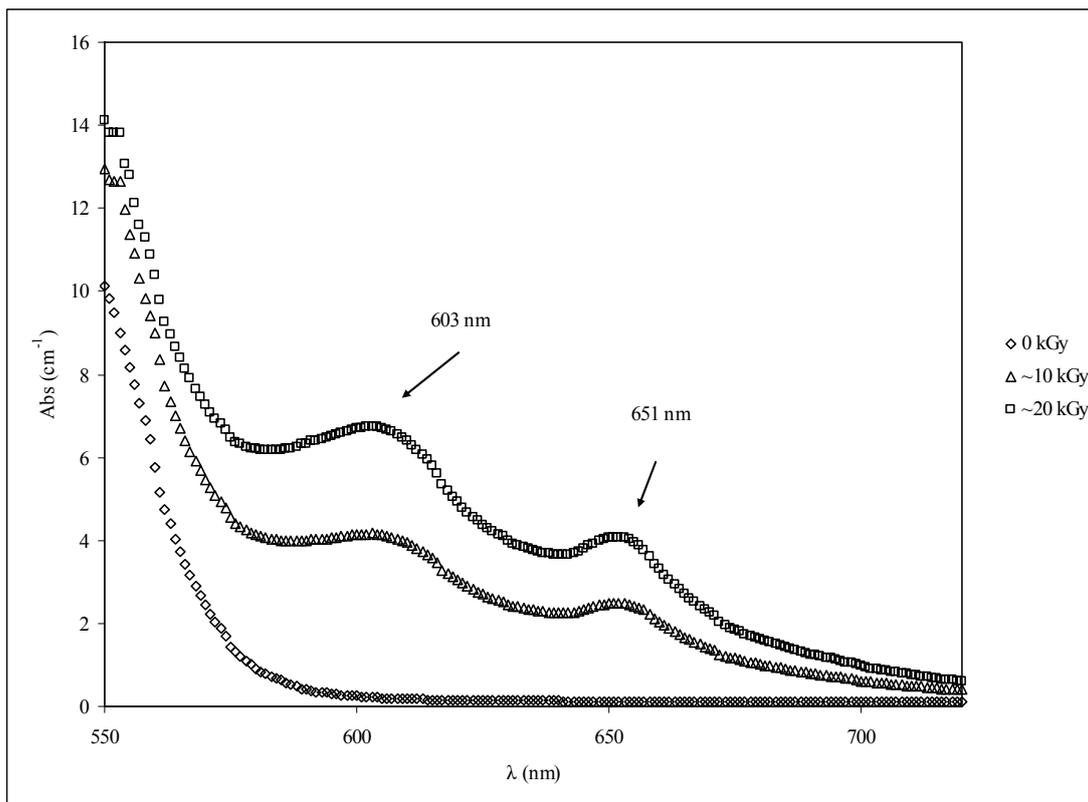


Fig.8. Lectura de dosímetros Amber.

Para obtener una buena uniformidad en la dosis de irradiación, y para respetar los límites tecnológicos y legales impuestos por la relación D_{max}/D_{min} , durante un proceso de irradiación las muestras se hacen rotar.

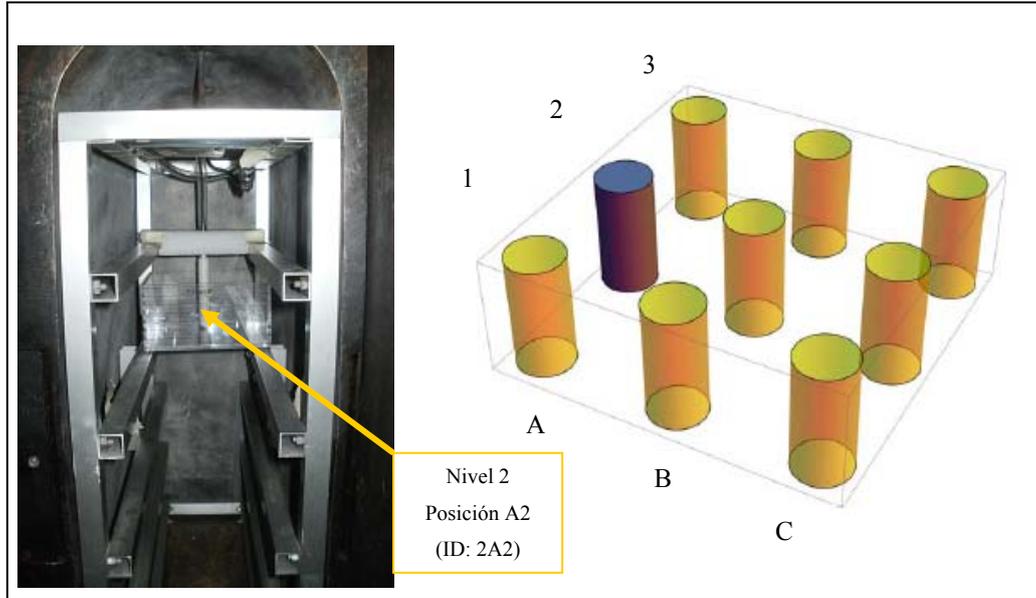


Fig. 9. Dosimetría con la cámara de ionización.

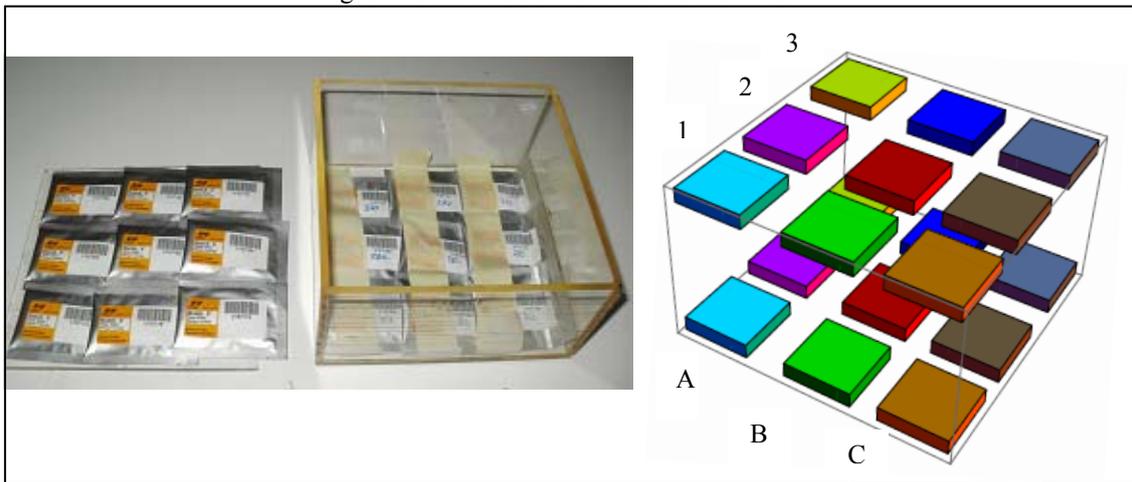


Fig. 10. Dosimetría con Amber.

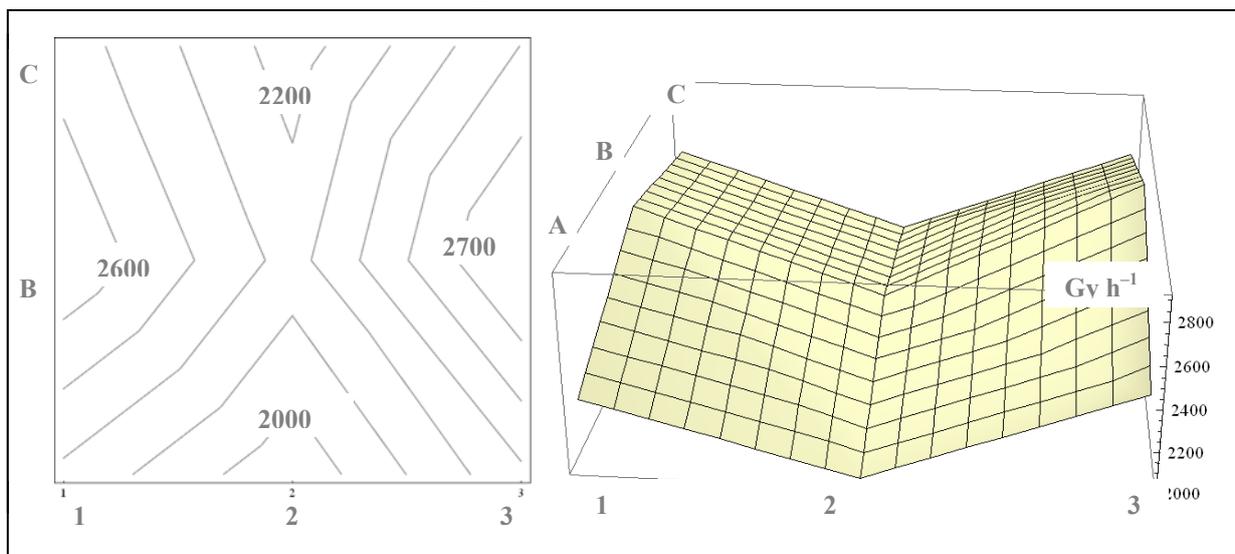


Fig. 11. Tasa de dosis en la caja de irradiación

En los dosímetros Amber y Fricke la densidad es cerca la del agua y del producto irradiado. En este caso, $D_F \sim 1.033 D_d$ para el Amber y $D_F \sim 1.005 D_d$ en el caso del dosímetro de Fricke. En que D_F es la dosis en el producto y D_d es la dosis estimada en el dosímetro.

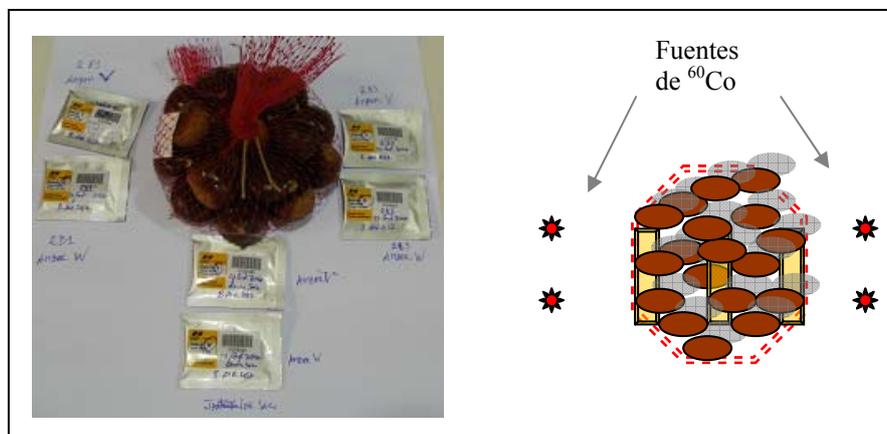


Fig. 12. Irradiación de castañas, dosímetros y posición de las fuentes de ^{60}Co .

2.3. Aspectos de legislación y preocupaciones de los consumidores

El primer país en regular el uso de la irradiación fue la Unión Soviética, en 1958, seguido por Canadá, en 1960, para la inhibición de la germinación, y EE.UU., en 1963, para la desinsectación de insectos (Nordion, 2013). En 1964, se reunió por primera vez la comisión conjunta de la FAO/AIEA/OMS y solo en 1981 se publicó el informe "Seguridad de los alimentos irradiados", después de revisar los datos científicos de varias décadas (WHO, 1981). Este informe impulsó la aparición de legislación en varios países. Un hito importante en este sentido es la edición del *Codex Alimentarius*, en 1983, que fue revisado para integrar la irradiación de alimentos (Codex, 2003). En 1986, la Unión Europea inició un proyecto para regular el uso de estas tecnologías, que se publicó sólo en 1999, armonizando las diferentes legislaciones nacionales de los países que integran la Unión, con la Directiva "relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes" (E.U., 1999a). Este reglamento es una transposición del *Codex Alimentarius*, que autoriza el tipo de radiación (gamma, electrones, rayos X) y limita las energías máximas de electrones y rayos X a 10 MeV y 5 MeV, respectivamente.

En el mismo año, se emitió la Directiva 1999/3/CE, vigente en la actualidad y que autoriza la irradiación de hierbas secas, especias y verduras hasta 10 kGy en toda la UE (E.U., 1999b). Otro tipo de alimentos irradiados forman parte de una lista aprobada por

cada país y que puede contener productos tales como frutas y verduras, cereales y harina de arroz, especias y condimentos, pescado, mariscos; carnes, aves, ancas de rana, goma arábica, caseína/caseinatos y clara de huevo (E.U., 2013b).

2.3.1. Etiquetado

La legislación de varios países impone un etiquetado especial para alimentos irradiados. Según la Comisión del Codex Alimentarius, Organización de las Naciones Unidas, el uso del símbolo "*Radura*", se considera opcional y obligatoria la declaración escrita "*alimento tratado por radiaciones ionizantes*" (Codex, 1999, 2003).

Algunos países, como EE.UU., Canadá o China, incluyen en su legislación ambos, el símbolo y la declaración escrita como obligatorios (web, 2009). En la UE sólo se requiere la declaración "irradiado" o "tratado con radiación ionizante", en la legislación, para el etiquetado de alimentos irradiados (E.U., 1979, 1999a).



Fig. 13. Símbolo *Radura* y castañas irradiadas.

De acuerdo con las conclusiones y recomendaciones de los informes de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1981, 1994, 1999), la situación deseable sería que la legislación de los países cambiase a una tendencia de no utilizar la etiqueta "*Radura*", teniendo en cuenta que las agencias de seguridad de alimentos deben garantizar la calidad de los productos alimenticios, y no necesariamente indicar qué tipo de proceso se utilizó para garantizar su seguridad, en similitud con otros procesos de conservación, físicos o químicos, ya que este etiquetado puede inducir a una información incorrecta e inhibir a los consumidores.

2.3.2. Aceptación por los consumidores

A pesar de que los efectos de estas tecnologías de procesamiento de alimentos están bien estudiados por la comunidad científica, la irradiación de alimentos sigue teniendo baja aceptación por los consumidores debido a razones no científicas, a la

asociación incorrecta de alimentos irradiados con radiación gamma emitida por radioisótopos y a la contaminación radiactiva. Todavía, las autoridades de seguridad alimentaria que imponen un etiquetado especial para alimentos irradiados, refieren que "la irradiación de alimentos no tiene nada que ver con contaminación radiactiva de alimentos, resultado de un derrame o un accidente" (E.U., 2013a).

En la radiación gamma, las energías emitidas por los isotopos de ^{60}Co son aproximadamente 1 MeV. Estos valores no son suficientes para perturbar los núcleos e inducir radiactividad en los átomos. La idea de que la radiación es un aditivo, que se mantiene dentro de la comida después de la irradiación, ha tomado parte inicialmente de algunas legislaciones, lo que ha contribuido a mantener un error científico acerca de un proceso físico que utiliza la radiación electromagnética en el procesamiento de alimentos (Nordion, 2013).

Algunas autoridades alimentarias, como la FDA en EE.UU., todavía mantienen la clasificación errónea de la irradiación como "aditivo alimentario" (web, 2013). Otra de las preocupaciones de los consumidores, la formación de productos radiolíticos o productos secundarios que podrían tener efectos en la salud, fue aclarada por un informe de un comité conjunto FAO/AIEA/OMS sobre la "seguridad de alimentos irradiados", y por el informe "Adecuación nutricional de los alimentos irradiados", que revisó los datos de más de cuatrocientos estudios científicos (WHO, 1981, 1994).

Los radicales formados por la interacción de la radiación son de vida corta, de unos 10^{-11} segundos, y reaccionan con otros componentes formando entidades estables (EFSA, 2011). Por otro lado, el tratamiento por irradiación ionizante genera menor cantidad de subproductos que otros tratamientos térmicos, como cocinar, congelar o pasteurizar (WHO, 1999).

En cuanto a las dosis máximas autorizadas para la elaboración de alimentos, existe una discrepancia entre algunos países. Siguiendo las recomendaciones del informe "Seguridad de los alimentos irradiados con dosis superiores a 10 kGy", de la comisión científica conjunta de la FAO, OMS, y AIEA, se consideró que no es técnicamente necesario imponer un límite para la dosis: "... *los alimentos irradiados con cualquier dosis adecuada para alcanzar el objetivo técnico previsto son seguros para su consumo y nutricionalmente adecuados*" (WHO, 1999). Por otra parte, el *Codex Alimentarius* transpuso esta conclusión, validando el uso de dosis más altas "... *cuando sea necesario para lograr una finalidad tecnológica*" (Codex, 2003).

El comité científico de alimentación de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), aún mantiene el límite de dosis de 10 kGy en el reglamento, sin embargo reconoce que algunos productos, como las especias, hierbas secas y condimentos, pueden necesitar dosis de hasta 30 kGy para descontaminación por radiación "*... para asegurar un producto en condiciones higiénicas satisfactorias*" (EFSA, 2011).

Las dosis que se utilizan para irradiación de alimentos son en general inferiores a 10 kGy. Los productos irradiados a altas dosis, como las verduras, frutas o frutos secos, pueden perder o cambiar algunas de sus propiedades, como por ejemplo la textura o el color, lo que tiene un impacto en la apariencia del producto, y que limita su aceptación por el consumidor (Arvanitoyannis, 2010). Sólo para necesidades particulares las dosis aplicadas son superiores a este valor, como en la esterilización de alimentos para misiones espaciales; descontaminación de alimentos para personas con déficit inmunitario; o en la esterilización de alimentos envasados, para destruir todas las bacterias contaminantes y esporas (Dauthy, 1995; WHO, 1999).

A pesar del consenso dentro de la comunidad científica sobre la seguridad de los alimentos irradiados, la no aceptación de este tipo de alimentos procesados por irradiación tiende a persistir y tal vez sólo la formación o educación en este ámbito pueda cambiar esta situación.

3. Irradiación de castañas

La castaña es un fruto típico en el sur de Europa, en las zonas montañosas de los países mediterráneos y en Asia, principalmente en China. La principal región de producción de castañas es Asia (85%), seguido de Europa (12%), con una producción mundial de 2.000.000 toneladas. En los países mediterráneos de la UE representa un mercado de más de 100.000 toneladas (FAOSTAT, 2012).

Las castañas son infestadas por larvas de diferentes especies, dependiendo de la región del mundo, lo que causa pérdidas de ingresos para los productores y para la industria alimentaria (Kwon *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2004). Las larvas consumen el producto y, puesto que hay un mercado internacional para las castañas, las normas fitosanitarias internacionales imponen reglas de cuarentena cuando hay una amenaza de la especie infestante para el ecosistema local. El tratamiento de cuarentena es una obligación para los productos alimentarios exportados, que deben ser tratados posteriormente a la cosecha para eliminar los insectos y gusanos, de manera a que cumpla con las regulaciones fitosanitarias del comercio internacional (WTO, 1994; ICGFI, 1998).

Hasta hace poco, para la desinsectación de castañas después de la cosecha se utilizaba un insecticida químico, el bromuro de metilo (MeBr), que ha sido prohibido en la UE desde marzo de 2010, debido a su toxicidad para los operadores y para el medio ambiente (E.U., 2008). Sin embargo, esta decisión dejó muy pocas alternativas a la agroindustria que procesa y exporta esta fruta.

Otra tecnología en uso para satisfacer las regulaciones comerciales fitosanitarias es el tratamiento de inmersión en agua caliente, que tiene una baja eficiencia y algunos problemas tecnológicos, como por ejemplo el contacto de la fruta con agua y un bajo rendimiento, velocidad de calentamiento lento y largo tiempo de procesamiento, con posible daño a la carne de algunas frutas frescas que pueden comprometer la calidad del producto (Aegerter & Folwell, 2000; Guo *et al.*, 2011).

La desinsectación postcosecha por fumigación química es muy eficiente, mientras que el uso de radiaciones ionizantes presenta algunas limitaciones, principalmente por no causar la muerte inmediata de las larvas, y por la ausencia de técnicos capacitados para el control de alimentos irradiados (Marcotte, 1998). Sin embargo, las organizaciones internacionales están esforzándose en la adopción de normas

fitosanitarias que permitan el uso de la irradiación, para impedir en el país de destino la propagación de plagas (APHIS, 1996; ISPM, 2003).

3.1. Antecedentes – estado de arte

La fumigación química es perjudicial para el medio ambiente y para los operadores, además deja residuos en los productos (Kwon *et al.*, 2004; E.U., 2008). La irradiación se presenta así como un tratamiento de cuarentena postcosecha posible para la eliminación de insectos, estando ya validado para diferentes especies de insectos (IAEA, 2004b; ISPM, 2007; IDIDAS, 2012).

El *Codex Alimentarius*, un estándar internacional para las buenas prácticas alimentarias, recomienda el uso de la irradiación para la desinsectación de alimentos y productos agrícolas (ICGFI, 1998). Este tratamiento postcosecha ha sido aprobado por varios países para el tratamiento de diferentes tipos de alimentos, en cumplimiento de las normas de cuarentena durante la exportación (APHIS, 1996; FSANZ, 2002).

En este contexto, la eliminación de insectos en las castañas por irradiación puede ser una alternativa viable, si el producto cumple con otros parámetros de calidad específicos para alimentos. La irradiación no puede ser usada para la preservación de todo tipo de alimentos, ya que puede producir cambios en algunos parámetros, tales como sabor o textura (Arvanitoyannis, 2010). Así, un proceso de irradiación debe ser validado, ya que cada tipo de alimento posee diferentes características de tamaño, contenido en agua o composición nutricional.



Fig. 14. *Castanea sativa* Mill. (variedades “Judia” y “Longal”).



Fig. 15. Castañas con gusanos, hongos e insectos irradiados.

Con el fin de reunir toda la información con respecto a la irradiación y su influencia en diversos parámetros de las castañas y sus plagas, fue publicada una revisión del estado de arte relativa a la radiación gamma (Antonio *et al.*, 2012a), que se resume a continuación. Más adelante, en el apartado 6, se actualiza esa información para incluir también la irradiación con electrones, una vez que el efecto de este tipo de radiación en los principales parámetros físico-químicos de la castaña no ha sido estudiado previamente.

En las variedades europeas de castaña (*Castanea sativa* Mill.), sólo hay un estudio previo relacionado con la validación de las normas de detección de irradiación en alimentos (Mangiacotti *et al.*, 2009) y no ha sido realizado ningún estudio acerca de la influencia de las radiaciones ionizantes en la preservación postcosecha. Estudios previos sobre los efectos de la irradiación en castaña se realizaron solo en las variedades asiáticas, en *Castanea crenata* y en *Castanea molissima*.

Iwata *et al.* (1959) llevó a cabo un estudio para determinar el efecto de la radiación gamma en la germinación, putrefacción y tasa de respiración de *Castanea crenata* y *Castanea molissima*, donde las castañas irradiadas mostraron siempre menor pudrimiento y germinación. En cuanto a la tasa de respiración de *Castanea molissima* sometida a dosis de irradiación de 0,10 hasta 0,20 kGy no presenta diferencias estadísticamente significativas en la liberación de dióxido de carbono.

Guo-xin *et al.* (1980) también realizó ensayos con radiación gamma para la inhibición de la brotación en *Castanea molissima*, en los que usó dosis de 0,3 a 1,2 kGy, verificando la no germinación en todas las muestras irradiadas en tiempos de almacenamiento de 86 y 108 días. Recientemente, Kwon *et al.* (2004) ha llevado a cabo un ensayo comparativo con radiación gamma y fumigación química con bromuro de metilo en castañas asiáticas (*Castanea crenata*). Estos autores han verificado que hasta 6 meses de almacenamiento sólo la dosis de 0,25 kGy presentaba niveles más bajos en la descomposición en comparación con el control (sin tratamiento) y que las dosis más altas de radiación revelaron niveles más altos de la descomposición, pero todas las dosis revelaran niveles más bajos de castañas podridas que las muestras fumigadas con bromuro de metilo. Kwon *et al.* (2004) también comparó los efectos del bromuro de metilo y la irradiación gamma sobre las plagas de insectos en *Castanea crenata*, concluyendo que el 100% de las plagas perecieron en las muestras fumigadas y también en muestras irradiadas, para una dosis de al menos 0,5 kGy. Imamura *et al.* (2004) estudió los efectos de esta radiación en *Castanea crenata* sobre la mortalidad de una

larva, *Cydia kurkoi* (Amsel), concluyendo que para la dosis de 0,3 kGy o superior estas larvas presentan una mortalidad del 100%.

Kwon *et al.* (2004) estudió la alteración del color de castañas irradiadas y fumigadas con bromuro de metilo, comparando el efecto en la parte interna y externa de la fruta. Y han concluido que la alteración de color, parámetro "L", ha ocurrido en las castañas fumigadas, y sólo cambió de manera significativa en las irradiadas para una dosis de 10 kGy.

3.2. Motivación

El uso de radiaciones ionizantes ha sido regulada y autorizada por las organizaciones internacionales (UE - Unión Europea, la EFSA - Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, la AIEA - Agencia Internacional de Energía Atómica, la FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y OMS - Organización Mundial de la Salud) para el procesamiento industrial de varios productos: esterilización de dispositivos médicos, modificación de materiales, preservación del patrimonio cultural y para la descontaminación de los alimentos.

La posibilidad de utilizar radiaciones ionizantes para tratar alimentos fue referida en la literatura un año después del descubrimiento de los rayos X por W.C. Röntgen, en 1896 (Molins, 2001). A nivel internacional hay un código de buenas prácticas, "Norma general para los alimentos irradiados", para procesar alimentos con radiaciones ionizantes (Codex, 2003). En Europa, la irradiación de alimentos se utiliza en diferentes países para varios productos y está regulado por la Directiva 1999/2/CE (E.U., 1999a). Los códigos o leyes mencionadas hacen recomendaciones sobre los diferentes tipos de radiación autorizados (gamma, rayos X, electrones), las energías (5 y 10 MeV para los rayos X y los electrones, respectivamente) y la dosis recomendada (en kilogray, julio por kilogramo).

Las castañas son un alimento popular en varios países, con una producción mundial de 2.000.000 toneladas. En los países mediterráneos de la UE esta fruta representa un mercado de más de 100.000 toneladas (FAOSTAT, 2012).

El tratamiento de cuarentena postcosecha es una obligación para los productos alimentarios exportados que se debe aplicar posteriormente a la cosecha para eliminar los insectos y gusanos, cumpliendo de esta forma con las regulaciones fitosanitarias del comercio internacional (WTO, 1994; APHIS, 1996; ICGFI, 1998). Hasta hace poco, se utilizaba para la desinsectación postcosecha de castañas un insecticida químico, el

bromuro de metilo (MeBr). Siguiendo las recomendaciones de un comité científico del Programa Ambiental de las Naciones Unidas (UNEP, 1995), este fue prohibido en la UE en marzo de 2010, debido a su alta toxicidad que afectaba principalmente a los operadores y el medio ambiente (E.U., 2008). Sin embargo, esta decisión dejó muy pocas alternativas a la agroindustria que procesa y exporta esta fruta. Por esto es urgente estudiar nuevas alternativas.

El tratamiento por irradiación es un proceso que debe ser estudiado cuidadosamente para cada material en particular, ya que los resultados varían de manera significativa con su composición molecular, su densidad y la geometría, entre otros factores (IAEA, 2002; Miller, 2005). Por tanto las dosis de radiación deben adecuarse a ellos.

Las pruebas anteriores en irradiación de castañas se realizaron sólo en variedades asiáticas (*Castanea crenata* y *Castanea molissima*), con el objetivo de validar su uso en la eliminación de insectos o gusanos (Imamura *et al.*, 2004; Todoriki *et al.*, 2006). Y, como se presentará al final, en las conclusiones y que apoyan la razón de este estudio, en los ensayos extendidos a otras variedades, la interacción entre la irradiación y variedades fue significativa en la mayoría de los casos, lo que indica que los efectos causados por cada tipo de irradiación pueden depender de las variedades de castañas ensayadas (Carocho *et al.*, 2013b). Lo que pone de relieve la importancia de la validación del procesamiento por irradiación en castañas de variedades europeas.

3.3. Objetivos

En la irradiación de castañas poca investigación se ha llevado a cabo concretamente en las variedades europeas (*Castanea sativa*) no se ha investigado el efecto de las radiaciones ionizantes sobre los parámetros físicos y químicos de los frutos.

Teniendo en cuenta los problemas presentados para la preservación de esta fruta, en este trabajo se han implementado varias medidas para estudiar el impacto de las radiaciones ionizantes en las variedades europeas de *Castanea sativa* Mill., buscando la validación de un proceso con interés para la agroindustria. Se ha definido como objetivo la intención de caracterizar los efectos de las radiaciones ionizantes en los parámetros físicos y químicos en muestras de castañas, utilizando dos tecnologías de irradiación: gamma y electrones. Así, los principales objetivos de esta investigación han sido: caracterizar el efecto de la radiación ionizante en las muestras de castañas de variedades

europas, comparar dos tecnologías disponibles y, finalmente, proponer un proceso innovador de tratamiento como alternativa a la fumigación química con bromuro de metilo.

Para ello se han previsto varias actividades: primero, selección y caracterización del tipo de muestras teniendo en cuenta la variedad, cantidad y características generales (tamaño, masa y densidad volumétrica) de los frutos; segundo, validación de la dosis, para lo que se han utilizado tres dosímetros independientes y se ha estimado la dosis mínima (D_{\min}), dosis máxima (D_{\max}), tasa de la dosis (DR, "*dose rate*") y la uniformidad de la dosis (DUR, "*dose uniformity ratio*") impartida en la cámara de irradiación al producto irradiado; tercero, evaluación de los efectos de la irradiación sobre los parámetros físicos y químicos y cuarto, estudio de los efectos a lo largo del almacenamiento. Para todo ello, se han aplicado las herramientas estadísticas adecuadas para comparar los efectos de las dosis de irradiación, tipos de irradiación (gamma y electrones) y el tiempo de almacenamiento.

4. Metodología

En los ensayos de validación de la tecnología para la conservación de las castañas se han seguido los pasos enumerados en el capítulo anterior: selección de muestras de distintas variedades y orígenes, irradiación con haces gamma y de electrones, validación de la dosimetría utilizando diferentes sistemas dosimétricos (cámara de ionización, Fricke y polimetilmetacrilato) y análisis del efecto de la irradiación en los parámetros físico-químicos, teniendo en cuenta el tiempo de almacenamiento.

4.1. Muestras

En este estudio se han considerado muestras de castaña *Castanea sativa* Miller de diferentes orígenes (Portugal, Turquía e Italia) y de diferentes variedades. Cada una de las variedades presenta características diferentes, físicas y organolépticas, como textura, dureza y sabor (Antonio *et al.*, 2011b; Antonio *et al.*, 2011c).

Las muestras se almacenaron a 4 °C durante 0 días, 30 días y 60 días, obteniendo para análisis una sub-muestra de cada uno de los tratamientos en cada instante de tiempo.

4.2. Irradiación

Para cada procedimiento de irradiación se dividieron las castañas en grupos: uno de control (0 kGy) y varios para irradiar a distintas dosis (desde 0,25 a 6 kGy), con cerca de medio kilogramo por grupo y cada grupo por triplicado. La irradiación gamma se realizó en Portugal, mientras que la irradiación por electrones se llevó a cabo en Polonia, utilizando para cada caso un control independiente con el fin de garantizar las mismas condiciones para todas las muestras y evitar una desviación inducida por diferencias entre las dos muestras de control.

La irradiación gamma de las muestras se realizó en un cámara experimental con cuatro fuentes de ^{60}Co de actividad total 267 TBq (6,35 kCi) en noviembre de 2011 (modelo Precisa 22, Graviner Manufacturing Company Ltd., Reino Unido), perteneciente al Instituto Tecnológico y Nuclear de Lisboa (Portugal).

Previamente, se ha estimado la tasa de dosis en los diferentes niveles y posiciones de la cámara, utilizando el dosímetro Fricke. Este dosímetro fue preparado en el laboratório de acuerdo con el procedimiento descrito en las normas (ASTM, 1992); simultáneamente, se colocó una cámara de ionización (modelo FC-65P, de IBA

Dosimetry, Alemania). En las irradiaciones se utilizó, el dosímetro de rutina de polimetilmetacrilato Amber 3042 lote V (Harwell Company, Reino Unido).

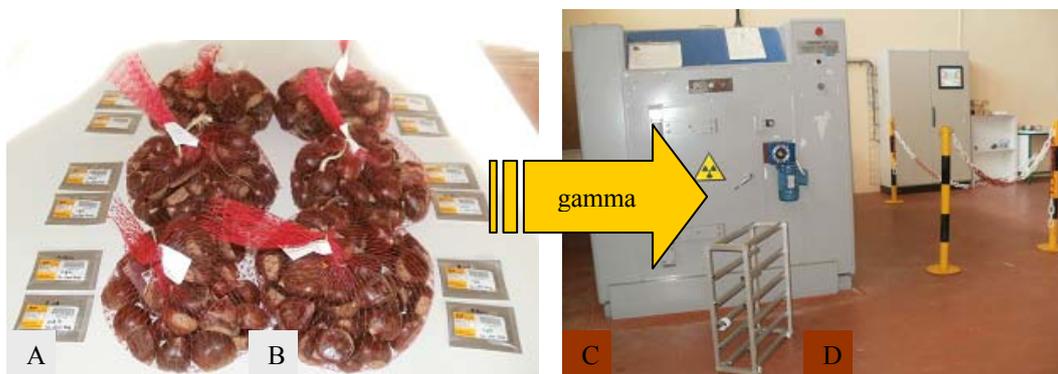


Fig. 16. Irradiación gamma.

Para garantizar una buena uniformidad de la dosis impartida, un D_{\max}/D_{\min} bajo y en buen acuerdo con las normas de irradiación de alimentos (E.U., 1999a), las muestras se hicieron girar para colocarlas boca abajo justo a la mitad del tiempo de la irradiación.

La irradiación con electrones se realizó en el Instituto de Química y Tecnología Nuclear de Varsovia (Polonia) utilizando electrones de 10 MeV de energía con los siguientes parámetros: duración del pulso de 5,5 μ s, frecuencia de pulso 440 Hz, corriente media de 1,1 mA, anchura y frecuencia de escaneo de 68 cm y 5 Hz, respectivamente; velocidad del transportador en el rango 20 a 100 cm/min.

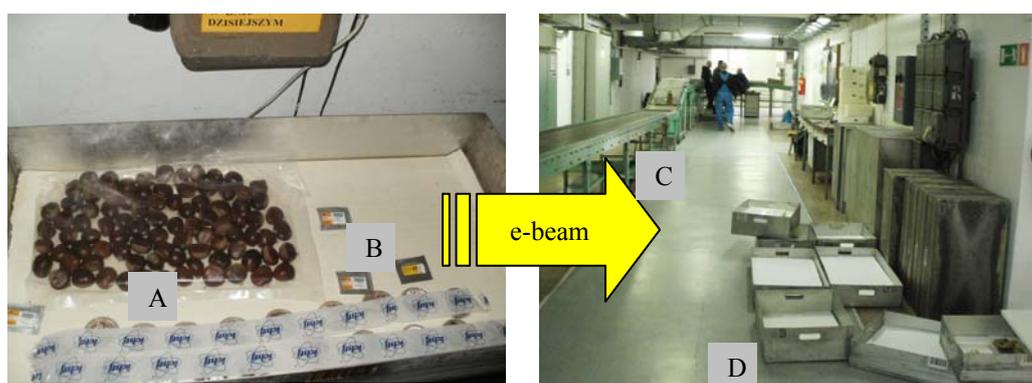


Fig. 17. Irradiación con electrones.

Dependiendo del nivel de dosis, se han utilizado los dosímetros de rutina de polimetilmetacrilato, Amber V y Gammachrome YR (Harwell Company, Reino Unido), y como dosímetro de referencia, el calorímetro de grafito. La cámara de ionización, calibrada en laboratorio nacional de metrología, ha sido conectada a un electrómetro que convierte la corriente en dosis.



Fig.18. Calorímetro con las muestras y medición de temperatura.

En cada uno de los dosímetros utilizados, tanto en la irradiación gamma como en con electrones, las dosis se obtienen de una manera diferente. En el dosímetro líquido de Fricke, se lee la absorbancia en un espectrofotómetro de doble haz de una muestra irradiada del dosímetro tomando como referencia una muestra no irradiada y una fórmula definida en las normas para convertir este valor en dosis (ASTM, 1992):

$$D_{Fricke} = (278 \Delta A) / ([1 + 0,007(T-25)][1 + 0,0015(T'-25)]) \quad (\text{ec. 6})$$

En esta expresión ΔA es la diferencia en la absorbancia medida a 305 nm entre una solución irradiada y no irradiada, T es la temperatura de la solución (°C) durante las mediciones espectrofotométricas y T' es la temperatura durante la irradiación (°C). Los factores de corrección 0,007 y 0,0015 vienen del factor G, rendimiento químico con la radiación para el ión hierro (Fe^{3+}), que disminuye con la temperatura de lectura y de irradiación, respectivamente.

En los dosímetros Amber 3042 lote V y Gammachrome YR se han leído las absorbancias en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda específica, 603 nm y 530 nm, respectivamente se realizan dos lecturas de cada uno para estimar la dosis de acuerdo con una curva de calibración obtenida previamente. En el calorímetro se ha leído la resistencia eléctrica del termistor antes y después de irradiado, para conocer el incremento de temperatura. Posteriormente ha sido convertida en dosis de acuerdo con una curva de calibración previa.

En ambos casos, gamma y electrones, las irradiaciones se hicieron a temperatura y atmósfera ambiente.

4.3. Parámetros físicos: color, textura y deshidratación

Los parámetros físicos son los primeros factores a ser evaluados por los consumidores, para decidir comprar o no un determinado alimento.

El color, la textura, y la deshidratación se monitorizaron después de la irradiación y a lo largo del tiempo de almacenamiento en los frutos de variedades europeas de *Castanea sativa* de los principales países productores (Portugal, Turquía, Italia). Las muestras analizadas fueron procesadas con radiación gamma y electrones utilizando varias dosis de irradiación (Antonio *et al.*, 2012b; Antonio *et al.*, 2013a; Antonio *et al.*, 2013b).

Para estas medidas se ha empleado un colorímetro, el cual registra los parámetros de color L*, a*, b* de la escala internacional CIE, un texturometro que mide la fuerza de penetración en las muestras y la tasa de deshidratación se ha medido en una estufa, registrando el peso de las muestras de castañas, control e irradiadas, hasta peso constante.

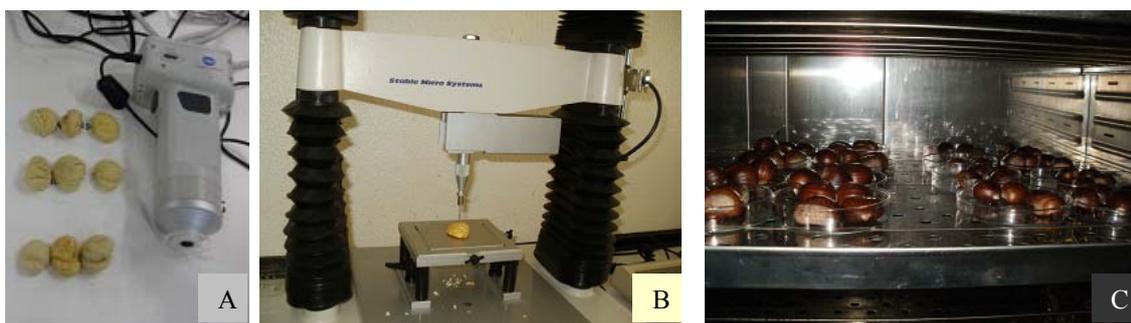


Fig. 19. Colorímetro (A), texturometro (B), estufa (C).

4.4. Actividad antioxidante

Para el análisis de la actividad antioxidante se sometió a las muestras a pretratamiento. Los frutos fueron separados manualmente de las pieles (interior y exterior) y las muestras para análisis se liofilizaron.



Fig. 20. Caracterización y preparación de muestras para análisis.

Inmediatamente después fueron reducidas a un polvo fino y se mezclaron para obtener muestras homogeneizadas. El polvo liofilizado se agitó con metanol a 150 rpm, a 25 °C, durante 1 h y se separó de los residuos a través de filtros de papel Whatman n° 4. En seguida, la parte residual se ha sometido a nueva extracción con una porción adicional de metanol.



Fig. 21. Extracción (A), filtración (B) y evaporación de solventes (C).

Los extractos metanólicos se evaporaron bajo presión reducida en un evaporador rotatorio, y se preparó una solución madre, en metanol a 10 mg/ml, que se almacenó a 4 °C para su uso posterior. A partir de la solución madre se han preparado diluciones sucesivas, diferentes concentraciones, para ser sometidas a ensayos *in vitro*.

Los valores de actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de frutas y pieles de castañas irradiadas fueron medidos mediante diferentes ensayos bioquímicos: el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) que mide la actividad del captación de los radicales, el método del poder reductor con el ensayo de azul de Prusia, el método del β -caroteno/linoleato que mide la inhibición de la peroxidación lipídica y el ensayo TBARS que verifica el comportamiento del extracto de las muestras con las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

En todos estos ensayos se utilizan métodos colorimétricos o espectrofotométricos para cuantificar las alteraciones observadas. Las concentraciones de la muestra que proporcionan el 50% de la actividad antioxidante, equivalente al 0,50 de la absorbancia (EC_{50}), se calcula a partir de las gráficas de las porcentajes de actividad antioxidante en función de la concentración de las muestras (ensayos de DPPH, β -caroteno/linoleato y TBARS) o a partir de la absorbancia a 690 nm (método del poder reductor). Se utilizó como referencia Trolox, un análogo de la vitamina E soluble en agua, considerado un estándar para los ensayos *in vitro* de la actividad antioxidant.

En el ensayo del DPPH se determina la actividad captadora de radicales midiendo la disminución de absorción del DPPH después de la exposición a sustancias eliminadoras de radicales. En el método del poder reductor se mide la conversión de

Fe^{3+} a la forma ferrosa, Fe^{2+} ; en la inhibición de la decoloración del β -caroteno se calcula la neutralización de los radicales libres y otros radicales-linoleato libres formados en el sistema, que atacan las moléculas insaturadas del β -caroteno. En el ensayo TBARS se mide la intensidad del color de la reacción con el ácido tiobarbitúrico.

4.4.1. Actividad de eliminación de radicales DPPH

Esta metodología se ha implementado utilizando un lector de microplacas (modelo ELX800, Bio-Tek Instruments Inc., EE.UU.), Fig. 21 Se realizaron diferentes mezclas de reacción para cada uno de los 96 pozos que tiene una microplaca añadiendo diferentes concentraciones del extracto de castaña a una solución metanólica acuosa conteniendo radicales DPPH. La actividad de eliminación de radicales (RSA, “Radicals Scavenge Activity”) se calculó como un porcentaje de la decoloración del DPPH usando la ecuación:

$$\%RSA = [(A_{DPPH}-A_S)/A_{DPPH}] \times 100 \quad (\text{ec. 7})$$

donde A_S es la absorbancia de la muestra y A_{DPPH} es la absorbancia de la solución del DPPH, medidas a 515 nm. La concentración del extracto que proporciona 50% de eliminación de la actividad de los radicales (EC_{50}) se calcula a partir de la gráfica de porcentaje de RSA frente a la concentración del extracto. Como estándar se ha utilizado el reactivo Trolox (Sigma-Aldrich, EE.UU) para medir el poder antioxidante de las muestras analizadas.



Fig. 22. Lector de microplacas y reacción de los extractos con el DPPH.

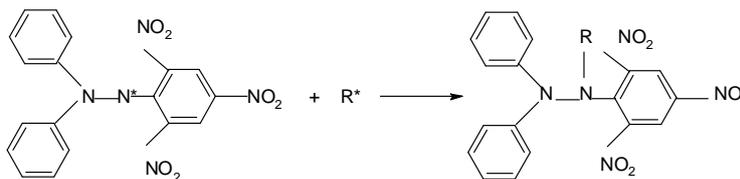


Fig.23. Captación de radicales por el DPPH.

4.4.2. Poder reductor

Esta metodología evalúa la capacidad de convertir Fe^{3+} en Fe^{2+} . Una parte de diferentes concentraciones de los extractos de las muestras a analizar se mezclaron con una solución tampón de fosfato de sodio y ferricianuro de potasio. La mezcla se incubó a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min, se le añadió ácido tricloroacético y se vertió en los 48 pozos de una microplaca, con agua desionizada y cloruro férrico, midiendo la absorbancia a 690 nm en el lector de microplacas descrito anteriormente. La concentración del extracto que origina 0,50 de la absorbancia (EC_{50}), se calcula a partir de la gráfica de la absorbancia a 690 nm frente a la concentración del extracto. Se ha utilizado como estándar el reactivo Trolox (Sigma-Aldrich, EE.UU).

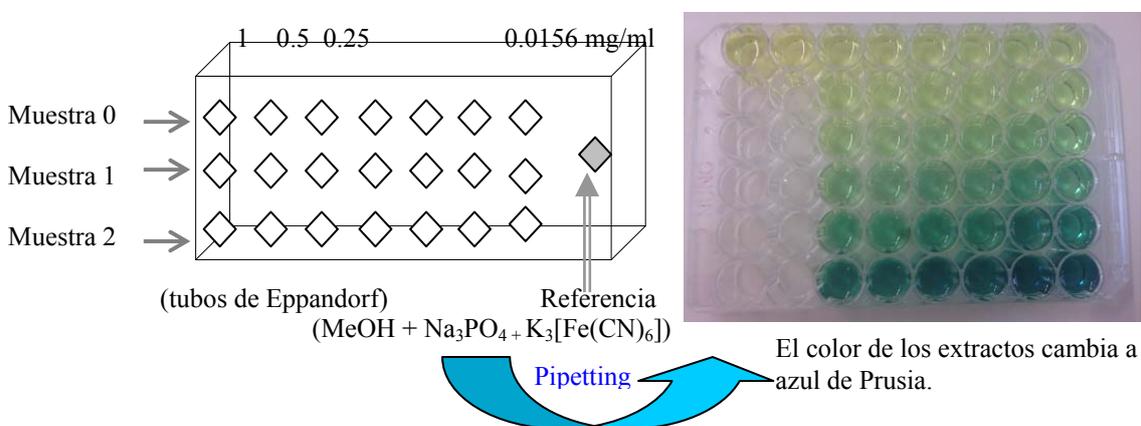


Fig. 24. Ensayo de ferricianuro/azul de Prusia.

4.4.3. Inhibición de la decoloración del β -caroteno

Esta capacidad de inhibición se evaluó con el ensayo β -caroteno/linoleato. La decoloración del β -caroteno está directamente relacionada con la neutralización de los radicales libres del linoleato y se midió utilizando la fórmula:

$$[A_S / A_0] \times 100 \quad (\text{ec. 8})$$

en que A_S es la absorbancia después de 2 h del ensayo y A_0 la absorbancia inicial.

Se preparó una solución de β -caroteno disolviendo 2 mg en 10 ml de cloroformo. Dos mililitros de esta solución se pipetearon en un matraz de fondo redondo. Después de que el cloroformo se eliminó bajo vacío a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, se ha añadido en un matraz ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80[®] (400 mg), y agua destilada (100 ml), seguido de agitación vigorosa. Alícuotas (4,8 ml) de esta emulsión se transfirieron a tubos de ensayo diferentes que contenían diferentes concentraciones de los extractos. El tiempo cero de absorbancia se midió a 470 nm, cuando la emulsión se añadió a cada

tubo. En seguida los tubos se agitaron y se incubaron a 50 °C en un baño de agua durante 2 h. La concentración de extracto que proporciona 50% de actividad antioxidante (EC_{50}) se calculó mediante interpolación a partir de la gráfica de porcentaje de inhibición de β -caroteno frente a la concentración del extracto, en que se ha utilizado como estándar el reactivo Trolox (Sigma-Aldrich, EE.UU).

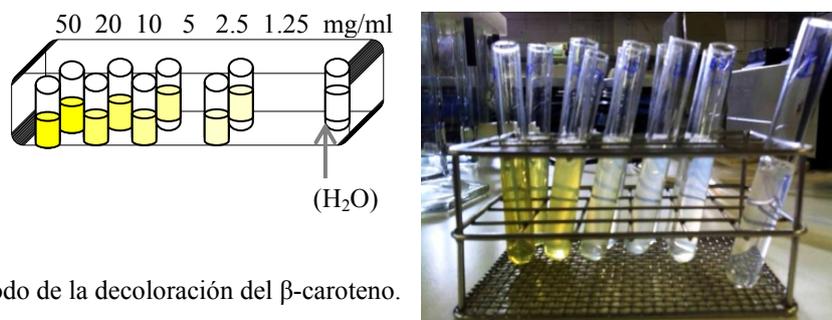


Fig. 25. Metodo de la decoloración del β -caroteno.

4.4.4. Ensayo TBARS

Los subproductos resultantes de la degradación de las grasas se pueden detectar por su reacción con el ácido tiobarbitúrico, ensayo de TBARS (“*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*”).

La inhibición de la peroxidación lipídica, inhibición de degradación de las grasas, se evaluó en muestras de cerebro de cerdo (*Sus scrofa*), que se diseccionaron, homogeneizaron con una solución tampón y se centrifugaron para utilizar una parte alícuota en los ensayos con extractos de las muestras, en presencia de ácido tiobarbitúrico (Barreira *et al.*, 2010).

La relación de inhibición (%) se evaluó de la disminución de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, usando la siguiente relación:

$$[(A - B)/A] \times 100\% \quad (\text{ec. 9})$$

donde A y B fueron la absorbancia a 532 nm del control, solo con los reactivos, y del extracto de la muestra con los reactivos, respectivamente.



Fig. 26. Ensayo de TBARS.

4.5. Fenoles y flavonoides totales

Los fenoles y flavonoides son compuestos naturales de las plantas y frutas, que se presenta en distintas formas, y que son considerados promotores de salud.

En este estudio se ha analizado el contenido total de estos compuestos, midiendo su interacción con sustancias conocidas, utilizando un patrón de referencia y métodos espectrofotométricos para su cuantificación.

4.5.1. Fenoles

El ácido gálico es utilizado como estándar para la determinación del contenido en fenol mediante el ensayo con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Los compuestos fenólicos se determinaron mediante el ensayo de reacción de Folin-Ciocalteu, midiendo la absorbancia a 765 nm, utilizando el ácido gálico como patrón para obtener la curva estándar. Los resultados se expresaran en mg de extracto de ácido gálico equivalente (GAE, “*Gallic Acid Equivalent*”) por g de extracto.

4.5.2. Flavonoides

Los flavonoides se determinaron mediante el ensayo de AlCl_3 , midiendo la absorbancia a 510 nm. Se utilizó como referencia un isómero de la catequina, (+)catequina, un fenol que tiene propiedades antioxidantes, para calcular la curva estándar. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de “(+)catequina” (EC) por g de extracto.

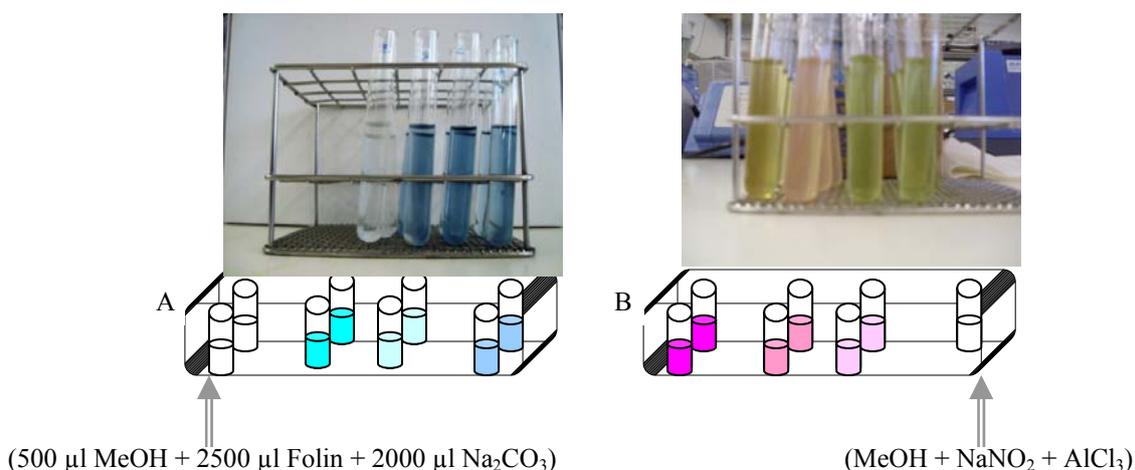


Fig. 27. Ensayo de fenoles (A) y flavonoides (B).

4.6. Parámetros nutricionales

En las muestras fué analizada la composición centesimal en materia seca de proteínas, grasas, hidratos de carbono y ceniza, usando los procedimientos estándar de la AOAC, abreviatura en inglés de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos.

4.6.1. Proteínas

El contenido de proteína en las muestras se calculó por el método de macro-Kjeldahl, un método estándar que mide la cantidad de nitrógeno en las muestras, lo que permite estimar la cantidad de proteínas.

4.6.2. Grasas

El contenido en grasa, como grasa libre después de evaporar el solvente, se determinó mediante la extracción con el solvente éter de petróleo, a partir de una cierta cantidad de la muestra en polvo utilizando un aparato de Soxhlet.

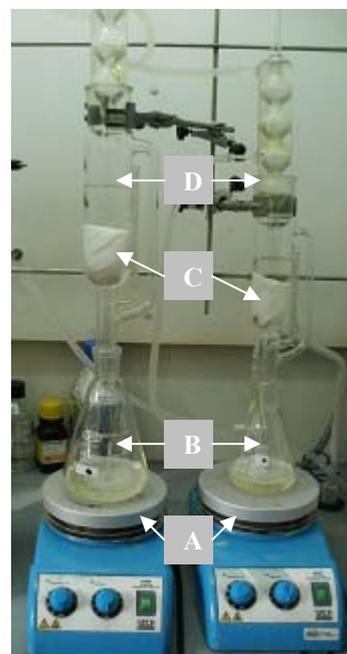


Fig. 28. Columnas de extracción.

4.6.3. Cenizas

El contenido en cenizas se determinó por incineración de las muestras a 600 °C.

La determinación del contenido en cenizas se utilizó para determinar el valor total de carbohidratos por diferencia (Greenfield & Southgate, 2003).

4.6.4. Carbohidratos

Los carbohidratos totales se calcularon por diferencia:

$$m_c = 100 - (m_a + m_m + m_p + m_f) \quad (\text{ec. 10})$$

Siendo en la expresión m_c la masa de carbohidratos total, m_a la masa de ceniza, m_m la humedad, m_p la masa en proteínas y m_f la masa de grasa.

4.6.5. Energía total

La energía total, E, se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$E = 4 \times (E_c + E_p) + 9 E_f \quad (\text{ec. 11})$$

De acuerdo con las referencias, se consideró para la energía de 1 g de carbohidratos, E_c , el valor de 4 calorías, para la energía de 1 g de proteínas, E_p , 4 calorías y para 1 g de grasa, E_f , 9 calorías (Greenfield & Southgate, 2003). Los resultados finales se han presentado en unidades tradicionales, en kcal.

4.6.6. Azúcares

Los diferentes tipos de azúcares presentes en las muestras se determinaron por cromatografía líquida de alto rendimiento, acoplada a un detector de índice de refracción (HPLC-RI, “*High Performance Liquid Chromatography - Refractive Index*”). La identificación se realizó comparando los tiempos de retención relativos de los picos en el cromatograma de la muestra con los patrones. La cuantificación se hizo utilizando un patrón interno y los resultados se expresaron en gramos por 100 g de peso seco (dw, “*dry weight*”).

4.6.7. Ácidos grasos

Los ácidos grasos fueron determinados por cromatografía de gas-líquido con detección por ionización de llama (GC-FID, “*Gas Chromatography - Flame Ionization Detection*”). La identificación de ácidos grasos se realizó comparando los tiempos de retención relativos de los picos del cromatograma de las muestras con los patrones. Los resultados se han expresado en porcentaje relativo de cada ácido graso.

4.6.8. Vitaminas

La vitamina E es un término usado con frecuencia para designar a una familia de compuestos relacionados, los tocoferoles y tocotrienoles, identificados por una letra griega como prefijo y que son importantes antioxidantes lipofílicos, con efectos esenciales en los sistemas vivos contra el envejecimiento, el fortalecimiento del sistema inmunológico y con otros efectos positivos para la salud humana (Barreira *et al.*, 2009).

Los compuestos de tocoferoles fueron identificados por comparación con patrones cromatográficos. Para la cuantificación se utilizó la señal de respuesta de fluorescencia, usando un patrón interno. El contenido de las muestras en tocoferoles se expresó en miligramos por cada 100 gramos de peso en seco.

4.6.9. Ácidos orgánicos

Las muestras se extrajeron por agitación con ácido meta-fosfórico y posteriormente se filtraron. El análisis se realizó por cromatografía UFLC-PDA (*“Ultra Fast Liquid Chromatography - Photodiode array Detection”*). Los ácidos orgánicos identificados fueron cuantificados por comparación del área de sus picos con curvas de calibración obtenidas a partir de patrones comerciales de cada compuesto. La extracción de ácidos se realizó por triplicado y cada muestra se inyectó dos veces en el cromatógrafo. Los resultados se expresaron en mg por g de peso seco.

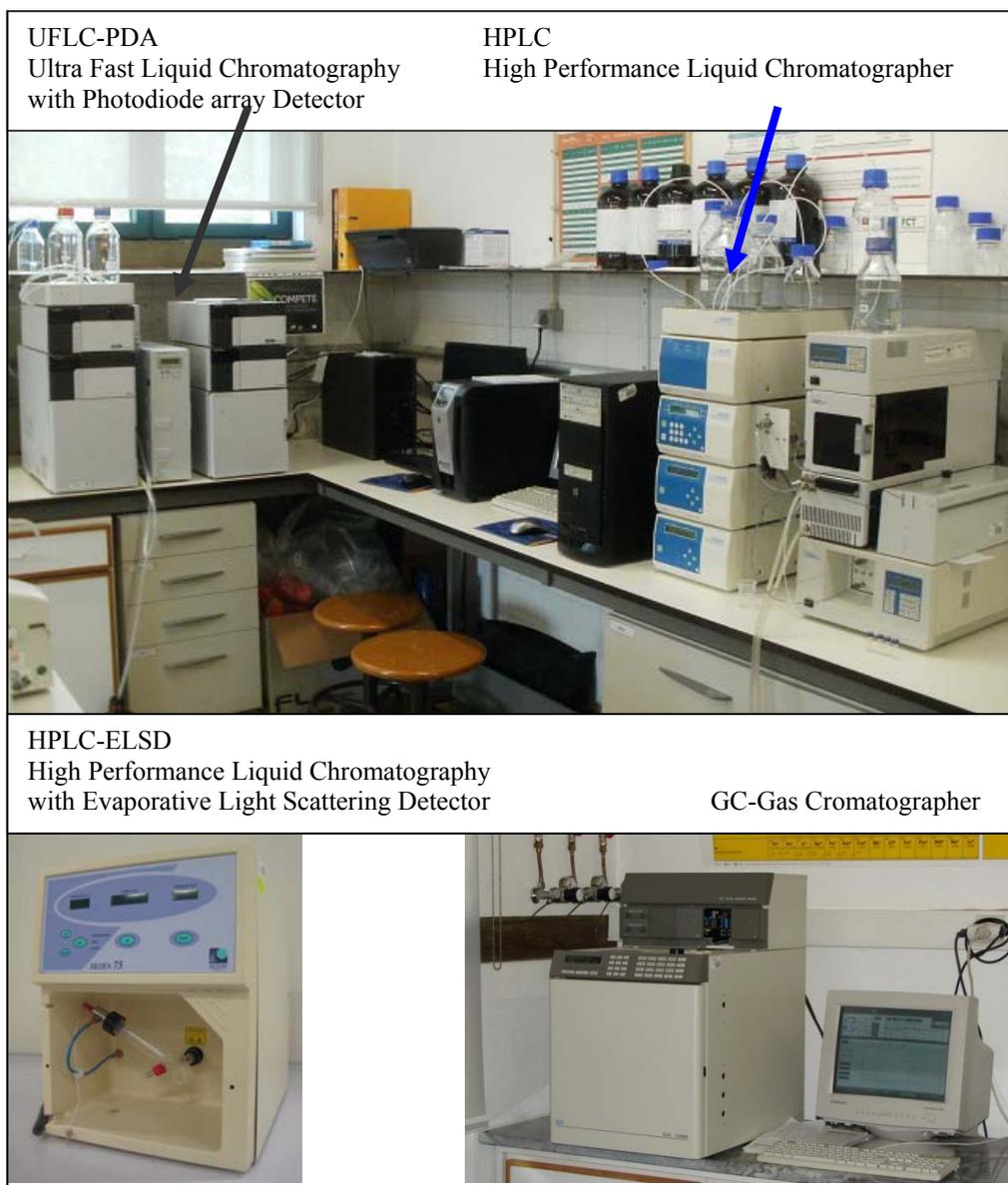


Fig. 29. Aparatos de cromatografía utilizados en el trabajo.

4.6.10. Triglicéridos

Los triacilglicéridos o triglicéridos (TAG) son compuestos formados por glicerol y tres ácidos grasos. Los análisis para detección de TAG se llevaron a cabo utilizando un aparato de cromatografía líquida de alto rendimiento con un detector de dispersión de luz evaporativo (HPLC-ELSD, “*High Performance Liquid Chromatography - Evaporative Light Scattering Detector*”). El detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD, abreviatura del inglés) es una solución adecuada para el análisis TAG, ya que es un detector sensible a la masa y que responde a cualquier analito menos volátil que la fase móvil.

Como referencia, se utilizaron para identificación doce patrones comerciales de TAG: PPP, SSS, LnLnLn, PoPoPo, OOO, LLL, PLL, OLL, PPO, OOS, POL, and POO (Sigma-Aldrich, EE.UU.), en los que las letras de código equivalen a: Po, palmitoleico; L, linoleico; Ln, linolénico; M, mirístico; O, oleico; P, palmítico; S, esteárico. La cuantificación de los picos fue hecha por la normalización interna de área del pico cromatográfico, y los resultados se expresaron en porcentaje relativo, suponiendo que la respuesta del detector en cada análisis es la misma para todos los compuestos.

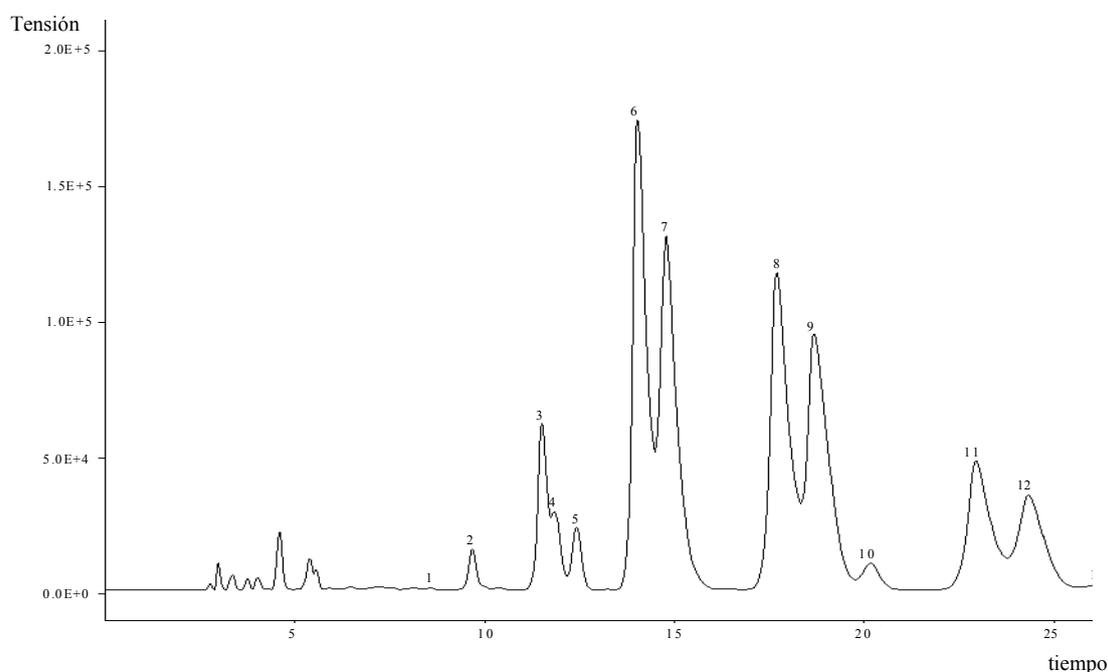


Fig.30. Cromatograma para identificación de sustancias.

4.7. Herramientas estadísticas y análisis de datos

Para el análisis de los datos experimentales se utilizó como herramienta principal el software de IBM SPSS Statistics para Windows (IBM Corp., EE.UU.), con sus paquetes estadísticos integrados. Lo que se explica en esta sección se basa principalmente en la guía del usuario del SPSS (IBM, 2013).

Para analizar las diferencias entre grupos se ha hecho un análisis de varianza (ANOVA). Las variables dependientes se analizaron usando ANOVA con dos factores, que son los principales: "dosis de irradiación" (ID) y "tiempo de almacenamiento" (ST). Cuando se ha detectado una correlación significativa (ID×ST), los dos factores fueron evaluados simultáneamente mediante las medias marginales estimadas (EMM, “*Estimated Marginal Means*”) para todos los niveles de cada factor. Para validación en diferentes variedades (CC) de la irradiación gamma (GI) y por electrones (EB) los factores de correlación analizados fueron (CC×EB y CC×GI) (Carocho *et al.*, 2013b). Para la clasificación de diferencias de perfil de los triacilgliceroles (TAG) en las castañas irradiadas se consideró el factor de dosis por irradiación gamma o por electrones, GID o EBD respectivamente. De otra manera, se distingue entre muestras no irradiadas e irradiadas (Barreira *et al.*, 2013). Si no se ha verificado ninguna correlación estadísticamente significativa, las medias se compararon mediante el test de Tukey.

Además, se utilizó un análisis lineal discriminante (LDA) para evaluar la influencia de los diferentes tiempos de almacenamiento y de las dosis de irradiación en los diferentes grupos de muestras. La técnica LDA de paso a paso, utiliza el método λ de Wilks para añadir o excluir una variable. Este procedimiento utiliza una combinación de selección hacia adelante y procedimientos de eliminación hacia atrás, donde antes de seleccionar una nueva variable a incluir, se verifica si todas las variables seleccionadas anteriormente siguen siendo significativas.

El modelo final se compone de una función discriminante basada en combinaciones lineales de las variables seleccionadas que proporcionan la mejor discriminación entre los grupos. Para verificar que las funciones discriminantes son significativas, se aplica el test de λ de Wilks. Y se ha utilizado un procedimiento de validación cruzada (LOOCV “*leaving-on-out cross validation*”) para evaluar el desempeño del modelo, estimando la precisión con la que el modelo predictivo se ajusta a los datos experimentales. La validación del modelo se realiza no incluyendo uno de los datos del conjunto y repitiendo el procedimiento para todos los datos (Arlot & Celisse, 2010).

Se ha utilizado también el análisis de componentes principales (PCA “*Principal Component Analysis*”), para reconocimiento de patrones en las variables medidas. El método PCA transforma las variables originales medidas en nuevas variables no correlacionadas, llamadas componentes principales. El primer componente principal cubre la mayor cantidad de variación en los datos posibles. El segundo componente principal es ortogonal a la primera y abarca la mayor cantidad de la variación restante posible, y así sucesivamente (Pearson, 1901). El número de dimensiones consideradas en el método PCA se elige con el fin de permitir interpretaciones significativas y que garantiza su fiabilidad.

En este estudio, la herramienta estadística PCA se utilizó para el análisis de la influencia de la irradiación en seis ácidos orgánicos detectados en castañas (Carocho *et al.*, 2013a) y en la validación de la irradiación gamma y de electrones para diferentes variedades (Carocho *et al.*, 2013b).

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valores medios con desviación estándar (SD).

El análisis estadístico de los datos se realizó a un nivel de significación del 5%.

5. Resultados

Las tecnologías de procesamiento de alimentos, por irradiación gamma o con electrones, deben permitir el mantenimiento integral de las propiedades de los alimentos, para cumplir con los requisitos de calidad. El efecto de la irradiación sobre los parámetros de calidad de los alimentos de las variedades europeas se validó por primera vez para la radiación gamma (Antonio *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2011a; Barreira *et al.*, 2012; Antonio *et al.*, 2012a), siendo objeto de una revisión comparativa de los resultados con otros autores para otras variedades de castañas (Antonio 2012a), y más recientemente para la radiación con electrones (Carocho *et al.*, 2012a; Carocho *et al.*, 2012b; Barreira *et al.*, 2013; Carocho *et al.*, 2013a; Carocho *et al.*, 2013b).

En estas frutas el contenido en agua representa cerca de 50% y los hidratos de carbono aproximadamente 46%. En materia seca, la sacarosa es el azúcar principal, presentando aún cantidades bajas de glucosa y fructosa. También se detectaron los oligosacáridos trehalosa y rafinosa. Los ácidos grasos más abundantes son el palmítico, oleico, linoleico y linolénico, en que γ -tocoferol es la isoforma principal de los tocoferoles, seguido a distancia por δ -tocoferol y α -tocoferol.

El análisis de los efectos de la radiación gamma y de electrones en las castañas se extendió a varios de sus componentes. Este estudio se centró en los componentes principales de la castaña: azúcares - sacarosa; ácidos grasos - palmítico, oleico, linoleico y linolénico; tocoferoles - γ -tocoferol; aporte energético; y composición centesimal (materia seca, proteínas, grasas, carbohidratos y cenizas), de muestras irradiadas y no irradiadas (control), que se almacenaron a 4 °C durante diferentes períodos, con el fin de comprender las posibles interacciones entre estos dos factores, irradiación y tiempo de almacenamiento.

El componente principal en los alimentos es el agua, seguido de hidratos de carbono, proteínas y lípidos. Los componentes menores incluyen vitaminas y minerales (Greenfield & Southgate, 2003). En la interacción de la radiación con el agua, que está presente en todos los tipos de alimentos, ocurre un proceso de radiólisis del agua y se produce la formación de un catión H_2O^+ que se disocia en radicales de alta reactividad, $\text{H}^* + \text{OH}^*$, y que van a reaccionar con otros componentes de los alimentos o recombinarse para generar la especie estables H_2 y H_2O_2 o H_2O (Miller, 2005).

El rendimiento de estos procesos, “valor de G”, se expresa como el número de entidades por 100 eV o, en unidades del SI, en moles J^{-1} . El valor de G, en unidades

tradicionales, para las especies reactivas e^- , OH^* , H^* son 2.7, 2.7, 0.6, respectivamente, lo que indica su importancia relativa como precursores de otros procesos reactivos (WHO, 1999).

Tab. 1. Composición media aproximada de la *Castanea sativa* Mill.

Composición (en g/100 g de material seca)					
Materia seca	Grasa	Proteínas	Cenizas	Hidratos de Carbono	Sacarosa
50	2	4	2	92	20
Ácidos grasos principales (in %)					
C16:0 - palmítico	C18:1 - oleico	C18:2 - linoleico		C18:3 - linolenico	
15	25	50		8	
Ácidos orgánicos (mg/100 g de materia seca)					
Oxálico	Quínico	Málico	Ascórbico	Cítrico	Fumárico
0,7	13	5	1,2	12	0,4
Tocoferoles (μ g/100 g de materia seca)					
α -tocoferol		γ -tocoferol		δ -tocoferol	
6		1000		40	
Fenoles (mg GAE/g extract)			Flavonoides (mg CE/g extract)		
4			2		

Valores medios para castañas no irradiadas de origen Portuguesa.

El electrón hidratado, e^- , es un fuerte agente reductor y el radical hidroxilo, OH^* , es un potente agente oxidante, responsables de las reacciones de reducción y oxidación en los compuestos de los alimentos.

Los hidratos de carbono son una fuente importante de energía e incluyen azúcares, almidón y compuestos relacionados. Estas moléculas son una cadena de átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, en la que una de las principales consecuencias de la radiación es la ruptura de los enlaces carbono-hidrógeno (C-H) y la interrupción de enlaces éter (–O–) (WHO, 1999). Sin embargo, la degradación con la radiación de hidratos de carbono se considera un mecanismo complejo por la presencia de otros constituyentes en los alimentos, ya que estos pueden ejercer un efecto protector durante la irradiación (Stewart, 2001).

5.1. Efectos en los parámetros físicos

Los efectos de la irradiación gamma y de electrones sobre los parámetros físicos, a los que se hace una breve referencia aquí, fueron objeto de publicación en actas de conferencia y en revistas no indexadas en el ISI Web of Knowledge. Y, como tal, no se incluye en esta monografía, pero están accesibles a partir de la lista de referencias presentada en esta introducción, y que consta en la parte principal de la tesis, en inglés.

Respecto al color, no se observaron cambios significativos para las variedades portuguesa y turca en la cáscara (piel exterior), frutas peladas y interior de las frutas (cortadas a medio), con las dosis de irradiación y con el tiempo de almacenamiento (Antonio *et al.*, 2011b; Antonio *et al.*, 2011c). Se obtuvieron resultados similares con irradiación por electrones para las variedades procedentes de Portugal e Italia, monitoreadas durante un período más largo de almacenamiento, 60 días (Antonio *et al.*, 2013b). En cuanto a la textura, se observó una tendencia de ablandamiento significativo sólo para dosis superiores a 3 kGy, representado en el diagrama de cajas, Fig. 1 (Antonio *et al.*, 2013a).

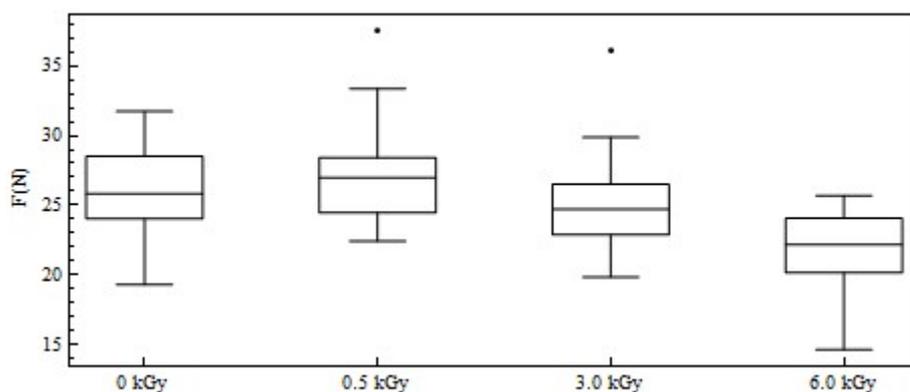


Fig.31. Variación en la textura de las castañas con la dosis de radiación gamma.

Esta disminución de la textura (dureza) se puede explicar como una posible ruptura por la radiación de la microestructura (Yu & Wang, 2007) o ablandamiento del tejido debido a la rotura de las paredes celulares (Kovács & Keresztes, 2002; Nayak *et al.*, 2007).

Otro parámetro importante en la calidad de las frutas frescas es la pérdida de agua después de la cosecha y durante el almacenamiento. Basándonos en las características de las castañas y en imágenes de tomografía computarizada, se utilizó un modelo de compartimentos de transferencia de masa para caracterizar la cinética de la deshidratación de castañas sometidas a irradiación gamma, llegando a la conclusión de

que las curvas de deshidratación de las muestras irradiadas hasta 6 kGy fueron similares a las de las castañas no irradiadas (Antonio *et al.*, 2012b).

5.2. Efectos en los parámetros químicos y bioactivos

El estudio de los efectos de conservación por irradiación en los parámetros químicos y bioactivos de la castaña se iniciaran a dosis bajas (0,25 y 0,50 kGy) para la radiación gamma (Antonio *et al.*, 2011a; Fernandes *et al.*, 2011a), y posteriormente a dosis hasta 3 kGy, en los componentes principales de castañas con origen en Portugal (Fernandes *et al.*, 2011b) y en Turquía (Barreira *et al.*, 2012).

La irradiación con electrones se ha iniciado en dosis hasta 3 kGy (Carocho *et al.*, 2012a; Barreira *et al.*, 2013) y se ha extendido hasta 60 días de almacenamiento y a la dosis de 6 kGy (Carocho *et al.*, 2013a; Carocho *et al.*, 2013b).

Finalmente, se ha extendido la validación de este proceso de conservación a tres variedades de *Castanea sativa* de origen portuguesa y a una variedad de origen italiana, comparando el efecto de dos tipos de radiación, gamma y electrones, y ahora no considerando el efecto del tiempo de almacenamiento, por ser conocido su efecto dominante en las alteraciones observadas.

El estudio, de los efectos de la irradiación gamma y con electrones ha finalizado con la validación de un método innovador de identificación de castañas irradiadas, utilizando como marcador el perfil de los triacilgliceroles (TAG) (Barreira *et al.*, 2013).

5.3. Efectos en los parámetros bioactivos

5.3.1. Actividad antioxidante

El análisis estadístico de los resultados muestran que la correlación tiempo de almacenamiento y dosis de irradiación (ST×ID) fue una fuente de variación significativa ($p < 0,001$) para todos los ensayos de actividad antioxidante realizados con la radiación gamma. Por lo tanto, no se realizaron comparaciones múltiples.

Todavía, los resultados se evaluaron mediante un análisis discriminante lineal (LDA, “*Linear Discriminat Analysis*”), para verificar cuáles las variables más discriminantes en los distintos ensayos realizados, con respecto a contenidos en antioxidantes de compuestos bioactivos, demostrando la influencia del tiempo de almacenamiento en la actividad antioxidante y disponibilidad de compuestos bioactivos. Al contrario, la dosis de irradiación presenta mucho menor poder discriminante (Antonio *et al.*, 2011a). Estos resultados ponen de relieve la mayor influencia del

tiempo de almacenamiento en la actividad antioxidante y en la disponibilidad de compuestos bioactivos, cuando en comparación con la dosis de irradiación utilizada.

Los resultados obtenidos indican así que el uso de la radiación gamma parece preservar el potencial antioxidante de las frutas y las cáscaras (Antonio *et al.*, 2011a).

En el estudio comparativo de los efectos de la radiación gamma y con electrones se ha concluido que las muestras irradiadas revelaron una actividad antioxidante más alta, valores de EC₅₀ inferiores, do que las muestras control. Del estudio comparativo gamma y electrones se puede concluir también que, las dosis más indicadas para mantener el contenido de antioxidantes fueron 1 y 3 kGy, para electrones y radiación gamma, respectivamente (Carocho *et al.*, 2012a).

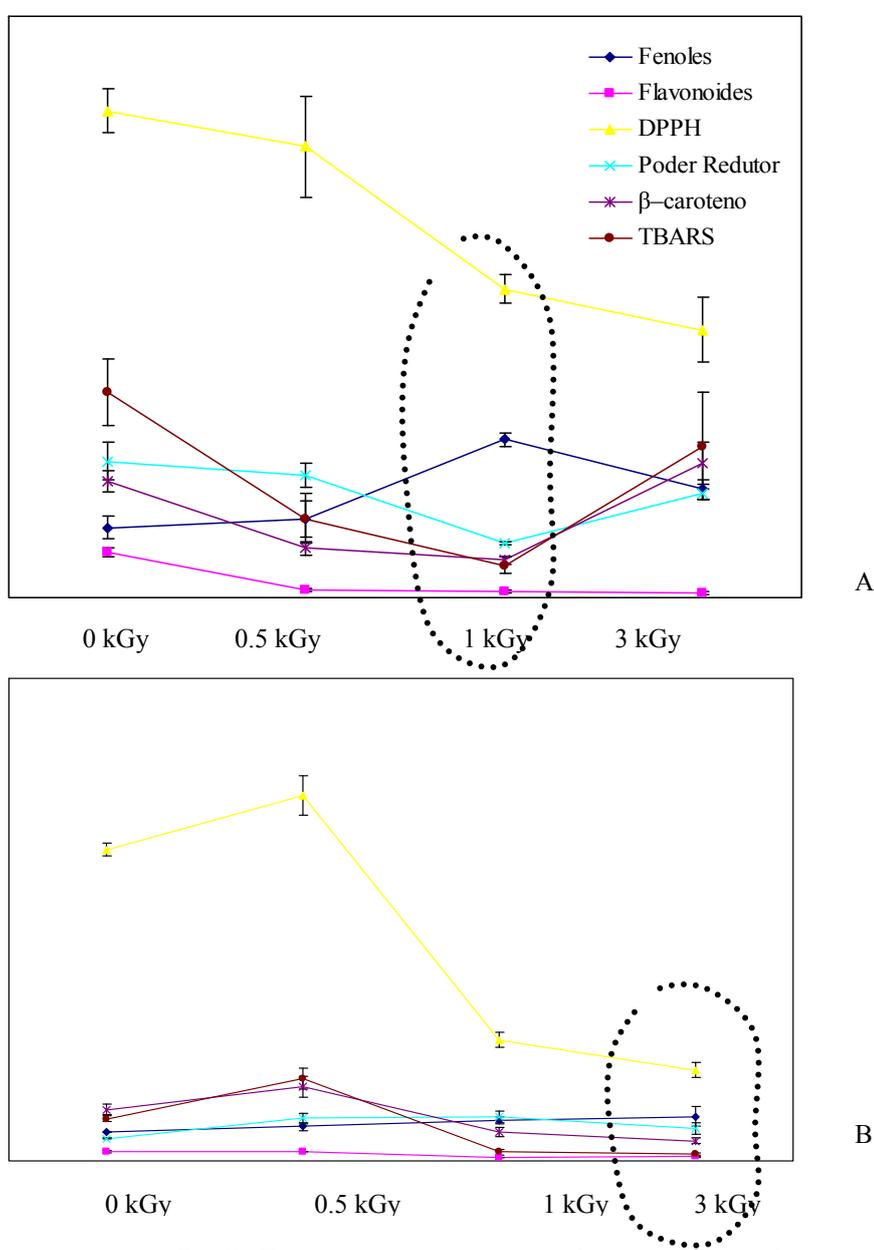


Fig.32. Efecto relativo de la irradiación en distintos parámetros. (A- electrones, B- gamma)

5.3.2. Fenoles y flavonoides totales

Los fenoles consisten en un grupo hidroxilo (—OH) unido directamente a un grupo aromático y los flavonoides son polifenoles, un grupo de fenoles. Estos compuestos están presentes en plantas y frutos, en diferentes formas, y están identificados como promotores de salud (Carocho *et al.*, 2014).

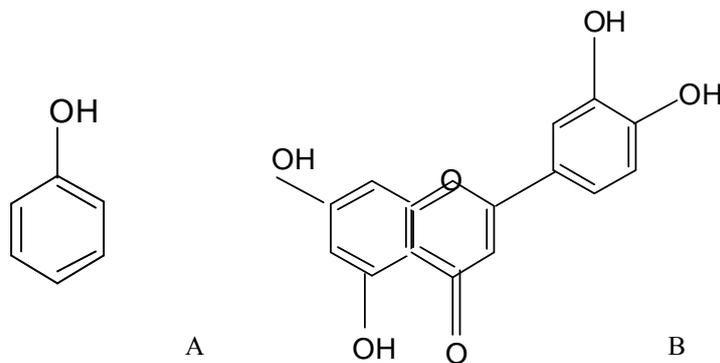


Fig. 33. Estructura molecular de fenoles (A) y de flavonas (polifenoles) (B).

Se estudiaron los efectos de la radiación gamma y de electrones en los compuestos fenólicos (Antonio *et al.*, 2011a; Carocho *et al.*, 2012a), se comprobando que el tiempo de almacenamiento tuvo una influencia mucho mayor en su contenido, mientras que la radiación ha tenido un efecto menor en el contenido total de estos compuestos.

En las castañas, la piel (interior) y cáscara (exterior) presentan mayor contenido fenólico y en flavonoides así como actividad antioxidante más alta, valores más bajos de EC_{50} que los frutos (Antonio 2011a).

Se ha verificado que las muestras irradiadas conservan el contenido total de compuestos fenólicos, pero no en flavonoides (Carocho *et al.*, 2012a).

5.4. Efectos en los parámetros nutricionales

5.4.1. Azúcares

Los azúcares son un buen indicador de calidad de conservación (Kazantzis *et al.*, 2003). Se ha medido el contenido en fructosa, glucosa, sacarosa, rafinosa y azúcares totales en las castañas (Carocho 2012a).

La irradiación, en particular, es conocida por causar varios cambios en azúcares, como la disminución del punto de fusión y el efecto Browning (pardeamiento enzimático). En castañas, varios estudios indican la ausencia de efectos notables de la irradiación en su composición, ya sea con radiación gamma (Iwata & Ogata, 1959; Guo-

xin *et al.*, 1980; Fernandes *et al.*, 2011a; Fernandes *et al.*, 2011b) o con electrones (Carocho *et al.*, 2012b; Carocho *et al.*, 2013b). De hecho, las principales diferencias en los perfiles de los azúcares resultaron del efecto del tiempo de almacenamiento, en línea con lo observado para otros parámetros nutricionales. La sacarosa y los azúcares totales fueron más bajos en las muestras no irradiadas, y la rafinosa sólo se detectó en muestras irradiadas (Carocho *et al.*, 2012a).

5.4.2. Grasas

Los lípidos son grasas compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno. En las castañas, la grasa representa menos del 2%.

Los ácidos grasos se clasifican en saturados (SFA, “*Saturated Fatty Acids*”), monoinsaturados (MUFA, “*Monounsaturated Fatty Acids*”), y poliinsaturados (PUFA, “*Polyunsaturated Fatty Acids*”), con más de un enlace doble. Los ácidos insaturados, con enlace dobles, son más inestables que los ácidos grasos saturados, sin enlaces dobles, que tienen el número máximo de hidrógenos unidos a los carbonos.

El mecanismo general de radiolysis en los lípidos se explica con divisiones en posiciones cercanas al grupo carbonilo (– O – C = O –), pero también puede ocurrir en otras conexiones de la cadena principal. La radiólisis en grasas naturales es, sin embargo, más compleja que en los modelos, debido a la presencia de un gran número de ácidos grasos y su distribución en el alimento (Stewart, 2001).

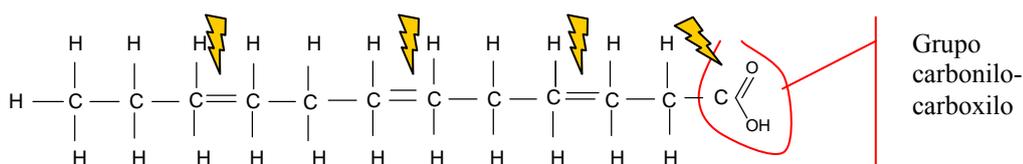


Fig. 34. Estructura de los ácidos grasos insaturados y posiciones más radiosensibles.

Las normas para la detección de alimentos irradiados que contienen grasa consideran que, durante la irradiación, el enlace acil-oxígeno en los triglicéridos, se quiebra y que esta reacción podría dar lugar a la formación de 2-alkilciclobutanonas, 2-dodecilciclobutanona (DCB) y 2-tetradecilciclobutanona (TCB) (EN1785:2003).

En las castañas se han identificado cerca de 20 ácidos grasos, algunos en cantidades residuales. Los principales ácidos grasos presentes en las castañas son el ácido palmítico, ácido oleico y ácido alfa-linolenico (Barreira *et al.*, 2012).

En las castañas, las diferencias en los perfiles de ácidos grasos son en su mayoría debido al efecto del tiempo de almacenamiento, mientras que el tratamiento de irradiación provocó sólo alteraciones leves, cuando se utiliza radiación gamma (Fernandes *et al.*, 2011a; Fernandes *et al.*, 2011b; Barreira *et al.*, 2012; Carochó *et al.*, 2013b), o con electrones (Carochó *et al.*, 2012b; Carochó *et al.*, 2013a).

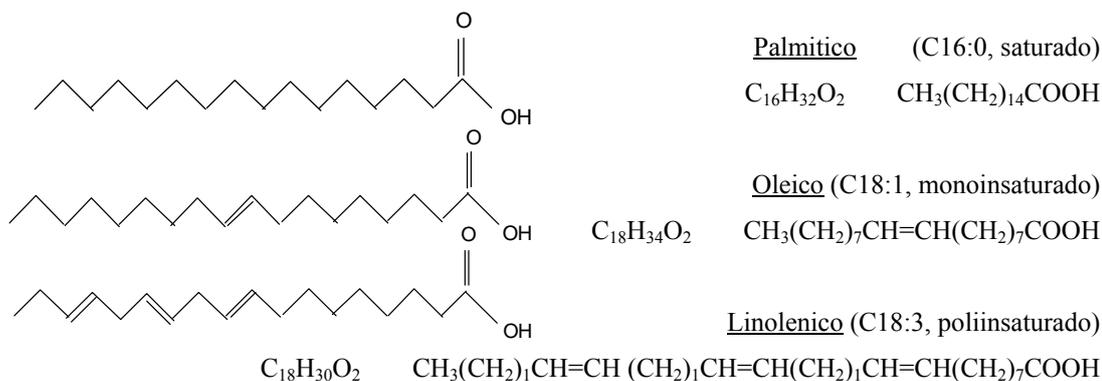


Fig. 35. Algunos ácidos grasos presentes en las castañas.

En las castañas de origen turca, los ácidos láurico, palmitoleico y linolénico fueron los únicos ácidos grasos que sufrieron algunas diferencias con la radiación.

A pesar de los efectos particulares en algunos ácidos grasos individuales, en que algunas de las concentraciones fueron influenciadas por uno de los dos factores, radiación o tiempo, las cantidades totales de ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) no fueron afectadas, ya sea mediante el almacenamiento o con la irradiación (Fernandes *et al.*, 2011a).

5.4.3. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos juegan un papel importante en el metabolismo de los seres humanos y plantas, como potentes antioxidantes, siendo también utilizados en preparaciones farmacéuticas (Carochó *et al.*, 2013b). Estos compuestos son moléculas de bajo peso, con la estructura general R-COOH, un grupo carboxílico conectado a un radical.

En este estudio, se registraron los efectos de la irradiación con electrones y con el tiempo de almacenamiento en varios ácidos orgánicos: ácido oxálico, ácido quínico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido succínico y ácido siquímico, usando un sistema de cromatografía líquida con detección por fotodiodos (UFLC-PDA, “Ultra Fast Liquid Chromatography - Photodiode Array”).

Para el análisis estadística de la influencia de la irradiación en seis ácidos orgánicos detectados en las castañas se utilizó el análisis de componentes principales (PCA - "Principal Component Analysis"). Los resultados obtenidos indican que las dos primeras dimensiones representan la mayor parte de la varianza de todas las variables cuantificadas (46,2% y 26,1%, respectivamente). Sin embargo, los marcadores correspondientes a 0, 30 y 60 días no se separaron en grupos bien definidos. Y que la distribución espacial de los marcadores resultantes de diferentes dosis de irradiación es aún más entrópica, como por ejemplo en las muestras irradiadas con 6 kGy, que están en la misma zona del gráfico de las muestras no irradiadas (Carocho *et al.*, 2013a).

Los resultados muestran así que la variación causada por las dosis de irradiación ensayadas es pequeña, no permitiendo la indicación de cualquier tendencia particular.

Ni la dosis de irradiación, ni el tiempo de almacenamiento parecen ejercer gran influencia en el perfil individual y total de los ácidos orgánicos. Concluyendo que, en acuerdo con los parámetros anteriores, los ácidos orgánicos no son muy afectados por la radiación gamma (Carocho *et al.*, 2013b) o por electrones (Carocho *et al.*, 2013a; Carocho *et al.*, 2013b).

El mantenimiento de los niveles de ácido orgánico es una característica deseable debido a su papel protector contra diversas enfermedades, principalmente en las que tienen por base un estrés oxidativo (Silva *et al.*, 2004a). Desde el punto de vista de la conservación, estos resultados son interesantes ya que la naturaleza y la concentración de ácidos orgánicos son factores importantes que influyen en las características organolépticas de calidad de las frutas y hortalizas, es decir en su sabor (Vaughan & Geissler, 1997) y constituyen también indicadores importantes de conservación para evaluar el procesamiento en alimentos (Silva *et al.*, 2004b).

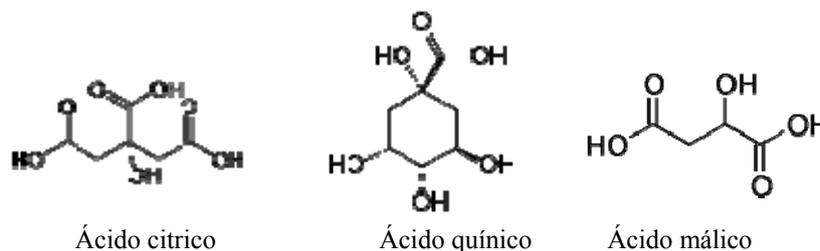


Fig. 36. Estructura de algunos ácidos orgánicos detectados en las castañas.

5.4.4. Proteínas

Las proteínas son macromoléculas y se consideran buenos indicadores del efecto de la irradiación, debido a las reacciones de degradación, con la quiebra de los enlaces

C-N en la cadena principal del polipéptido, y debido a cambios físicos como en el enrollado y agregación de proteínas (Stewart, 2001).

Sin embargo, el hecho de que la irradiación pueda alterar proteínas no crea un problema significativo desde el punto de vista nutricional puesto que los componentes esenciales, los aminoácidos, pueden sobrevivir al proceso de irradiación protegidos dentro de la compleja estructura de la proteína (Stewart, 2001).

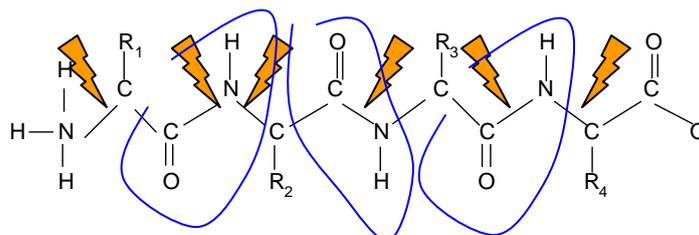


Fig. 37. Posiciones más radiosensibles en un polipéptido.

En el contenido de proteínas en las castañas, la correlación tiempo de almacenamiento y dosis de irradiación, $ST \times ID$, fue una importante fuente de variación, no permitiendo comparaciones múltiples (Fernandes *et al.*, 2011b; Carocho *et al.*, 2012b). Para las variedades procedentes de Turquía, donde no se ha observado esta interacción, la irradiación o el tiempo de almacenamiento no parecen ejercer un efecto significativo en este parámetro (Barreira *et al.*, 2012).

5.4.5. Vitaminas

Las vitaminas son un grupo de sustancias químicas esenciales en varios procesos metabólicos en los seres vivos, representando una pequeña parte del contenido de los alimentos y, como moléculas de bajo peso molecular, son teóricamente menos propensas a ser afectadas por la irradiación a dosis bajas o medianas (Miller, 2005). Sin embargo, el procesamiento de alimentos por irradiación provoca la degradación de algunas vitaminas que son más radiosensibles, pero lo mismo sucede en los tratamientos térmicos de alimentos (Nazzaro *et al.*, 2011).

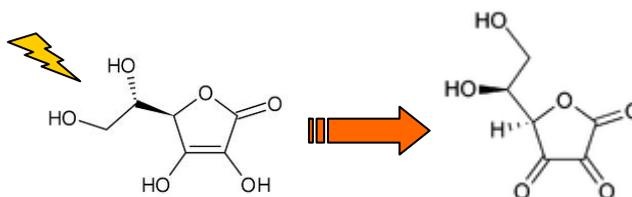


Fig. 38. Degradación por radiación del ácido ascórbico en ácido dehidroascórbico.

Aunque las pérdidas de vitaminas generalmente aumentan con el aumento de la dosis, la irradiación de alimentos con dosis altas a menudo requiere condiciones de procesamiento que minimicen los efectos sensoriales indeseables, condiciones que también contribuyen a una reducción en las pérdidas de vitaminas (WHO, 1999).

La vitamina E es un término usado con frecuencia para designar a una familia de compuestos relacionados, los tocoferoles y tocotrienoles, identificados por una letra griega como prefijo y que son importantes antioxidantes lipofílicos, con efectos esenciales en los sistemas vivos contra el envejecimiento, el fortalecimiento del sistema inmunológico y con otros efectos positivos para la salud humana (Barreira *et al.*, 2009).

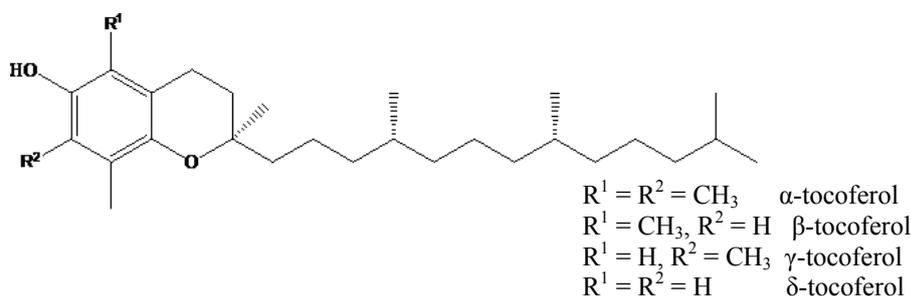


Fig. 39. Estructura molecular de los tocoferoles.

Se han estudiado algunos compuestos bioactivos en las castañas sometidas a irradiación, midiendo el contenido en los tocoferoles más abundantes detectados en castañas: α -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol.

El perfil de tocoferoles se estudió en muestras irradiadas con gamma (Fernandes *et al.*, 2011a; Fernandes *et al.*, 2011b; Barreira *et al.*, 2012; Carochó *et al.*, 2013b) y con electrones (Carochó *et al.*, 2012b; Carochó *et al.*, 2013b), revelando cambios con el tiempo de almacenamiento, en especial a los 60 días, mientras que la irradiación ha ejercido un efecto protector.

Comparando el cromatograma de una muestra no irradiada con una muestra irradiada a bajas dosis con radiación gamma, se pudo ver una tendencia de contenido superior en tocoferoles en las muestras irradiadas con respecto a las muestras control, no irradiadas (Fernandes *et al.*, 2011a). En los ensayos con electrones, hasta 6 kGy, no se ha observado ningún cambio estadísticamente significativo (Carochó *et al.*, 2012a).

5.4.6. Energía total

La energía total o valor nutricional es una medida indirecta del contenido en grasa, carbohidratos y proteínas (apartado 4.6.5.).

En las castañas irradiadas y almacenadas, cuando ha sido posible clasificar por separado la influencia de uno de los factores, se observaron diferencias estadísticas detectables en el valor de la energía total solo con el tiempo de almacenamiento (Barreira *et al.*, 2012; Carochó *et al.*, 2012b).

5.4.8. Triglicéridos

En las normas europeas de detección de alimentos irradiados (EN1785:2003) se definen métodos de detección de alimentos irradiados conteniendo grasas, con base en los subproductos de los TAG, la dodecilciclobutanona (DCB) y la tetradecilciclobutanona (TCB), para verificación por parte de las autoridades alimentarias la detección de alimentos irradiados, para un etiquetado conforme determina la legislación.

La utilización de métodos de detección de productos alimenticios irradiados son una imposición legal y algunos países, incluyendo en los países de la Unión Europea, imponen el correcto etiquetado en alimentos irradiados (E.U., 1999a).

Para cumplir con este requisito se utilizan varias normas para detectar si un producto fue irradiado o no, con base en alteraciones residuales biológicas, físicas o químicas del producto procesado. Presentemente, existen diez normas europeas (CEN, 2012), que han sido incluidas en la Norma General para Alimentos irradiados del *Codex Alimentarius* (Codex, 2003). Dependiendo del tipo de alimento y del parámetro analizado, uno o varios métodos de detección se pueden utilizar, agrupados en métodos físicos, químicos, biológicos y de ADN (Stewart, 2001).

Considerando que los diferentes métodos tienen particularidades y limitaciones específicas, deben ser validados para el producto alimenticio irradiado donde se supone que se aplicará.

De los diferentes métodos disponibles en las normas se han probado en castañas los métodos: DNA (“*DNA Comet Assay*”); ESR (“*Electron Spin Resonance*”); PSL (“*Photostimulated Luminescence*”); y TL (“*Thermoluminescence*”), por diferentes autores, utilizando en los experimentos castañas sometidas a irradiación gamma (Antonio *et al.*, 2012a). De estos, solo los métodos PSL en castañas de origen asiática (Chung *et al.*, 2004) y el método TL en castañas de origen europea (Mangiacotti *et al.*, 2009), han sido completamente validados.

Recientemente, se ha utilizado el perfil en triacilglicéridos (TAG) de la castaña, medidos por detección de cromatografía líquida de alto rendimiento con un detector de

dispersión de luz evaporativo (HPLC-ELSD, “*High Performance Liquid Cromatography - Evaporative Light Scattering Detector*”), como método viable de detección, validado en castañas irradiadas con gamma y con electrones (Barreira *et al.*, 2013).

Los métodos de detección de alimentos irradiados validados en castañas con radiación gamma y con electrones (“*e-beam*”), por diferentes autores, se presentan en la Tab. 2.

Tab. 2. Métodos validados en identificación de castañas irradiadas.

Especie	gamma	e-beam	Referencia
<i>Castanea bungena</i>	TL	---	Chung <i>et al.</i> (2004)
<i>Castanea sativa</i>	TL	---	Mangiacotti <i>et al.</i> (2009)
	TAG	TAG	Barreira <i>et al.</i> (2013)

TAG - Triacilglicerol; TL - Termoluminiscencia.

Las celdas en blanco se refieren a estudios realizados por el autor de la tesis y co-autores.

Las celdas en gris representan estudios de otros autores.

En la evaluación de la composición en triglicérols (TAG), se detectaron cambios significativos cuando se sometieron las castañas a irradiación gamma o con electrones, especialmente para las dosis de 1 y 3 kGy (Barreira *et al.*, 2013).

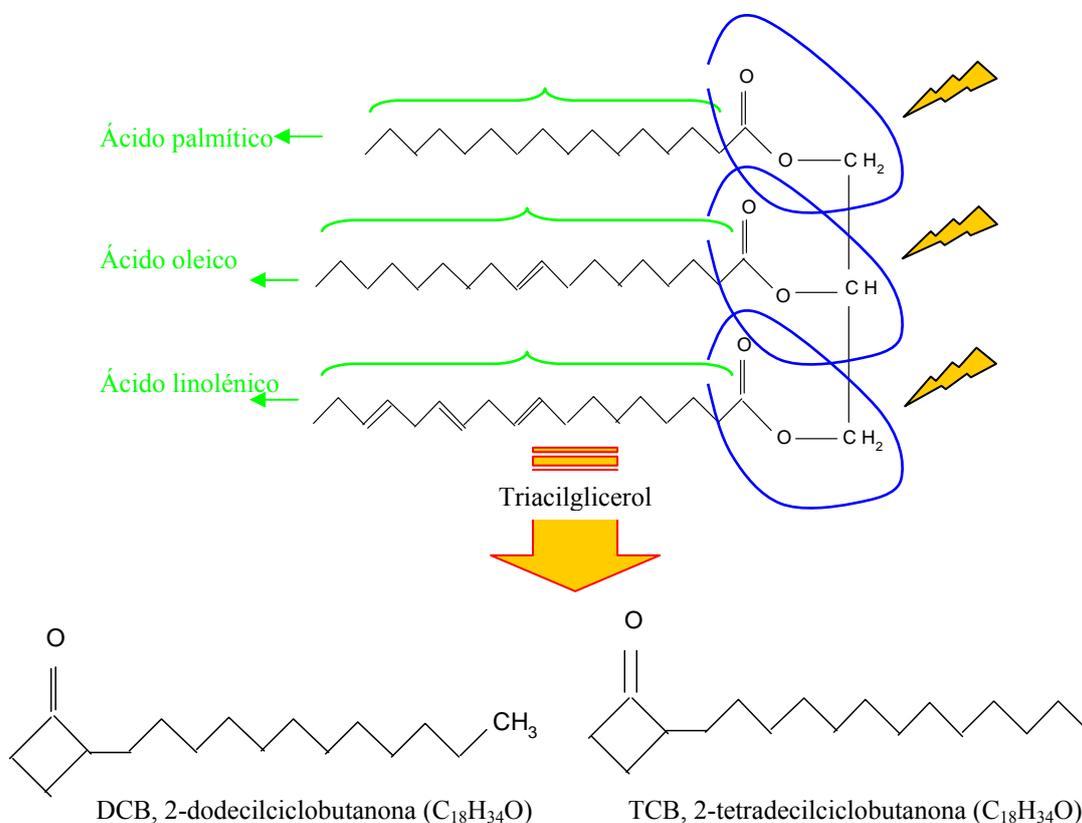


Fig. 40. Degradación de triacilglicerol con la radiación.

En general, ya pesar de que no se pudo realizar comparaciones múltiples en la mayoría de los casos, debido a la correlación significativa entre los factores tiempo de almacenamiento (ST) e irradiación gamma (GID) o electrones (EBD), ni EBD ni GID parecen inducir cambios apreciables en los perfiles de TAG.

Aún así, con el fin de obtener una idea más realista acerca de la influencia de los tratamientos de irradiación, los resultados se analizaron mediante un análisis discriminante lineal (LDA, “*Linear Discriminant Analysis*”). El análisis se realizó teniendo en cuenta la irradiación aplicada y la dosis (gamma, GID; electrones, EBD). Los factores analizados fueron: ST, “*storage time*”, tiempo de almacenamiento; EBD, “*e-beam irradiation dose*”, electrones; GID, “*gamma irradiation dose*”, dosis de irradiación gamma.

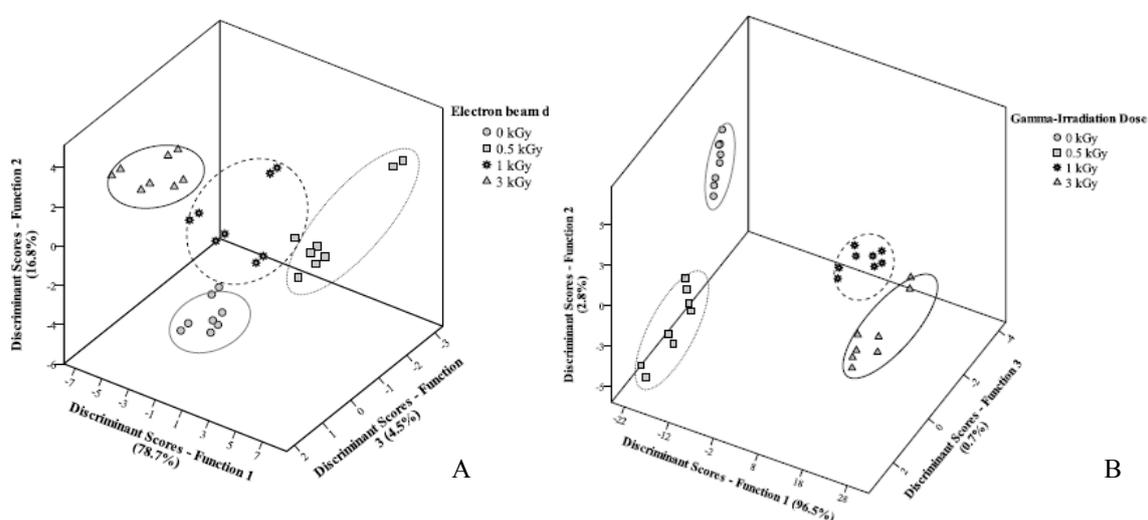


Fig. 41. Análisis discriminante lineal de triacilglicerol en castañas irradiadas. (A – electrones, B – gamma).

En contra a lo que se podría esperar de los valores medios, las diferencias en los perfiles de TAG permitió la correcta clasificación de 100,0% de las muestras, ya sea en EBD como en GID; con respecto a la validación cruzada (“*cross-validation*”- ver apartado 4.7), 100% de las muestras fueron correctamente clasificadas por GID, mientras que el 96,9% fueron clasificadas correctamente para EBD (una muestra irradiada con 0,5 kGy fue clasificada como no irradiada).

Todavía, los cambios en los perfiles de TAG fueran en su mayoría cualitativos, lo que esta en acuerdo con resultados anteriores (Fernandes *et al.*, 2011a; Fernandes *et al.*, 2011b; Barreira *et al.*, 2012) para dosis de irradiación similares, mostrando que los perfiles en ácidos grasos no fueron afectados; es decir, no se observó una disminución

de los ácidos grasos, sino más bien un reordenamiento dentro de la molécula de glicerol. Estos cambios, sin embargo, no es probable que afecten las características organolépticas de las castañas, ya que el contenido en grasa es inferior a 1% (Fernandes *et al.*, 2011a).

5.4.9. Minerales

El contenido en minerales de las castañas representa menos del 1%. Se considera que el procesamiento por irradiación no altera la composición elemental de los alimentos (Stewart, 2001). Otros autores, utilizando tratamientos térmicos, han dado cuenta de cambios del contenido en minerales en castañas (Nazzaro *et al.*, 2011).

6. Tablas resumen

Con el fin de reunir toda la información con respecto a la irradiación y su influencia en diversos parámetros de las castañas y sus plagas, fue previamente publicada una revisión del estado de arte relativa a la radiación gamma (Antonio *et al.*, 2012a).

Se hace ahora aquí una actualización de esa información, para incluir también el efecto del de los electrones en los principales parámetros físico-químicos de la castaña.

Se presenta en la Tab.3 las especies y dosis ensayadas por diferentes autores y en la Tab. 4 los parámetros físico-químicos estudiados por los diferentes autores, con radiación gamma o con electrones (“*e-beam*”).

Estudios previos acerca de los efectos físico-químicos de la irradiación en castañas se realizaron solo en las variedades asiáticas, en *Castanea crenata* y en *Castanea molissima*, con excepción de un estudio en la especie europea de *Castanea sativa*, solo para la validación de los métodos de detección de alimentos irradiados. En todos estos ensayos se ha utilizado radiación gamma (Antonio *et al.*, 2012a).

Con electrones solo hay un estudio de su efecto en insectos presentes en castañas de origen asiática (Todoriki *et al.*, 2006) y nada consta acerca de su efecto en los parámetros físico-químicos de las castañas, de cualquiera origen.

En los estudio realizados y resumidos en las tablas, se han llevado a cabo ensayos con radiación gamma y con electrones en castañas de origen europea (Portugal, Turquía, Italia) y de diferentes variedades (Judia, Longal, Cota, Palummina), estudiando su efecto en los parámetros físicos (color, textura, deshidratación) y químicos (bioactivos y nutricionales).

En la validación de los dos tipos de radiación para las distintas variedades, se verificó que a pesar de las diferencias detectadas entre las características de algunas variedades, se ha observado que, mayoritariamente, la irradiación no causó alteraciones significativas en los parámetros químicos (Carocho *et al.*, 2013b).

Tab. 3. Castañas irradiadas (especie, origen y dosis).

Radiación gamma		
Especie y origen	Dosis	Referencia
<i>Castanea crenata</i> Siebold & Zucc. (Japón)	0.03, 0.07, 0.12 kGy at 0.7 Gy s ⁻¹	Iwata <i>et al.</i> (1959)
	0.25, 0.5, 1, 10 kGy	Kwon <i>et al.</i> (2004)
	0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1 kGy at 0.40 kGy h ⁻¹	Imamura <i>et al.</i> (2004)
<i>Castanea mollissima</i> Blume (China)	0.1, 0.15, 0.2 kGy	Iwata <i>et al.</i> (1959)
	0.3, 0.6, 0.9, 1.2 kGy	Guo-xin <i>et al.</i> (1980)
	0.25, 0.5, 1 kGy	
<i>Castanea Bungena</i> Blume (Corea)	0.1, 0.15, 0.25, 0.5 kGy	Chung <i>et al.</i> (2004)
	0.15, 0.25, 0.35, 0.50, 1 kGy at 16 Gy min ⁻¹	Mangiacotti <i>et al.</i> (2009)
<i>Castanea sativa</i> Miller (Portugal, Italia, Turquía)	0.27, 0.54 kGy at 0.27 kGy h ⁻¹	Antonio <i>et al.</i> (2011a, b, c)
	0.5, 1.0, 3.0, 6.0 kGy at 0.8 kGy h ⁻¹	
	0.27, 0.54 kGy at 0.27 kGy h ⁻¹	Fernandes <i>et al.</i> (2011a, b)
	0.25, 0.5, 1.0, 3.0 kGy	Calado <i>et al.</i> (2011)
	0.25, 0.5, 3.0, 10 kGy	Barreira <i>et al.</i> (2012)
	0.5, 3.0 kGy at 1.13 kGy h ⁻¹	Antonio <i>et al.</i> (2012)
	1.0, 3.0, 6.0 kGy at 2.5 kGy h ⁻¹	Carocho <i>et al.</i> (2012a, b)
	0.6, 1.1, 3.0 kGy at 0.8 kGy h ⁻¹	Barreira <i>et al.</i> (2013)
1.16 kGy	Carocho <i>et al.</i> (2013b)	
Electrones		
<i>Castanea sativa</i> Miller (Portugal, Italia)	0.53, 0.83, 2.91, 6.10 kGy	Carocho <i>et al.</i> (2012a, b; 2013a)
	1.04 kGy	Barreira <i>et al.</i> (2013)
		Carocho <i>et al.</i> (2013b)

Todos los autores han incluido en las análisis muestras no irradiadas, 0 kGy (control).

Las celdas en blanco se refieren a estudios realizados por el autor de la tesis y co-autores.

Las celdas en gris representan estudios de otros autores.

Tab. 4. Parámetros físico-químicos, nutricionales y actividad antioxidante.

Parámetro	Especie	Radiación	Autores
Color	<i>Castanea crenata</i>	gamma	Kwon <i>et al.</i> (2004)
	<i>Castanea sativa</i>	gamma	Antonio <i>et al.</i> (2013a)
		e-beam	Antonio <i>et al.</i> (2013b)
Textura	<i>Castanea sativa</i>	gamma	Antonio <i>et al.</i> (2013a)
Deshidratación			Antonio <i>et al.</i> (2012b)
Materia seca, Ceniza, Grasa, Hidratos de Carbono, Sacarosa, Valor Energético	<i>Castanea sativa</i>	gamma	Fernandes <i>et al.</i> (2011b) Barreira <i>et al.</i> (2012)
		e-beam	Carocho <i>et al.</i> (2012b, 2013b)
Proteínas	<i>Castanea mollissima</i>	gamma	Guo-xin <i>et al.</i> (1980)
	<i>Castanea sativa</i>		Fernandes <i>et al.</i> (2011b) Barreira <i>et al.</i> (2012)
			e-beam
Azúcares totales	<i>Castanea mollissima</i>	gamma	Iwata <i>et al.</i> (1959) Guo-xin <i>et al.</i> (1980)
	<i>Castanea sativa</i>	gamma	Fernandes <i>et al.</i> (2011a)
		e-beam	Carocho <i>et al.</i> (2012b)
Fructosa, Glucosa, Rafinosa	<i>Castanea sativa</i>	gamma	Fernandes <i>et al.</i> (2011a)
		e-beam	Carocho <i>et al.</i> (2012b)
Trehalosa	<i>Castanea sativa</i>	gamma	Fernandes <i>et al.</i> (2011a)
Amilasa, Catalasa, Almidón	<i>Castanea mollissima</i>	gamma	Guo-xin <i>et al.</i> (1980)
Ácidos grasos	<i>Castanea sativa</i>	gamma	Fernandes <i>et al.</i> (2011a, b) Barreira <i>et al.</i> (2012) Carocho <i>et al.</i> (2013b)
Ácidos orgánicos		e-beam	Carocho <i>et al.</i> (2013a, b)
Ácido ascórbico	<i>Castanea mollissima</i>	gamma	Iwata <i>et al.</i> (1959)
Tocoferoles	<i>Castanea sativa</i>	gamma	Fernandes <i>et al.</i> (2011a, b) Carocho <i>et al.</i> (2013b)
Triacilgliceroles		gamma	Barreira <i>et al.</i> (2013)
		e-beam	
Fenoles Flavonoides Activ. antioxidante		gamma	Antonio <i>et al.</i> (2011a)
	e-beam	Carocho <i>et al.</i> (2012a, 2013b)	

Las celdas en blanco se refieren a estudios realizados por el autor de la tesis y co-autores.
Las celdas en gris representan estudios de otros autores.

7. Conclusiones

El método más utilizado para la desinsectación postcosecha de alimentos es la fumigación química, que es un proceso agresivo y tóxico para los operadores y su uso está prohibido en algunos casos. La irradiación se considera una tecnología respetuosa con el medio ambiente y que cumple los requisitos de seguridad alimentaria, considerando que el riesgo de exposición a agentes patógenos transmitidos por los alimentos se reduce sustancialmente con el uso de la irradiación (Molins, 2001).

La irradiación de alimentos puede preservar algunos componentes y degradar otros. Sin embargo, se debe enfatizar que cualquier procesamiento de alimentos deja marcas en el producto, pero que son un requisito para comer alimentos seguros. Se debe utilizar el balance de ventajas y desventajas, en comparación con otros procesos de conservación, para seleccionar o no este tipo de tecnología de procesamiento, para proporcionar al consumidor un producto que cumpla con los mejores criterios de calidad y seguridad.

Con esta investigación se pudo obtener una visión de dos tecnologías de procesamiento por irradiación y de su viabilidad. Ambos tipos de radiación, gamma o electrones, pueden representar soluciones adecuadas para el tratamiento postcosecha de castañas. Las principales diferencias que se encuentran en muestras irradiadas están relacionadas con el tiempo de almacenamiento o con diferentes variedades.

El uso de la irradiación para el procesamiento de alimentos no interfiere significativamente con los principales parámetros físicos y bioquímicos, la irradiación gamma y con electrones no afecta significativamente el valor nutricional y las moléculas individuales presentes en las castañas más do que el tiempo de almacenamiento. Por otra parte, protege antioxidantes tales como tocoferoles y compuestos fenólicos, presentando las muestras irradiadas una mayor actividad antioxidante comparativamente a las muestras no irradiadas.

Los macronutrientes - hidratos de carbono, grasas, proteínas y azúcares - no se alteren significativamente por irradiación el valor nutricional. Entre los micronutrientes, algunas de las vitaminas son susceptibles a la irradiación en una medida que depende de la composición del alimento y de las condiciones de procesamiento y de almacenamiento (WHO, 1999).

Se han estudiado algunos compuestos bioactivos en las castañas sometidas a irradiación, midiendo el contenido en tocoferoles, un grupo de isoformas de la vitamina E y no se ha detectado la degradación de estos compuestos con la irradiación.

A partir del análisis correspondiente, cada variedad de castañas han sido claramente separadas. Todavía, en cuanto a la irradiación gamma y con electrones, no fue posible definir marcas distintivas, comparando las muestras no irradiadas y las muestras irradiadas con 1 kGy, indicando así la ausencia de diferencias notables entre los dos grupos de muestras. En general, la variabilidad intrínseca entre diferentes variedades superó las diferencias causadas por ambos tipos de irradiación gamma y electrones.

La correlación entre la irradiación y variedad fue significativa en la mayoría de los casos, lo que indica que los efectos causados por cada tipo de irradiación pueden depender de los variedades de castañas ensayadas (Carocho *et al.*, 2013b), lo que pone de relieve la importancia de validación del procesamiento por irradiación en castañas de variedades europeas. Este aspecto es reforzado por el diferente comportamiento en la variación de la textura con la dosis de radiación en dos variedades distintas (resultados no publicados).

Desde un punto de vista nutricional, los alimentos irradiados son sustancialmente equivalentes o superiores a alimentos procesados térmicamente (WHO, 1999). Otros procesamientos de alimentos, como asar o cocer, provocan cambios en la composición nutricional (Gonçalves *et al.*, 2010; Nazzaro *et al.*, 2011) y hacen incluso inviable la aplicación de los métodos de detección de alimentos irradiados (Stefanova *et al.*, 2010).

En conclusión, se han estudiado los efectos de la radiación gamma y con electrones en los parámetros físico-químicos de la castaña, así como su correlación con el tiempo de almacenamiento. Sin excepción, el tiempo de almacenamiento provocó cambios mayores en estos perfiles que ambos tipos de radiación, lo que confirma que esta tecnología a las dosis aplicadas no afectó a la calidad de la castaña.

En general, se puede afirmar que las dosis de radiación gamma y electrones utilizadas (0,5 a 6 kGy) producen efectos menos obvios que el tiempo de almacenamiento en todos los parámetros evaluados, con excepción del parámetro físico textura, en que se han verificado cambios para la dosis de 6 kGy (Antonio *et al.*, 2013a).

Los estudios realizados han también permitido concluir que la irradiación con electrones parece ser una metodología más adecuada, debido a que los efectos en la

composición química y nutricional han sido menos detectables que las causadas por la irradiación gamma (Carocho *et al.*, 2012a).

En consecuencia, la tecnología de irradiación puede ser considerada como un método para la conservación de castañas, independientemente de la fuente de irradiación, las variedades y el origen geográfico en ambos tipos de radiación gamma y electrones, lo que constituye un paso importante hacia la utilización de la irradiación como tecnología de conservación factible.

El estudio de los efectos de la irradiación gamma y con electrones ha finalizado con la validación de un método de identificación de castañas irradiadas, utilizando como marcador el perfil de triglicéridos (TAG). El efecto de las radiaciones gamma y de electrones en los perfiles de triacilglicéridos (TAG) de la castaña no había sido evaluada anteriormente a este estudio. En las muestras procesadas los perfiles de TAG fueron por primera vez identificados como indicadores adecuados del tratamiento por irradiación en castañas (Barreira *et al.*, 2013) y, más recientemente, también validados por el mismo grupo de autores en setas (Fernandes *et al.*, 2014d).

La identificación adecuada de un producto alimentario irradiado puede así contribuir a la confianza del mercado, siempre que los consumidores sean conscientes de la seguridad y del potencial de estas tecnologías de conservación de alimentos.

Este estudio puede tener también un impacto favorable en la economía de los productores de estas frutas y en la salud de los usuarios, por la utilización de un proceso que es respetuoso con el medio ambiente y que no deja residuos tóxicos en el producto, garantizando al consumidor un alimento seguro.

Referencias

- Aegerter, A. F., & Folwell, R. J. (2000). Economic aspects of alternatives to methyl bromide in the postharvest and quarantine treatment of selected fresh fruits. *Crop Protection*, *19*, 161-168.
- Antonio, A. L., Caroch, M., Bento, A., Quintana, B., Botelho, M. L., & Ferreira, I. C. F. R. (2012a). Effects of gamma radiation on the biological, physico-chemical, nutritional and antioxidant parameters of chestnuts - A review. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(9), 3234-3242.
- Antonio, A. L., Caroch, M., Bento, A., Rafalski, A., & Quintana, B. (2013b). Influence of e-beam postharvest irradiation in the colour of four European chestnut fruit varieties of *Castanea sativa* Mill. *European Scientific Journal*, *3*(3), 835-840.
- Antonio, A. L., Fernandes, A., Barreira, J. C. M., Bento, A., Botelho, M. L., & Ferreira, I. C. F. R. (2011a). Influence of gamma irradiation in the antioxidant potential of chestnuts (*Castanea sativa* Mill.) fruits and skins. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(9), 1918-1923.
- Antonio, A. L., Fernandes, A., Bento, A., Ferreira, A., Trigo, M. J., Botelho, M. L., Quintana, B., & Ramalhosa, E. (2013a). Gamma irradiation preservation of chestnut fruits: effects on color and texture. *European Scientific Journal*, December(3).
- Antonio, A. L., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A., Teubig, P., & Botelho, M. L. (2010). *Influence of gamma radiation on the antioxidant properties of edible chestnuts*. Paper presented at the Isotope Technologies and Applications - New Horizons, Mumbai, India.
- Antonio, A. L., Ramalhosa, E., Bento, A., Trindade, M., Sanchez, G., Botelho, M. L., & Quintana, B. (2012b). *Compartment modelling in drying of gamma irradiated chestnut fruits*. Paper presented at the FoodSim, Freising, Germany.
<http://hdl.handle.net/10198/7078>
- Antonio, A. L., Ramalhosa, E., Botelho, M. L., Günaydi, T., Alkan, H., Quintana, B., & Bento, A. (2011c). *Influência da dose de radiação gama na cor de castanhas de origem Portuguesa e Turca (Castanea sativa Mill.)*. Paper presented at the VI Congresso Ibérico de Agro-Engenharia, Évora, Portugal. <http://hdl.handle.net/10198/6529>
- Antonio, A. L., Ramalhosa, E., Botelho, M. L., Quintana, B., Trigo, M. J., Ferreira, A., & Bento, A. (2011b). *Irradiação gama de castanhas calibradas provenientes de uma unidade industrial: cor e textura*. Paper presented at the VI Congresso Ibérico de Agro-Engenharia, Évora, Portugal. <http://hdl.handle.net/10198/6527>
- APHIS. (1996). The Application of Irradiation to Phytosanitary Problems (Vol. 7 CFR Part 319): Animal and Plant Health Inspection Service, USA.
- Arlot, S., & Celisse, A. (2010). A survey of cross-validation procedures for model selection. *Statistics Surveys*, *4*, 40-79.
- Arvanitoyannis, I. S. (2010). *Irradiation of Food Commodities: Techniques, Applications, Detection, Legislation, Safety and Consumer Opinion*. London, UK: Academic Press, Elsevier Inc.
- ASTM. (1989). Standard E1276-88: Practice for use of a Polymethylmethacrylate Dosimetry System (pp. 797-801).
- ASTM. (1992). Practice for Using the Fricke Reference Standard Dosimetry System *E 1026 - 92*.
- Auslender, V. L., Bukin, A. D., Voronin, L. A., Kokin, E. N., Korobeinikov, M. V., Krainov, G. S., Lukin, A. N., Radchenko, V. M., Sidorov, A. V., & Tkachenko, V. O. (2004). Bremsstrahlung converters for powerful industrial electron accelerators. *Radiation Physics and Chemistry*, *71*, 295-297.
- Balaji, I. (2013). [Quote for a gamma irradiation facility].
- Barreira, J. C. M., Alves, R. C., Casal, S., Ferreira, I. C. F. R., M.B.P.P., O., & Pereira, J. A. (2009). Vitamin E profile as a reliable authenticity discrimination factor between chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 5524-5528.

- Barreira, J. C. M., Antonio, A. L., Günaydi, T., Hasan, A., Bento, A., Botelho, M. L., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Chemometric characterization of gamma irradiated chestnuts from Turkey. *Radiation Physics and Chemistry*, *81*, 1520–1524. doi: 10.1016/j.radphyschem.2012.01.005
- Barreira, J. C. M., Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R., Antonio, A. L., Kaluska, I., Botelho, M. L., & Oliveira, M. B. P. P. (2013). Effects of gamma and electron beam irradiations on the triacylglycerol profile of fresh and stored *Castanea sativa* Miller samples. *Postharvest Biology and Technology* *81*, *81*, 1-6.
- Barreira, J. C. M., Ferreira, I. C. F. R., M.B.P.P., O., & Pereira, J. A. (2010). Antioxidant potential of chestnut (*Castanea sativa* L.) and almond (*Prunus dulcis* L.) by-products. *Food Science and Technology International*, *16*(3), 209-216.
- Batskikh, G., Mamaev, G., Mischenko, A., & Pirozhenko, V. (1999). *The electron accelerator installations with local shielding for applied purposes*. Paper presented at the Proceedings of the 1999 Particle Accelerator Conference.
- Berejka, A. J. (2004). Advances in self-shielded accelerators *Emerging Applications of Radiation Processing* (Vol. TecDoc 1386). Vienna, Austria: IAEA.
- Berejka, A. J. (2009, 4-8 May). *Prospects and Challenges for the Industrial Use of Electron Beam Accelerators* Paper presented at the International Topical Meeting on Nuclear Research Applications and Utilization of Accelerators, Vienna, Austria.
- Cabo Verde, S., Melo, R., Marcos, H., Silva, T., Nunes, I., Dores, V., Antonio, A., Reis, J., Teubig, P., Santos, P. M. P., & Botelho, M. L. (2010). Radiation Technology: Processes and Products - Concepts and Applications. In R. K. Khandal (Ed.), *Radiation Processing Technology Applications* (Vol. Vol. 1, pp. 5-21). India: Shriram Institute for Industrial Research.
- Carocho, M., Antonio, A. L., Barreira, J. C. M., Bento, A., Kaluska, I., & Ferreira, I. C. F. R. (2012b). Effects of electron beam radiation on nutritional parameters of portuguese chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(31), 7754–7760.
- Carocho, M., Antonio, A. L., Barreira, J. C. M., Bento, A., Rafalski, A., Bento, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2013b). Validation of Gamma and Electron Beam Irradiation as Alternative Conservation Technology for European Chestnuts. *Food Bioprocess Technology*, 1-11.
- Carocho, M., Antonio, A. L., Barros, L., Bento, A., Botelho, M. L., Kaluska, I., & Ferreira, I. C. F. R. (2012a). Comparative effects of gamma and electron beam irradiation on the antioxidant potential of Portuguese chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food and Chemical Toxicology*, *50*(10), 3452-3455.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(4), 377-399. doi: 10.1111/1541-4337.12065
- Carocho, M., Barros, L., Antonio, A. L., Barreira, J. C. M., Bento, A., Kaluska, I., Bento, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2013a). Analysis of organic acids in electron beam irradiated chestnuts (*Castanea sativa* Mill.): Effects of radiation dose and storage time. *Food and Chemical Toxicology*, *55*, 348-352.
- Catana, D., Panaitescu, J., Axinescu, S., Manolache, D., Matei, C., Corcodel, C., Ulmeanu, M., & Bestea, V. (1995). On-site installation and shielding of a mobile for radiation processing electron accelerator. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, *B*(99), 784-786.
- CEN. (2012). European Standards Adopted as CODEX Methods: European Committee for Standardisation.
- Chmielewski, A. G., Kang, C. M., Kang, C. S., & Vujic, J. L. (Eds.). (2006). *Radiation Technology: Introduction to Industrial and Environmental Applications*. Seoul, Korea: SNU - Seoul National University Press.
- Chung, H.-W., Delincé, H., Han, S.-B., Hong, J.-H., Kim, H.-Y., Kim, M.-C., Byund, M.-W., & Kwon, J.-H. (2004). Trials to identify irradiated chestnut (*Castanea bungena*) with different analytical techniques. *Radiation Physics and Chemistry*, *71*, 179-182.

- Cleland, M. R., & Stichelbaut, F. (2013). Radiation processing with high-energy X-rays. *Radiation Physics and Chemistry*, 84, 91–99.
- Codex. (1999). General Standard for the Labeling of Prepackaged Foods *CODEX STAN 1-1985, Rev.2-1999*: Codex Alimentarius Commission.
- Codex. (2003). General standard for Irradiated Foods *CODEX STAN 106-1983, REV.1-2003*: Codex Alimentarius Commission.
- Cokragan, A. (2013). [Cost of an e-beam accelerator - Personal communication].
- Dauthy, M. E. (1995). Fruit and vegetable processing Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/v5030e/V5030E00.htm#Contents>
- Deeley, C. M. (2004). A basic interpretation of the technical language of radiation processing. *Radiation Physics and Chemistry*, 71, 503-507.
- Dethier, P. (2013). [Cost of an e-beam irradiator - Personal communication].
- Diehl, J. F. (2002). Food irradiation - past, present and future. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 211–215.
- E.U. (1979). On the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs for sale to the ultimate consumer *Official Journal of the European Communities* (pp. 1-14). European Commission.
- E.U. (1999a). On the approximation of the laws of the Member States concerning foods and food ingredients treated with ionising radiation *Directive 1999/2/EC, Official Journal of the European Communities* (pp. 16-22): European Commission.
- E.U. (1999b). On the establishment of a Community list of foods and food ingredients treated with ionising radiation *Directive 1999/3/EC* (pp. 24-25): Official Journal of the European Communities.
- E.U. (2002). Adopting the list of approved facilities in third countries for the irradiation of foods *2002/840/EC*: Official Journal of the European Union.
- E.U. (2008). Concerning the non-inclusion of methyl bromide in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing that substance (Vol. L 258, pp. 68-69): Official Journal of the European Union.
- E.U. (2011a). List of approved facilities for the treatment of foods and food ingredients with ionising radiation in the Member States *Official Journal of the European Union* (pp. 14-17).
- E.U. (2011b). Report from the Commission to the European Parliament and the Council on food and food ingredients treated with ionising radiation for the year 2011 (pp. 1-19). Brussels: European Commission.
- E.U. (2013a). Food Irradiation Retrieved 5th August, 2013, from http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/irradiation/index_en.htm
- E.U. (2013b). Foods & food ingredients authorised for irradiation in the EU Retrieved 5th August, 2013, from http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/irradiation/comm_legisl_en.htm
- EBTech. (2013) Retrieved March, from <http://www.eb-tech.com/>
- EFSA. (2011). Scientific Opinion on the Chemical Safety of Irradiation of Food. *European Food Safety Authority Journal*, 9(4), 1-57.
- EN1785:2003. Detection of irradiated food containing fat - Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones. *European Standards* Retrieved June 2014, from http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/irradiation/1785-2003_en.pdf
- Eustice, R. F. (2013). Food irradiation update Retrieved March 2014, from <http://foodirradiation.org/Food%20Irradiation%20Updates/january2013.html>
- EVONTA. (2014) Retrieved March 2014, from <http://www.e-ventus.de/>
- FAOSTAT. (2012). Agricultural Production Retrieved 10th July 2014, from <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>
- Farrar IV, H. (1999). Dosimetry standards for radiation processing. In IAEA (Ed.), *Techniques for high dose dosimetry in industry, agriculture and medicine* (Vol. TecDoc 1070).
- Fernandes, Â., Antonio, A. L., Barros, L., Barreira, J. C. M., Bento, A., Botelho, M. L., & Ferreira, I. C. F. R. (2011a). Low dose gamma-irradiation as a suitable solution for

- chestnut (*Castanea sativa* Miller) conservation: effects on sugars, fatty acids and tocopherols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 10028–10033.
- Fernandes, Â., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P. P., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2012a). Effect of gamma and electron beam irradiation on the physico-chemical and nutritional properties of mushrooms: a review. *Food Chemistry*, 135(2), 641-650.
- Fernandes, Â., Barreira, J. C. M., Antonio, A. L., Bento, A., Botelho, M. L., & Ferreira, I. C. F. R. (2011b). Assessing the effects of gamma irradiation and storage time in energetic value and in major individual nutrients of *Castanea sativa* Miller. *Food and Chemical Toxicology* 49(9), 2429-2432.
- Fernandes, A., Barreira, J. C. M., Antonio, A. L., Martins, A., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2014d). Triacylglycerols profiling as a chemical tool to identify mushrooms submitted to gamma or electron beam irradiation. *Food Chemistry*, 159, 399-406.
- Irradiation of Tropical Fruits - Breadfruit, Carambola, Custard Apple, Litchi, Longan, Mango, Mangosteen, Papaya and Rambutan (2002).
- Gonçalves, B., Borges, O., Costa, H. S., Bennet, R., Santos, M., & Silva, A. P. (2010). Metabolite composition of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) upon cooking: Proximate analysis, fibre, organic acids and phenolics. *Food Chemistry*, 122, 154-160.
- Greenfield, H., & Southgate, D. A. T. (2003). Food composition data: production, management and use
- Guo-xin, Z., Qiong-ling, D., Yao-chang, X., & Si-lian, L. (1980). Effect of Co-60 gamma irradiation on the storage of Chinese chestnut fruits. *Acta Botanica Sinica*, 22, 404-406.
- Guo, W., Wu, X., Zhu, X., & Wang, S. (2011). Temperature-dependent dielectric properties of chestnut and chestnut weevil from 10 to 4500 MHz. *Biosystems Engineering*, 110, 340-347.
- Iacoboni, V., Liccione, G., Schwarz, M., Tata, A., & Fantini, M. (1998). A new semi-mobile plant for radiation processing of waste *Radiation Technology for Conservation of the Environment* (Vol. TecDoc 1023, pp. 445-452). Vienna, Austria.
- IAEA. (2002). Dosimetry for Food Irradiation *Technical Report Series No. 409*. Vienna, Austria.
- IAEA. (2004a). Emerging applications of radiation processing *TecDoc 1386*. Vienna, Austria.
- IAEA. (2004b). Irradiation as a Phytosanitary Treatment of Food and Agricultural Commodities *TecDoc 1427*. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency.
- IAEA. (2009). Calibration of Reference Dosimeters for External Beam Radiotherapy (Vol. TRS 469).
- IAEA. (2010). Radiation Safety of Gamma, Electron and X Ray Irradiation Facilities *Safety Standards Series* (Vol. SSG-8). Vienna: International Atomic Energy Agency.
- IAEA. (2011). Industrial Radiation Processing With Electron Beams and X-rays *International Atomic Energy Agency (Draft revised)*.
- IAEA. (2013). Food Irradiation Treatment Facilities Database Retrieved 5th August 2013, from <http://nucleus.iaea.org/fitf/>
- IBM. (2013). SPSS Statistics for Windows, Version 22.0 Retrieved from <http://www-01.ibm.com/software/analytics/spss/>
- ICGFI. (1998). Irradiation and Trade in Food and Agriculture Products: International Consultative Group on Food Irradiation, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques
- ICGFI. (1999). Facts about Food Irradiation. Vienna, Austria: International Consultative Group on Food Irradiation.
- ICRU. (2008). Dosimetry Systems for Use in Radiation Processing (Vol. Report 80). Oxford Univ. Press, U.K.
- IDIDAS. (2012). International Database on Insect Disinfestation and Sterilization Retrieved 20th June 2014, from <http://ididas.iaea.org>
- Imamura, T., Todoriki, S., Miyanoshita, A., & Hayashi, T. (2004). Effects of gamma irradiation on the emergence of larvae of *Curculio sikkimensis* (Heller)(Coleoptera: Curculionidae)

- and *Cydia kurokoi* (Amsel) (Lepidoptera: Tortricidae). *Food Irradiation, Japan*, 39, 5-7.
- ISPM. (2003). Guidelines for the Use of Irradiation as a Phytosanitary Measure 18: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- ISPM. (2007). Phytosanitary Treatments for Regulated Pests 28: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Iwata, T., & Ogata, K. (1959). Studies on the storage of chestnuts treated with gamma radiation. *Bulletin of the University of Osaka Prefecture*, 59, 59-65.
- Kazantzis, I., Nanos, G. D., & Stavroulakis, G. (2003). Effect of harvest time and storage condition almond kernel oil and sugar composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 354-359.
- Khandal, R. K. (2010). Introduction. In R. K. Khandal (Ed.), *Radiation Technology Processing Applications* (Vol. 1). India: Shriram Institute for Industrial Research.
- Kovács, E., & Keresztes, Á. (2002). Effect of gamma and UV-B/C on plant cells. *Micron*, 33, 199-210.
- Kume, T., Furuta M., Todoriki S., Uenoyama N., & Y., K. (2009). Status of food irradiation in the world. *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 222-226.
- Kume, T., & Todoriki, S. (2013). Food irradiation in Asia, the European Union, and the United States: a status update. *Radioisotopes*, 62, 291-299.
- Kwon, J. H., Kwon, Y. J., Byunc, M. W., & Kim, K. S. (2004). Competitiveness of gamma irradiation with fumigation for chestnuts associated with quarantine and quality security. *Radiation Physics and Chemistry*, 71, 41-44.
- Kwon, J. H., Lee, J., Lee, S. B., Chung, H. S., & Choi, J. U. (2001). Effects of water soaking and gamma irradiation on storage quality of chestnuts. *Korean Journal of Postharvest and Science Technology*, 89, 9-15.
- Lancker, M. V., Herer, A., Cleland, M. R., Jongen, Y., & Abs, M. (1999). The IBA Rhodotron: an industrial high-voltage high-powered electron beam accelerator for polymers radiation processing. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B*(151), 242-246.
- Mangiacotti, M., Chiaravalle, A. E., Marchesani, G., Sio, A. D., Boniglia, C., Bortolini, E., & Onori, S. (2009). Detection of irradiated chestnuts: preliminary study using three analytical techniques. *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 695-698.
- Marcotte, M. (1998). Irradiation as a disinfestation method - update on Methyl Bromide phase out, regulatory action and emerging opportunities. *Radiation Physics and Chemistry*, 52(1-6), 85-90.
- McLaughlin, W. L., Boyd, A. W., Chadwick, K. H., McDonald, J. C., & Miller, A. (1989). *Dosimetry for Radiation Processing*: Taylor & Francis, U.K.
- Mehta, K. (1998). High-Dose Dosimetry Programme of the IAEA *Techniques for high dose dosimetry in industry, agriculture and medicine* (Vol. TecDoc 1070): International Atomic Energy Agency.
- Miller, R. B. (2005). *Electronic irradiation of foods: an introduction to the technology*. New York, USA.: Springer editors.
- Miller, R. B., Loda, G., Miller, R. C., Smith, R., Shimer, D., Seidt, C., MacArt, M., Mohr, H., Robison, G., Creely, P., Bautista, J., Oliva, T., Young, L. M., & DuBois, D. (2003). A high-power electron linear accelerator for food irradiation applications. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B*, B(211), 562-570.
- Molins, R. A. (2001). Historical Notes on Food Irradiation. In R. A. Molins (Ed.), *Food Irradiation: Principles and Applications*. New York, USA: John Wiley & Sons.
- Morrison, R. M. (1989). An Economic Analysis of Electron Accelerators and Cobalt-60 for Irradiating Food: U.S. Department of Agriculture. Technical Bulletin No. 1762.
- Nayak, C. A., Suguna, K., Narasimhamurthy, K., & Rastogi, N. K. (2007). Effect of gamma irradiation on histological and textural properties of carrot, potato and beetroot. *Journal of Food Engineering*, 79, 765-770.

- Nazzaro, N., Barbarisi, C., La Cara, F., & Volpe, M. G. (2011). Chemical and biochemical characterisation of an IGP ecotype chestnut subjected to different treatments. *Food Chemistry*, 128, 930-936.
- Nordion. (2013). The History of Food Irradiation Retrieved March 2013, from www.mdsnordion.com
- Pearson, K. (1901). On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*, 2, 559-572. Retrieved from <http://stat.smmu.edu.cn/history/pearson1901.pdf>
- Pereira, E., Barros, L., Antonio, A., Bento, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Analytical Methods Applied to Assess the Effects of Gamma Irradiation on Color, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Ginkgo biloba L. *Food Analytical Methods*, 7(7). doi: 10.1007/s12161-014-9883-x
- Sádecká, J. (2007). Irradiation of spices – a review. *Czech J. Food Sci.*, 25, 231-242.
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Gonçalves, A. C., Seabra, R. M., Oliveira, M. B., & Ferreira, M. A. (2004b). Influence of jam processing upon the contents of phenolics, organic acids and free amino acids in quince fruit (*Cydonia oblonga* Miller). *European Food Research Technology*, 218, 385–389.
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. (2004a). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4705-4712.
- Singru, R. M. (1972). *Introduction to Experimental Nuclear Physics*. New Delhi, India: WILEY Eastern.
- Stefanova, R., Vasilev, N. V., & Spassov, S. L. (2010). Irradiation of Food, Current Legislation Framework, and Detection of Irradiated Foods. *Food Analytical Methods*, 3, 225-252.
- Stein, R. N. (2013). [Quote for a gamma irradiator - Personal communication].
- Stewart, E. M. (2001). Food Irradiation Chemistry. In R. A. Molins (Ed.), *Food irradiation: Principles and applications* (pp. 37-76). New York, USA: John Wiley & Sons.
- Todoriki, S., Hasan, M., Miyanoshita, A., Imamura, T., & Hayashi, T. (2006). Assessment of electron beam-induced DNA damage in larvae of chestnut weevil, *Curculio sikkimensis* (Heller) (Coleoptera: Curculionidae) using comet assay. *Radiation Physics and Chemistry*, 75, 292-296.
- UNEP. (1995). Montreal protocol on substances that deplete the ozone layer *Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee*: United Nations Environment Programme.
- Vaughan, J. G., & Geissler, C. A. (1997). *The New Oxford Book of Food Plants*. New York: Oxford University Press.
- web. (2009). Safety of Irradiated Food. *Risk Assessment Studies, Report No. 37. Centre for Food Safety, Food and Environmental Hygiene Department. The Government of the Hong Kong Special Administrative Region* Retrieved 7th August, 2013
- web. (2013). FDA Expands Irradiation Uses for Meat and Poultry Retrieved 5th August, 2013, from <http://www.foodsafetynews.com/2012/12/fda-expands-irradiation-uses-for-meat-and-poultry/#.Uf8BY6xOJg4>
- WHO. (1981). Wholesomeness of irradiated food. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. Geneva, Switzerland: World Health organization.
- WHO. (1994). Safety and Nutritional Adequacy of Irradiated Food. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WHO. (1999). High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy *Technical Report Series N° 890*. Geneva, Switzerland: World Health Organisation.
- WTO. (1994). Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures: World Trade Organization.
- Yu, Y., & Wang, J. (2007). Effect of gamma-ray irradiation on starch granule structure and physicochemical properties of rice. *Food Research International*, 40, 297–303.
- Zakladnoi, G. A., Men'shenin, A. I., Pertsovskii, E. S., Salimov, R. A., Cherepkov, V. G., & Krsheminskii, V. S. (1982). Industrial application of radiation deinfestation of grain. *Atomnaya Energiya*, 52(1), 57-59.

Ziaie, F., Zimek, Z., Bulka, S., Afarideh, H., & Hadji-Saied, S. M. (2002). Calculated and measured dose distribution in electron and X-ray irradiated water phantom. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 177-183.