



Acta Universitaria

ISSN: 0188-6266

actauniversitaria@ugto.mx

Universidad de Guanajuato

México

Rangel Rodríguez, Carlos Alberto; de la Rosa Carrillo, Laura Alejandra

Proteínas en frutos secos: algo más que alérgenos

Acta Universitaria, vol. 23, núm. 5, septiembre-octubre, 2013, pp. 3-9

Universidad de Guanajuato

Guanajuato, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41629559001>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Proteínas en frutos secos: algo más que alérgenos

Nuts Protein: more than allergen

Carlos Alberto Rangel Rodríguez*, Laura Alejandra de la Rosa Carrillo*

RESUMEN

Los frutos secos poseen propiedades benéficas para la salud, por lo que éstos forman parte de la dieta en humanos; sin embargo, también son un riesgo en consumidores sensibles a alérgenos proteicos presentes en frutos secos. Por ello, gran parte de la investigación sobre las proteínas de los frutos secos se enfoca en determinar alérgenos presentes en ellos y en generar métodos que simplifiquen su identificación. De esta manera, las técnicas proteómicas han sido aplicadas recientemente en este campo de la investigación en alimentos. Además, la proteómica también juega un rol importante en el estudio de frutos secos almacenados, con la finalidad de preservar las propiedades nutricionales el mayor tiempo posible. Por último, interesa determinar las posibles diferencias proteómicas en frutos de una misma especie, ocasionadas por factores ambientales, permitiendo obtener nueva información respecto a las proteínas presentes en alimentos benéficos para la salud.

ABSTRACT

Dry fruits, like nuts, possess beneficial properties for health, therefore, they are already part of the human diet; however, they are also a health risk to consumers sensitive to peptide allergens present in nuts. Research in nut proteins has mainly focused on determining nut allergens and in generating methods to simplify their identification. This is how proteomic techniques have been recently applied in this food research area. Proteomics also plays an important role in the study of stored tree nuts, in order to preserve the nutritional properties a long period of time, and finally, in the evaluation of differences in fruits of the same species, caused by environmental factors. Proteomic studies are helpful in creating and implementing new technological tools and methodological strategies for gathering information in the proteins of these foods beneficial to health.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las nueces o frutos secos tienen un lugar importante en la dieta humana debido a su sabor, textura y, principalmente, a las propiedades nutricionales que son un beneficio para la salud. Una gran variedad de árboles generan frutos secos, siendo los más populares las nueces pecaneras, avellanas, almendras, pistachos y nuez de castilla, entre otros. Las nueces pecaneras y de castilla pertenecen a la familia *Juglandaceae*; en esta familia se encuentran los árboles de los géneros *Juglans* y *Carya*, los cuales son los más distribuidos y explotados comercialmente alrededor del mundo (Aradhya, Potter, Gao & Simon, 2007). Otros frutos secos que son de interés económico en el mundo son las almendras, que pertenecen a la familia de las *Rosaceae*, siendo el género *Prunus* el más importante, estando sólo por debajo de las nueces pecaneras en producción mundial en el 2010 (Costa, Mafra, Carrapatoso & Oliviera, 2012). Dentro de la familia *Betulaceae*, la avellana, del género *Corylus*, es el más importante comercialmente (Kafkas & Doğan, 2009), mientras que los pistachos de la familia *Anacardiaceae*, del género *Pistacia*, son los únicos que proveen granos consumibles (Chahed *et al.*, 2008).

Recibido: 7 de diciembre de 2012
Aceptado: 14 de octubre de 2013

Palabras clave:
Proteómica; frutos secos; alérgenos; almacenamiento; ambiente.

Keywords:
Proteomics; tree nuts; allergenic; storage; environmental.

* Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad Autónoma de Juárez. Anillo Envoltente del Pronaf y Estocolmo s/n. Cd. Juárez, Chih., México. C.P. 32310. Tel. Fax +52 656 6881894 ext. 1562. Correos electrónicos: Idelaros@uaj.mx; ccarlos38@hotmail.com

Estos frutos son parte de la dieta básica, ya que proporcionan altos niveles de energía, y cada especie de fruto varía en la composición nutricional, los cuales pueden contener proteínas vegetales, ácidos mono y poliinsaturados, fibra dietética, vitaminas, folato, polifenoles, magnesio, cobre, selenio y potasio, entre otras propiedades nutrimentales (O'Neil, Keast, Fulgoni & Nicklas, 2010).

Los frutos secos anteriormente mencionados son considerados un alimento importante en la dieta humana debido al elevado potencial benéfico de salud que presentan, siendo nombrados “protectores del corazón” (Soetaert, 2003), además, aparentemente ayudan en el manejo y prevención de la diabetes (Kendall, Esfahani, Truan, Srichaikul & Jenkins, 2010), así como también ejercen beneficio mediante el control de peso, por lo que se continúan realizando estudios que den mayor soporte a estos hallazgos (Mattes & Dreher, 2010). Estos frutos se cultivan y consumen alrededor del mundo por las propiedades netamente nutricionales, como las que se describen en la tabla 1. En esta tabla se observa que la nuez pecanera contiene el mayor porcentaje de lípidos, capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC), fenoles y flavonoides, mientras las almendras contienen el mayor porcentaje de proteínas, azúcar y fibra y, por último, los pistachos con mayor cantidad de aminoácidos. Deduciendo, así, que la nuez pecanera contiene propiedades nutricionales (ácidos grasos en forma de triglicéridos mayormente poliinsaturados y antioxidantes) de las más importantes entre los frutos secos presentes en la tabla 1.

Las proteínas juegan un rol importante en la función celular y el metabolismo, además de formar parte de la estructura celular, por lo que es posible comparar expresión de proteínas entre grupos y obtener información sobre fisiología, salud o evolución (Eurich, Fields & Rice, 2012). Éstas pueden estar de forma simple o en alguna mezcla compleja, además, pueden modificarse de forma natural o ser manipuladas por el hombre, con lo que puede resultar en alguna toxina, alergénico, o lo contrario, en un incremento en propiedades benéficas, de ahí el interés de analizar y determinar tanto la seguridad como la calidad nutrimental de proteínas y otros factores presentes en alimentos cultivados y consumidos por el hombre, como los frutos secos (Zolla, Rinalducci, Antonioli & Righetti, 2008). Por lo tanto, la ciencia se ha enfocado en generar nuevas herramientas tecnológicas y metodológicas que permitan explorar tanto genes, funciones biológicas y expresión de proteínas (Eurich *et al.*, 2012). Esta última con la finalidad de analizar patrones o cambios en ciertas proteínas, además de clasificar y caracterizar la función de estas mismas (Chen, Velliste, Weinstein, Jarvik & Murphy, 2003). Entre las herramientas y metodologías se incluyen la separación de proteínas en geles de poliacrilamida tanto de dos dimensiones o de una dimensión, la técnica de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA, por sus siglas en inglés), y la caracterización de proteínas mediante digestión y espectrometría de masas, además de la exploración de proteínas utilizando herramientas bioinformáticas, entre otras (Dhingra, Gupta, Andacht & Fu, 2005).

Tabla 1.
Propiedades de frutos secos.

Propiedades	Nuez pecanera	Almendras	Avellanas	Pistachos	Nuez de Castilla
Proteínas (g/100g)	8.3	21.4	17.3	20.2	14.3
Lípidos (g/100g)	69.1	47.0	60.6	44.8	64.9
Azúcar (g/100g)	2.8	4.8	2.9	4.6	2.3
Fibra dietética (g/100g)	9.6	12.4	6.5	10.3	6.7
Aminoácidos totales %	33.3	31.2	33.5	39.1	34.7
ORAC (μmol)*	179.40	44.54	96.45	79.83	135.41
Fenoles(mg de GAE/g)*	20.16	4.18	8.35	16.57	15.56
Flavonoides (mg)	34.01	15.24	11.96	14.37	2.71

*Capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC).

*Equivalente de ácido gálico por gramo (GAE).

Determinación de alérgenos en alimentos mediante proteómica

Sin embargo, a pesar de su propiedades benéficas, los frutos secos ya mencionados generan reacciones alérgicas en consumidores sensibles en todo el mundo, por lo que la mayoría de las investigaciones de frutos secos se han enfocado en determinar alérgenos que afectan a consumidores, ya que éstos provocan alergias en un 2% en adultos y un 8% en niños en países occidentales, según Shridhar, Sathe, Gradziel & Roux (2001), mientras Sicherer reporta que en el 2008 fue de 1.3% en adultos y del 2.1% en niños, sólo en Estados Unidos, observando un incremento de alergias año con año (Sicherer, Muñoz-Furlong, Godbold & Sampson, 2010; Shridhar *et al.*, 2001). La comisión de Codex Alimentarius, en 1985, fue la primera en realizar una lista de alimentos alérgenos, y obligó a los productores a etiquetar alimentos que los contuvieran, colocando entre estos alimentos a los frutos secos con alérgenos que pudieran provocar reacciones inmunológicas, afectando la salud de consumidores (CODEX STAN 1-1985, 1985).

Debido a que el único método efectivo de evitar alergias en consumidores sensibles es no consumir el alimento que provoca dicha reacción, se continúan generando nuevas metodologías que permitan resolver este problema, para lograr la detección de trazas mínimas de proteínas alérgicas en alimentos (Costa, Mafra, Kuchta & Oliviera, 2012). Además de la necesidad de crear métodos específicos en la detección de ciertos alérgenos para evitar falsos positivos, con lo cual sea posible realizar detecciones de manera rápida y eficiente (Madesis, Ganopoulos, Bosmali & Tsiftaris, 2012).

Mediante metodologías proteómicas, como las técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) y ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), es posible identificar y obtener marcadores proteicos antígenicos, como las proteínas de nuez pecanera 7S vicilina, 11S legumina y el alérgeno I1; este último presente en altas concentraciones en extractos de proteínas. Además, mediante estas técnicas se pudo determinar la unión de la 11S a suero de pacientes sensibles a esta proteína, y por otra parte se observó que el alérgeno Car i 4 y la proteína albumina 2S del alérgeno Car i 1 comparten regiones con leguminas de otros frutos secos presentes en alimentos procesados, destacando la importancia de metodologías proteómicas sobre la detección y selectividad de alérgenos (Polenta, Weber,

Godefroy-Benrejeb & Abbott, 2011; Sharma *et al.*, 2011; Ansari, Stoppacher & Baumgartner, 2012).

Mediante la técnica proteómica de *Western blot* se determinó que la proteína 11S es la principal alérgica de la nuez pecanera (Car i 4), además de que está presente en la almendra, avellana, pistacho y nuez de castilla, entre otros, como se muestra en la tabla 2, donde se observa una identidad (95%) y semejanza (97%) con el alérgeno de nuez de castilla Jug r 4, seguido de otros frutos. Esta legumina se produce como un hexámero compuesto de subunidades monoméricas de 50 kDa - 60 kDa, y los frutos secos mencionados poseen gran similitud entre ellos, no sólo en la secuencia de aminoácidos, sino también comparten una homología estructural al unirse a la IgE, por lo que es importante implementar metodologías simples y de detección en el menor tiempo posible, ya que esta proteína provoca reacciones alérgicas y se encuentra presente en varios frutos (Sharma *et al.*, 2011).

Tabla 2.

Comparación de secuencia de Car i 4 con otras leguminas 11S.

Fruto	Numero de acceso	% Identidad	% Semejanza	Alérgeno
Almendra	GU059261	54	70	Pru du 6.02
Avellana	AF449424	72	82	Cor a 9
Pistacho	EU410073	58	73	Pis v 2
Nuez de Castilla	AY692446	95	97	Jug r 4

Fuente: Sharma *et al.*, 2011.

Por otra parte, la proteína primaria de almacenaje adenosin monofosfato (AMP) o amandín, que es la principal alérgica de almendras entre consumidores sensibles, es fácilmente detectada, ya que permanece estable aún bajo varios tratamientos (tostado, escaldado, auto clave), mediante la aplicación de análisis proteómicos se pueden detectar trazas presentes de esta proteína, en alimentos compuestos que van de un rango de 0.5 µg a 3.7 µg (5 ppm - 37 ppm) (Roux, Teuber, Robotham & Sathe, 2001), siendo la proteína AMP un excelente marcador para detectar cantidades mínimas en alimentos (Ahrens, Venkatachalam, Mistry, Lapsley & Sathe 2005). Mientras tanto, las avellanas contienen el alérgeno Bet v 1 causante de reacciones alérgicas en el 79% de pacientes sensibles, y pertenecen a la misma familia del mayor alérgeno de avellanas, el Cor a 1, incrementando así la respuesta inmune mediada por las IgE, determinándose mediante SDS-PAGE (Müller

et al., 2000); sin embargo, otra técnica proteómica que se utiliza para detectar este alergénico y otros es mediante digestión de proteínas y posterior análisis de espectrometría de masas en Tándem, el cual es altamente confiable y específico, y hace posible determinar alergénicos como el Cor a 8, Cor a 9 y el Cor a 11, o cualquier otra proteína o péptido en alimentos, abarcando así un amplio espectro de alergénicos en un solo analito (Ansari *et al.*, 2012). El asar pistachos al vapor, entre otros procesos similares, interfiere significativamente entre la unión de los principales alergénicos Pis V 1, Pis V 2, Pis V3 y 4, con la IgE, al ser analizados y observados en geles SDS, sin alterar la calidad, color, sabor y textura de los mismos, siendo esto una opción para la comercialización de este fruto, disminuyendo en gran medida el riesgo de presentar alguna reacción alérgica (Noorbakhsh *et al.*, 2010).

Por otro lado, la proteína similar a la ciclina, determinada por SDS-PAGE, ELISA y espectrometría de masas, en nueces de *Carya illinoensis*, es causante de reacciones cruzadas (Polenta, Godefroy-Benrejeb, Delahaut, Weber & Abbott, 2009); cuando ésta se consume y/o se encuentra con otra proteína de peso molecular de 64 kDa, de la familia de la vicilina, provoca reacciones alergénicas cruzadas que puede ser muy severas en algunos consumidores sensibles, obteniendo así, mediante el uso de estas técnicas, soluciones proteómicas para detección y prevención de reacciones entre proteínas que incrementen el riesgo de daño en la salud (Polenta *et al.*, 2011).

Proteómica en frutos secos almacenados

La proteómica se comienza a enfocar en el análisis de propiedades de alimentos almacenados, con la finalidad de determinar los cambios bioquímicos y nutricionales que presentan las proteínas, debido al propio proceso de almacenamiento. Los frutos secos, después de ser cosechados, se almacenan en condiciones que eviten la degradación, cambio fisiológico, morfológico y disminución en la calidad, por lo que es necesario conocer las variables que generen posibles cambios en frutos secos una vez almacenados para su posterior venta y consumo. La germinación en las nueces pecaneras almacenadas en humedad cálida aumenta un 20% a 27° C y un 55% en humedad fría a 5° C; asimismo, provoca un cambio en el patrón de proteínas solubles tanto en humedad cálida como en fría, además incrementa la actividad de la enzima catalasa en condiciones cálidas, modificando las propiedades proteicas del fruto, incrementando la solubilidad de las mismas, siendo más susceptibles a sufrir acciones proteolíticas (Einali & Sadeghipour, 2007).

Mientras que la estabilidad de proteínas y lípidos de *Juglans regia*, posterior a un almacenamiento de ocho meses, permanece sin cambio significativo, visto en patrones de proteínas en SDS-PAGE, aunque se incrementan los péptidos solubles; además se comprobó, que ante diversos métodos de almacenamiento el recipiente para almacenaje recubierto con aluminio es el más efectivo para proteger de la luz tanto a lípidos como proteínas, evitando la proteólisis y manteniéndolas estables por un periodo de hasta ocho meses (Labuckas, Maestri & Lamarque, 2011). A diferencia de esto, las proteínas de avellanas se ven afectadas significativamente, tanto cuantitativa como estructuralmente, dependiendo del tiempo de almacenaje y del método de extracción utilizado, con lo que se pueden analizar algunos péptidos de interés mediante óptimas extracciones de proteínas y tiempo adecuado, ya que cuando estos frutos se encuentran almacenados por tiempo prolongado se pierde la capacidad de unión con ciertos antígenos de interés, por lo que entre menor sea el tiempo en almacenamiento, la extracción de proteínas será de mejor calidad (Dooper, Plassen, Holden, Moen, Namok & Egaas, 2008).

Los frutos secos ya mencionados contienen la enzima *Tiorredoxina h*, la cual activa enzimas proteasas tipo serinas, como la tiocalsina, que favorecen un ambiente intracelular reductor, donde una de las principales consecuencias es el rompimiento de enlaces disulfuro, alterando las propiedades de las proteínas. No obstante, la reducción y solubilización de proteínas de nueces *Juglans regia* en almacenamiento no la provoca esta enzima, comprobada mediante análisis de cambios *redox* en proteínas de almacenaje, bajo condiciones de humedad y estratificación. Aún mediante análisis proteómico en SDS-PAGE no se detecta actividad de la enzima *tiorredoxina*, por lo que aún se requiere determinar qué provoca cambios en proteínas de nuez *Juglans regia* que se encuentran almacenadas (Shahmoradi, Tamaskani, Sadeghipour & Abdolzehdeh, 2012).

La proteómica también puede utilizarse para implementar métodos en los cuales se incrementa la calidad nutricional de frutos secos, como los hicieron Mao & Hua (2012) con proteínas y aminoácidos en distintos concentrados de proteínas y aislado de proteínas de nuez *Juglans regia*, con lo que aumenta la absorción de agua y grasa, al igual que la concentración de aminoácidos esenciales tanto en niños como en adultos, rebasando los estándares recomendados, pudiendo, así, generar alimentos enriquecidos de proteínas vegetales y aminoácidos esenciales mediante la implementación de métodos proteómicos (Mao & Hua, 2012).

Factores externos y proteómica

Se puede analizar, mediante técnicas proteómicas mencionadas anteriormente, el proteoma total, enzimas o metabolitos para clasificar y diferenciar poblaciones de una misma especie, tanto en animales como plantas, pudiendo relacionar alguna modificación con el propio entorno o factor externo que provoque algún cambio en el proteoma, con el objeto de entender de mejor manera el porqué de la diferencia entre la proteómica de una misma especie, ya sea de animal o planta (Biro, 2007).

La localidad de cultivo ejerce cambios bioquímicos y proteómicos en árboles *Carya illinoensis*, donde se generan cambios significativos entre la composición bioquímica, siendo la humedad de la nuez, ceniza y taninos las diferencias más significativas, así como cambios en niveles de lípidos, azúcar soluble y proteínas; estas últimas siendo diferentes entre distintos cultivos, a pesar de ser la misma especie, pero de diversas localidades dentro de Estados Unidos de América (EUA) (Venkatachalam *et al.*, 2007). Mientras, en Australia, existe una evidente diferencia entre los niveles de proteínas de árboles *Carya illinoensis* de dos variedades (Wichita y Western), al ser comparados con las mismas variedades de EUA, utilizando las mismas técnicas proteómicas, pudiendo deberse esta notable diferencia al clima, a la localidad de cultivo y a las diferentes prácticas agrícolas entre huertos (Wakeling, Mason, D'Arcy & Caffin, 2001).

Las proteínas son blanco de ataques de oxidantes, por lo que la coloración de diferentes extractos de nuez *Carya illinoensis* se puede asociar a una alta variación en la cantidad de antioxidantes y, a su vez, al color de la nuez y a cambios en patrones de proteínas. Tal variación dependerá de las distintas localidades de siembra y recolección, fecha de cosecha, variación climática y la cantidad de huertos, pudiendo así determinar morfológicamente los probables niveles de antioxidantes en nueces pecaneras (Pinheiro do Prado, Monalise Aragão, Fett & Block, 2009).

Los árboles *Juglans regia* y *Juglans nigra* pertenecen al "nogal común" de la misma familia, y ambos generan frutos de la mejor calidad nutricional, sin embargo, aún se requieren nuevos métodos y tecnología para lograr el éxito de cruza híbridas entre éstos; a diferencia de otros árboles pecaneros que se hibridan de forma natural para generar frutos de mejor calidad, éstos dependen del proteoma de ambos, de la ultraestructura celular; además que la temperatura y la humedad ejercen cambios en el tiempo de maduración y polinización entre ambas especies, siendo diferente

para cada uno, debido a que un árbol es nativo del Medio Oriente y el otro del este de EUA, por lo tanto estas diferencias evitan que se pueda llevar a cabo una hibridación de forma natural, denotando la importancia de realizar diferentes análisis, entre los que destacarían los proteómicos (Abadia Bayona & Montañes García, 1984; Calzoni, Speranza, Caramiello, Piccone & Zannini, 1990).

CONCLUSIÓN

Aún se continúan implementando nuevas técnicas para la detección de trazas de proteínas alergénicas en alimentos comercializados. Actualmente se han generado marcadores moleculares para la detección de alergénicos, obtenidos mediante análisis del DNA (Deoxyribonucleic acid, por sus siglas en inglés) en frutos, no obstante, aún existe debate por obtener y determinar el marcador molecular más óptimo para detección de alergénicos, ya sea una proteína o alguna molécula de DNA, con el propósito de utilizarse para análisis de rutina en la detección de alergénicos en alimentos. En años recientes se han duplicado los esfuerzos tanto científicos, toxicológicos y manufactureros por disminuir los alergénicos en alimentos procesados, sin alterar la calidad de frutos secos. Debido a que la única manera de evitar problemas de salud en consumidores sensibles es evitar ingerir ciertas proteínas o trazas alergénicas, se siguen generando diferentes metodologías y herramientas para detectar estas trazas, lo cual ha incrementado el interés en esta área.

También es necesario evitar la degradación o modificación de propiedades cualitativas en frutos secos, por lo que es importante continuar modificando metodologías o herramientas que permitan mantener las mejores condiciones ambientales y nutrimentales para mantener huertos más productivos, además de evitar la pérdida de propiedades benéficas de frutos almacenados, por el tiempo más prolongado posible, evitando así la degradación de nutrientes esenciales.

Los nutrientes y la variabilidad proteómica de granos secos de una misma especie dependerá tanto de factores genéticos, ambientales, como la región de cultivo, del método, de las condiciones climáticas que pueden variar en ciertas temporadas de cosecha y de la madurez del fruto. Es necesario continuar con la implementación de nuevas herramientas y metodologías proteómicas para determinar cómo es que factores externos afectan las características proteicas y, a su vez, la calidad de frutos de una misma especie (Yada, Lapsley & Huang, 2011).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 36817, otorgada a Carlos Alberto Rangel Rodríguez y por el financiamiento al proyecto CB-2011-167164. También agradecemos al Doctor Emilio Álvarez Parrilla, por los consejos y ayuda en la elaboración de este manuscrito.

REFERENCIAS

- Abadía Bayona, A. & Montañés García, L. (1984). Comparación de métodos para la extracción de Zn y P en suelos. *Estación Experimental de Aula Dei*, 17(1-2), 44-50.
- Ahrens, S., Venkatachalam, M., Mistry, A. M., Lapsley, K. & Sathe, S. K. (2005). Almond (*Prunus dulcis* L.). *Protein Quality. Plant Foods for Human Nutrition*, 60(3), 123-128.
- Ansari, P., Stoppacher, N. & Baumgartner, S. (2012). Marker peptide selection for the determination of hazelnut by LC-MS/MS and occurrence in other nuts. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(8), 2607-15.
- Aradhya, M. K., Potter, D., Gao, F. & Simon, C. J. (2007). Molecular phylogeny of *Juglans* (Juglandaceae): a biogeographic perspective. *Tree Genetics & Genomes*, 3(4), 363-378.
- Biro, J. C. (2007). The Proteomic Code: a molecular recognition code for proteins. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 4(45), 1-44. doi:10.1186/1742-4682-4-45.
- Calzoni, G. L., Speranza, A., Caramiello, R., Piccone, G. & Zannini, P. (1990). Wall ultrastructure and biochemical features of the *Juglans regia* L. and *Juglans nigra* L. male gametophyte. *Sexual Plant Reproduction*, 3(2), 139-146.
- Chahed, T., Bellila, A., Dhifi, W., Hamrouni, I., M'hamdi, B., Kchoukand, M. E. & Marzouk, B. (2008). Pistachio (*Pistacia vera*) seed oil composition: geographic situation and variety effects. *Grasas y Aceites*, 59(1), 51-56.
- Chen, X., Velliste, M., Weinstein, S., Jarvik, J. W. & Murphy, R. F. (2003). Location proteomics - Building subcellular location trees from high resolution 3D fluorescence microscope images of randomly-tagged proteins. *Proceeding. SPIE, Manipulation and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues*, 4962, 1605-17422.
- CODEX STAN 1-1985 (1985). *General Standard for the Labelling of Prepackaged Foods*. Rome, Italy: FAO/WHO Standards.
- Costa, J., Mafra, I., Carrapatoso, I. & Oliveira, M. B. P. P. (2012). Almond Allergens: Molecular Characterization, Detection, and Clinical Relevance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(6), 1337-1349.
- Costa, J., Mafra, I., Kuchta, T. & Oliveira, M. B. (2012). Single-tube nested real-time PCR as a new highly sensitive approach to trace hazelnut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(33), 8103-8110.
- Dhingra, V., Gupta, M. Andacht, T. & Fu, Z. F. (2005). New frontiers in proteomics research: a perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 299(1-2), 1-18.
- Dooper, M. M. B. W., Plassen, C., Holden, L., Moen, L. H., Namork, E. & Egaas, E. (2008). Antibody binding to hazelnut (*Corylus avellana*) proteins: the effects of extraction procedure and hazelnut source. *Food and Agricultural Immunology*, 19(3), 229-240.
- Einali, A. R. & Sadeghipour, H. R. (2007). Alleviation of dormancy in walnut kernels by moist chilling is independent from storage protein mobilization. *Tree Physiology*, 27(4), 519-525.
- Eurich, C., Fields, P. A. & Rice, E. (2012). Proteomics: Protein Identification Using Online Databases. *American Biology Teacher*, 74(4), 250-255.
- Kafkas, S. & Doğan Y. (2009). Genetic Characterization of Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Cultivars from Turkey Using Molecular Markers. *HortScience*, 44(6), 1557-1561.
- Kendall C. W., Esfahani, A., Truan, J., Srichaikul, K. & Jenkins, D. J. (2010). Health benefits of nuts in prevention and management of diabetes. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 19(1), 110-6.
- Labuckas, D., Maestri, D. & Lamarque, A. (2011). Lipid and protein stability of partially defatted walnut flour (*Juglans regia* L.) during storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(7), 1388-1397.
- Madesisa, P., Ganopoulou, I., Bosmalia, I. & Tsaftaris, A. (2012). Barcode High Resolution Melting analysis for forensic uses in nuts: A case study on allergenic hazelnuts (*Corylus avellana*). *Food Research International*, 50(1), 351-360.
- Mattes, R. D. & Dreher, M. L. (2010). Nuts and healthy body weight maintenance mechanisms. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 19(1), 137-41.
- Mao, X. & Hua, Y. (2012). Composition, Structure and Functional Properties of Protein Concentrates and Isolates Produced from Walnut (*Juglans regia* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 1561-1581.
- Müller, U., Lüttkopf, D., Hoffmann, A., Petersen, A., Becker, W. M., Schocker, F., Niggemann, B., Altmann, F., Kolarich, D., Hausteil, D. & Vieths, S. (2000). Allergens in raw and roasted hazelnuts (*Corylus avellana*) and their cross-reactivity to pollen. *European Food Research and Technology*, 212(1), 2-12.
- Noorbakhsh, R., Mortazavi, S. A., Sankian, M., Shahidi, F., Maleki, S. J., Nasirai, L. R., Falak, R., Sima, H. R. & Varasteh, A. (2010). Influence of processing on the allergenic properties of pistachio nut assessed *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10231-10235.
- O'Neil, C. E., Keast, D. R., Fulgoni, V. L. & Nicklas, T. A. (2010). Tree nut consumption improves nutrient intake and diet quality in US adults: an analysis of National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 19(1), 142-50.
- Pinheiro do Prado, A. C., Monalise Aragão, A., Fett, R. & Block, J. M. (2009). Phenolic compounds and antioxidant activity of Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] kernel cake extracts obtained by sequential extraction. *Grasas y Aceites*, 60(5), 460-469.
- Polenta, G., Godefroy-Benrejeb, S., Delahaut, P., Weber, D. & Abbott, M. (2009). Development of a Competitive ELISA for the Detection of Pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch) Traces in Food. *Food Analytical Methods*, 3(4), 375-381.
- Polenta, G. A., Weber, D., Godefroy-Benrejeb, S. & Abbott, M. (2011). Effect of Processing on the Detectability of Pecan Proteins Assessed by Immunological and Proteomic Tools. *Food Analytical Methods*, 5(2), 216-225.
- Roux, K. H., Teuber, S. S., Robotham, J. M. & Sathe, S. K. (2001). Detection and Stability of the Major Almond Allergen in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2131-2136.
- Shahmoradi, Z., Tamaskani, F., Sadeghipour, H. R. & Abdolzadeh, A. (2012). Redox changes accompanying storage protein mobilization in moist chilled and warm incubated walnut kernels prior to germination. *Journal of Plant Physiology*, 170(1), 6-17.

- Sharma, G. M., Irsigler, A., Dhanarajan, P., Ayuso, R., Bardina, L., Sampson, H. A., Roux, K. H. & Sathe, S. K. (2011). Cloning and characterization of an 11S legumin, Car i 4, a major allergen in pecan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9542-52.
- Shridhar, K., Sathe, S. S. T., Gradziel, T. M. & Roux, K. H. (2001). Electrophoretic and Immunological Analyses of Almond (*Prunus dulcis* L.) Genotypes and Hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 2043-2052.
- Sicherer, S. H., Muñoz-Furlong, A., Godbold, J. H. & Sampson, H. A. (2010). US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(6), 1322-6.
- Soetaert, M. D. J. (2003). *Qualified Health Claims: Letter of Enforcement Discretion - Nuts and Coronary Heart Disease* (Docket No 02P-0505). Silver Spring, MD: U.S. Department of Health & Human Services. U.S. Food and Drug Administration.
- Venkatachalam, M., Kshirsagar, H. H., Seeram, N. P., Heber, D., Thompson, T. E., Roux, K. H. & Sathe, S. K. (2007). Biochemical composition and immunological comparison of select pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24), 9899-9907.
- Wakeling, L. T., Mason, R. L., D'Arcy, B.R. & Caffin, N. A. (2001). Composition of pecan cultivars Wichita and Western Schley [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] grown in Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1277-1281.
- Yada, S., Lapsley, K. & Huang, G. (2011). A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4-5), 469-480.
- Zolla, L., Rinalducci, S., Antonioli, P. & Righetti, P. G. (2008). Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications. *Journal of Proteome Research*, 7(5), 1850-1861.