

# EFECTO DE LA NIXTAMALIZACIÓN SOBRE LAS ANTOCIANINAS DEL GRANO DE MAÍCES PIGMENTADOS

## EFFECT OF ALKALINE COOKING PROCESS ON ANTHOCYANINS IN PIGMENTED MAIZE GRAIN

Yolanda Salinas-Moreno<sup>1</sup>, Fernando Martínez-Bustos<sup>2</sup>, Marcos Soto-Hernández<sup>3</sup>, Rafael Ortega-Paczka<sup>4</sup> y José L. Arellano-Vázquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Maíz. CEVAMEX-INIFAP. 56230. Chapingo, Estado de México. Apartado Postal 10. (yolysamx@yahoo.com) <sup>2</sup>Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Unidad Querétaro. 76001, Querétaro, Querétaro. Apartado Postal 1-798. <sup>3</sup>Programa de Botánica. Instituto de Recursos Naturales. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Estado de México. <sup>4</sup>Centros Regionales Universitarios. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México.

### RESUMEN

Para determinar el efecto del proceso de nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados, un grupo de 13 colectas (cinco de grano rojo y ocho de grano azul) se nixtamalizaron bajo condiciones uniformes. Se midió el cambio de color, pérdida de antocianina y modificación del perfil de antocianinas entre harina cruda y nixtamalizada. La ubicación del pigmento en el grano de maíz (en pericarpio o capa de aleurona) influyó en el color de la harina nixtamalizada y en las pérdidas de antocianina total. Las pérdidas más altas ocurrieron en los maíces con pigmento en el pericarpio y su harina nixtamalizada presentó un color café desagradable. En los maíces de grano azul, la nixtamalización provocó un incremento de la proporción de cianidina 3-glucósido en relación con lo observado en la harina cruda.

**Palabras clave:** *Zea mays*, antocianinas, color, nixtamalización.

### INTRODUCCIÓN

En la región Central de México el consumo de tortillas de maíz azul ocurre en comunidades y pueblos, durante festejos especiales. Sin embargo, es cada vez más frecuente que los comercios expendan tortillas de maíz azul los fines de semana, generalmente a un precio superior al de las normales.

Entre otras razones, a la gente le gustan las tortillas azules porque poseen un sabor más dulce y agradable que las normales. En un trabajo desarrollado por Vítores (2001)<sup>5</sup> se dieron a probar tortillas azules y blancas a un grupo de catadores de tortillas, a los cuales se les vendaron los ojos para evitar el sesgo que pudiera inducir el color. La preferencia de los catadores fue hacia las tortillas de maíz azul.

Recibido: Abril, 2003. Aprobado: Octubre, 2003.  
Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 37: 617-628. 2003.

<sup>5</sup> Vítores E. M. N. 2001. La producción, transformación y comercialización de maíz azul (*Zea mays* L.) en la zona Nor-oriente del Estado de México y sus perspectivas. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. UACH. Chapingo, México. 92p.

### ABSTRACT

A group of 13 pigmented maize varieties (five red and eight blue) were evaluated to determine anthocyanin changes during alkaline cooking process. The variables measured were color, anthocyanin losses, and modification of anthocyanin profiles between raw and nixtamalized maize flour. The location of anthocyanins in the grain had influence on the color of nixtamalized maize flour and total anthocyanin losses. The higher losses occurred in samples with anthocyanins located in the pericarp, and nixtamalized flours from these samples showed an undesirable brown color. Alkaline cooking processing of blue maize varieties caused an increase of the proportion of cyanidin 3-glucoside with relation to raw flour.

**Key words:** *Zea mays*, anthocyanins, color, nixtamalisation.

### INTRODUCTION

In the central region of México, the consumption of blue maize tortillas occurs in communities and towns, during special celebrations. However, blue maize tortillas are being sold on weekends with increasing frequency, generally at a higher price than the ordinary type.

Among other reasons, people like blue tortillas because their flavor is sweeter and superior to that of ordinary ones. In a study developed by Vítores (2001)<sup>5</sup>, both blue and white tortillas were given to a group of tasters, who had been blindfolded to avoid bias induced by color. The tasters demonstrated a preference for the blue maize tortillas.

Blue tortillas are prepared from pigmented maizes, which are present in the majority of the 41 maize varieties described in México (Ortega *et al.*, 1991). The black, purple and red tones that can be observed are due to the anthocyanins, compounds which are present in the

Las tortillas azules se preparan a partir de maíces pigmentados, que están presentes en la mayoría de las 41 razas de maíz descritas en el país (Ortega *et al.*, 1991); y los colores negros, morados y rojos que se observan se deben a las antocianinas, compuestos presentes en el pericarpio, en la capa de aleurona o en ambas estructuras del grano (Wellhausen *et al.*, 1951; Salinas, *et al.*, 1999).

Las antocianinas son compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides. Su fórmula básica está conformada por dos anillos aromáticos unidos por una estructura de tres carbonos (Gross, 1987). En su forma natural, esta estructura se encuentra esterificada a uno o varios azúcares, en cuyo caso se denominan antocianinas simples. Si además del azúcar en la molécula existe un radical acilo, entonces son antocianinas aciladas (Strack y Wray 1989).

Con pH ácido las antocianinas son muy estables, pero esta estabilidad se reduce cuando el pH se aproxima a la neutralidad, llegando a destruirse completamente con pH superior a 7 (Brouillard, 1982); sin embargo, las antocianinas de tipo acilado, como la petanina [petunidina 3-(6",4" p-coumarilramnosido)-5 glucósido] son más estables, y conservan su color característico con pH alcalino (Fossen *et al.*, 1998).

La elaboración de productos nixtamalizados de maíces pigmentados requiere que las antocianinas del grano no se destruyan completamente durante la nixtamalización, para tener productos teñidos de manera natural, por lo que es importante seleccionar maíces que preserven su color durante la nixtamalización, y que reúnan además las características físicas de grano necesarias para la elaboración de tortillas, como una dureza de endospermo intermedia o dura. Con base en lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron determinar el efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Maíces usados en el estudio

Se usaron trece muestras de grano pigmentado colectadas en cuatro diferentes estados del país. La información sobre sitios y clave de colecta, raza a la que pertenecen, color de grano, y la ubicación del pigmento en el mismo, se presenta en el Cuadro 1.

### Propiedades físicas del grano

Las propiedades físicas del grano evaluadas fueron: humedad de grano (Método 44-10, AACC, 1976); peso de mil granos, para lo cual se contaron y pesaron manualmente cien granos sanos y, el resultado se multiplicó por diez; peso hectolítrico (Método 44-11; AACC, 1976); espesor de pericarpio (Mohamed *et al.*, 1993), y densidad verdadera (Knep y Mason, 1989). De cada análisis se hicieron dos repeticiones.

pericarp, in the aleurone layer or both structures of the grain (Wellhausen *et al.*, 1951, Salinas, *et al.*, 1999).

The anthocyanins are phenolic compounds of the flavonoid group. Their basic formula is comprised of two aromatic rings united by a structure of three carbons (Gross, 1987). In its natural form, this structure is esterified to one or various sugars, in which case they are known as simple anthocyanins. If in addition to the sugar, an acyl radical is present in the molecule, they are known as acyl anthocyanins (Strack and Wray, 1989).

With an acid pH, the anthocyanins are very stable, but this stability is reduced when the pH approaches neutrality, and is completely destroyed with a pH over 7 (Brouillard, 1982). However, the acyl type anthocyanins, such as petanin [petunidine 3-(6", 4" p-coumarilramnoside)-5 glucoside] are more stable, and conserve their characteristic color with an alkaline pH (Fossen *et al.*, 1998).

For the elaboration of nixtamalized products of pigmented maize, the anthocyanins of the grain must not be completely destroyed during the alkaline cooking process, if naturally colored products are to be obtained. Therefore, it is important to select maize varieties which conserve their color during the nixtamalization process, and which also present the physical grain characteristics necessary for the elaboration of tortillas, such as an endosperm hardness ranging from intermediate to hard. Given the above, the objectives of the present study were to determine the effect of nixtamalization on the anthocyanins of pigmented maize kernels.

## MATERIALS AND METHODS

### Maize samples used in the study

Thirteen samples of pigmented grain were used, which had been collected in four different States of México. The information of sites and collection code, variety, grain color, and location of the pigment in the grain are presented in Table 1.

### Physical properties of the grain

The physical properties of the evaluated grain were: grain moisture (Method 44-10, AACC, 1976); weight of one thousand grains, for which one hundred healthy grains were counted and weighed, and the result multiplied by ten; hectolitic weight (Method 44-11; AACC, 1976); thickness of the pericarp (Mohamed *et al.*, 1993); and true density (Knep and Mason, 1989). Two repetitions were made of each analysis.

### Nixtamalization of the samples

The procedure employed was that described by Salinas and Arellano (1989), varying only the concentration of alkali (0.8%

**Cuadro 1. Información de los maíces pigmentados estudiados.**  
**Table 1. Data of the pigmented maize samples under study.**

Estados donde se recolectaron las Muestras	Clave de identificación de la recolecta <sup>†</sup>	Raza a la que pertenecen	Color del grano	Ubicación del pigmento	
				Pericarpio	Capa de Aleurona
Puebla	6816	Arrocillo Amarillo	Azul		×
	6820	Arrocillo Amarillo	Rojo	×	×
	6828	Arrocillo Amarillo	Rojo	×	×
	6840	Arrocillo Amarillo	Azul		×
Oaxaca	6866	Bolita	Azul		×
	6867	Bolita	Azul		×
	6868	Bolita	Rojo		×
	6869	Bolita	Azul		×
	6870	Bolita	Azul		×
Chihuahua	Azul	Azul × Cristalino de Chihuahua	Azul		×
	Rosita		Rojo	×	
México	6760	Elotes Chalqueños	Azul		×
	6758	Elotes Chalqueños	Rojo	×	

<sup>†</sup> La clave de la recolecta es la empleada por el Dr. Rafael Ortega Paczka (Comunicación personal, 2001). La dureza del grano se evaluó por el índice de flotación. (Salinas *et al.*, 1992).

#### Nixtamalización de las muestras

Se usó el procedimiento descrito por Salinas y Arellano (1989), variando únicamente la concentración de álcali (0.8% respecto al peso del grano), para aproximarla a la que emplean los molineros, que es de 0.7 a 1.0%. El tiempo de nixtamalización fue 30 min.

Después de un reposo de 14 a 16 horas, el nixtamal se enjuagó dos o tres veces con agua corriente y se colocó sobre toallas de papel, dejándose secar a temperatura ambiente por dos días, para después molerse en un molino tipo ciclónico (UDY, Tecator) con tamiz de 0.5 mm. La humedad de las harinas después de este proceso fue de 9 a 11%. Con esta harina se realizó el análisis de las antocianinas.

#### Color en harina cruda y nixtamalizada

La harina cruda de cada una de las muestras se obtuvo moliendo una porción de grano en el mismo molino empleado para el nixtamal seco. El color se midió en un equipo Hunter-Lab (D25 Optical Sensor) que se calibró con los mosaicos blanco y negro. Del colorímetro se obtuvieron los valores  $L^*$ ,  $a^*$ , y  $b^*$ .  $L^*$  mide la luminosidad o brillantez de la muestra, con valor de 0 para una completamente opaca, y 100 para una completamente transparente;  $a^*$  mide el color rojo de la muestra ( $+a^*$ =rojo,  $-a^*$ =verde); en tanto que  $b^*$  se relaciona con el color amarillo ( $+b^*$ = amarillo,  $-b^*$ =azul).

#### Antocianina total en muestra cruda y nixtamalizada

Se pesaron 5 g de harina a los que se añadieron 25 mL de disolvente (metanol:ácido acético:agua; 10:1:9) realizando tres extracciones sucesivas a temperatura ambiente y con agitación,

with respect to grain weight), in order to approximate the concentration used by the millers, which is 0.7 to 1.0%. The nixtamalization time was 30 min.

After being left to set for 14 to 16 hours, the nixtamal was rinsed two or three times with running water and placed on paper towels and allowed to dry at room temperature for two days. It was then ground in a cyclonic mill (UDY, Tecator) with a 0.5 mm sieve. The moisture of the flour after this process was from 9 to 11%. The analysis of the anthocyanins was performed with this flour.

#### Color in raw and nixtamalized flour

The raw flour of each sample was obtained by grinding a portion of grain in the same mill used for the dry nixtamal. The color was measured in a Hunter-Lab sensor (D25 Optical Sensor), which was calibrated with the black and white mosaics. The values  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  were obtained from the colorimeter.  $L^*$  measures the luminosity or brilliance of the sample, with a value of 0 for completely opaque, and 100 for completely transparent;  $a^*$  measures redness ( $+a^*$ =red,  $-a^*$ =green); while  $b^*$  is related to yellowness ( $+b^*$ =yellow,  $-b^*$ =blue).

#### Total anthocyanin in raw and nixtamalized sample

5 g of flour were weighed, to which 25 mL of dissolvent were added (methanol:aceticacid:water; 10:1:9), carrying out three successive extractions at room temperature and with agitation, for 24 h in the first extraction, and for 8 h in the other two. At the start of each extraction the mixture was adjusted to pH 3 with concentrated HCl. At the conclusion of each extraction, the solvent was separated from the flour and its volume was measured. An

por 24 h la primera y 8 h las dos restantes. Al inicio de cada extracción la mezcla se ajustó a pH 3 con HCl concentrado. Al término de cada extracción se separó el solvente de la harina y se midió su volumen. Una alícuota de 3 mL del extracto se centrifugó a 10 000 rpm por 20 min para eliminar la turbidez. En esta alícuota centrifugada se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Pye Unicam a 520 nm. Para los cálculos se usó una curva de calibración preparada a partir de pelargonidina clorada (Sigma Chem. Co. St. Louis MO) en concentraciones de 0 a 25 ppm.

#### **Análisis de antocianinas por HPLC en las muestras cruda y nixtamalizada**

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se depositaron 5 g de harina añadiendo 25 mL de disolvente (metanol:ácido acético:agua, 10:1:9) dejándose en refrigeración por 24 h. Después, el sobrenadante se filtró con papel filtro (Whatman No. 42) y se purificó mediante una columna de resina Ambelite XAD-7 (Sigma Chem. Co. St. Louis MO). La columna se lavó tres veces con ácido acético a 5% en agua y se eluyó con ácido acético a 5% en metanol. El extracto purificado se guardó en viales color ámbar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Se usó un equipo HPLC que consta de una bomba cuaternaria con degasificador integrado (Hewlett Packard, Serie 1100), un detector de UV-Visible (Hewlett Packard) y un inyector manual. Los dos primeros instrumentos controlados por una computadora Hewlett Packard, equipada con el software Chemical Station, versión 2000. La columna analítica empleada fue una Spherisorb ODS-2 (250×4.6 mm) con diámetro de partícula de 5 micrones. El volumen de muestra inyectado fue de 20  $\mu\text{L}$  a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min. Los disolventes empleados fueron: A = ácido fórmico:agua (5:95 v/v); B = metanol, y el siguiente sistema al sistema de gradientes: 0-6.10 min 14% B; 6.10-21.20 min 17% B; 21.20-38.80 min 23% B; 38.80-40 min 38.80% B; 40-44 min 42% B; 44-46 min 45% B; 46-55 min 100% B.

Se usaron estándares obtenidos de fuentes naturales en las que algunas antocianinas son abundantes (Macheix *et al.*, 1990). De cáscara de manzana se aisló cianidina 3-galactósido; de fresa se obtuvo la pelargonidina 3-glucósido, y de zarzamora, la cianidina 3-glucósido. El proceso de extracción y purificación de estos compuestos se realizó de acuerdo con lo descrito por Harborne (1984).

Todos los disolventes empleados fueron grado HPLC (Merck) y antes de emplearse se filtraron a través de una membrana Millipore de 0.4  $\mu\text{m}$ , lo mismo que las muestras.

#### **Análisis estadístico**

Con los datos de características físicas de grano se realizaron pruebas de Tukey ( $p=0.05$ ) empleando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, 1996) Con la información de color en harinas también se efectuaron pruebas de Tukey ( $p=0.05$ ).

aliquot of 3 mL of the extract was centrifuged at 10 000 rpm for 20 min to eliminate turbidness. In this centrifuged aliquot, the absorbancy was measured in a Pye Unicam spectrophotometer at 520 nm. For the calculations, a calibration curve was prepared from chlorinated pelargonidin (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) in concentrations of 0 to 25 ppm.

#### **Analysis of anthocyanins by HPLC in raw and nixtamalized samples**

5 g of flour were deposited into a 125 mL Erlenmeyer matrass, adding 25 mL of dissolvent (methanol:acetic acid:water; 10:1:9) and left in refrigeration for 24 h. Next, the supernatant was filtered with filter paper (Whatman NO. 42) and was purified with a column of Ambelite XAD-7 resin (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). The column was washed thrice with 5% acetic acid in methanol. The purified extract was placed in amber colored vials at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until its analysis.

An HPLC equipment was used, consisting in a quaternary pump with integrated degasifier (Hewlett Packard, series 1100), a UV-visible detector (Hewlett Packard) and a manual injector. The first two instruments were controlled by a Hewlett Packard computer, equipped with the 2000 version Chemical Station software. The analytical column employed was a Spherisorb ODS-2(250×4.6mm) with a particle diameter of 5 microns. The injected volume sample was 20  $\mu\text{L}$  at a flow speed of 0.6 mL/min. The dissolvents employed were: A=formic acid:water (5:9 v/v); B=methanol and the following system to the system of gradients: 0-6.10 min 14% B; 6.10-21.20 min 17% B; 21.20-38.80 min 23% B; 38.80-40 min 38.80% B; 40.44 min 42% B; 44.46 min 45% B; 46-55 min 100% B.

The standards used were obtained from natural sources, in which some anthocyanins are abundant (Macheix *et al.*, 1990). Cyanidin 3-galactoside was isolated from apple skin, pelargonidin 3-glucoside was obtained from strawberry, and cyanidin 3-glucoside from blackberry. The process of extraction and purification of these compounds was carried out according to Harborne (1984).

All of the dissolvents employed were grade HPLC (Merck), and were filtered through a 0.4  $\mu\text{m}$  Millipore membrane before they were used, as well as the samples.

#### **Statistical analysis**

Tukey tests ( $p=0.05$ ) were performed with the data of physical characteristics of the grain, as well as with the information of color in flours, using the SAS statistical package (Statistical Analysis System, 1996).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Physical characteristics of pigmented maize**

Table 2 shows the averages per race of some of the physical characteristics of pigmented maize varieties,

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características físicas de los maíces pigmentados

En el Cuadro 2 se presentan los promedios por raza de algunas características físicas de los maíces pigmentados, independientemente del color del grano. En la raza Arrocillo amarillo las variables peso hectolítrico (PH), densidad (D) e índice de flotación (IF) mostraron valores que corresponden a maíces de endospermo duro, en tanto las razas Elotes chalqueños y Azul×Cristalino de Chihuahua presentaron valores característicos de maíces de endospermo suave, conforme a la clasificación con base en el IF propuesta por Gomes, 1993, citado por Salinas *et al.* (1992). Los maíces de la raza Bolita presentaron una dureza de grano intermedia. El PH, la D y el IF están relacionados con la dureza del grano. Los dos primeros tienen una relación directa, es decir, a mayor dureza del grano, mayores los valores de estas variables, mientras que el IF y la dureza tienen una relación inversa (Salinas *et al.* 1992).

Se observaron diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ) del peso de mil granos (PMG) entre las cuatro razas analizadas. El mayor tamaño de grano se presentó en los maíces de la raza Elotes Chalqueños, en tanto que el menor se observó en los maíces de la raza Azul × Cristalino de Chihuahua.

En los maíces pigmentados dominaron los de endospermo suave, que presentan una gran proporción de endospermo harinoso, lo que coincide con lo reportado por Wellhausen *et al.* (1951).

Las colectas de la raza Arrocillo y una de las de la raza Bolita tuvieron un peso hectolítrico mayor de 74 kg/hl y dureza de grano (medida a través del IF), menor de 40%, características que los hace adecuados para la industria molinera-tortillera (Salinas y Pérez, 1997). Sin embargo, ninguno de los maíces estudiados satisface los estándares de calidad requeridos por la industria de botanas, la cual demanda maíces muy duros ( $IF < 12\%$ ), por lo que su aprovechamiento podría ser únicamente en la elaboración de tortillas a través del método tradicional.

independientemente del color del grano. In the yellow Arrocillo maize, the variables of hectolitic weight (PH), density (D) and flotation index (IF) showed values that correspond to maize types with hard endosperm, whereas the Chalqueño and Blue×Cristaline varieties of Chihuahua presented values characteristic of maize with soft endosperm, according to the classification based on the IF proposed by Gomes, 1993, cited by Salinas *et al.* (1992). The Bolita race maizes presented an intermediate grain hardness. The PH, D and IF are related to grain hardness. The first two are directly related, that is, the greater the hardness of the grain, the higher the values among these variables, whereas IF and hardness present an inverse relationship (Salinas *et al.*, 1992).

Statistical differences were observed ( $p \leq 0.05$ ) in the weight of one thousand grains (PMG) among the four varieties analyzed. The Elotes Chalqueños race presented the largest grain size, while the smallest size was observed in the Blue×Cristaline variety of Chihuahua.

In the pigmented varieties, those with soft endosperm predominated, which present a large proportion of floury endosperm, coinciding with the reports of Wellhausen *et al.* (1951).

The groups gathered of the Arrocillo variety and one of the Bolita race had a hectolitic weight greater than 74 kg/hl and grain hardness (measured from the IF) less than 40%, characteristics which make them adequate for the tortilla-milling industry (Salinas and Perez, 1997). However, none of the varieties studied satisfies the standards of quality required by the snack industry, which demands very hard maize ( $IF < 12\%$ ). Therefore, the usefulness of these varieties could be limited to the elaboration of tortillas using the traditional method.

### Flour color

The color of the raw flour was lighter than that of the nixtamalized one in all blue maize samples, according

**Cuadro 2. Variables físicas de los maíces pigmentados estudiados<sup>†</sup>.**  
**Table 2. Physical variables of the pigmented maize under study<sup>†</sup>.**

Razas de maíz	H	PMG	PH	EP	D	IF
Arrocillo amarillo	12.5a	268.5d	75.6a	112.5a	1.287a	27.1c
Bolita	12.1 b	368.9b	74.9a	91.5b	1.256b	57.1b
Elotes Chalqueños	12.2 b	460.6a	71.2b	105.5	1.222c	82.2a
Azul × Cristalino de Chihuahua	10.6 c	333.8c	75.2a	111a	1.234c	80.3a
DSH	0.206	29.8	1.85	10.8	0.02	19.0

<sup>†</sup>H=humedad del grano (%); PMG=peso de mil granos (g); PH=peso hectolítrico (kg/Hl); EP:espesor del pericarpio (micrómetros); D=densidad (gm L<sup>-1</sup>); IF=índice de flotación (%); DSH=diferencia significativa honesta.

Valores en la misma columna, seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey,0.05).

### Color de la harina

El color de la harina cruda fue más claro que el de la nixtamalizada en todos los maíces de grano azul, de acuerdo con los valores del parámetro L, que mide el nivel de reflectancia o brillantez de la muestra (Cuadro 3). Estos resultados se deben posiblemente a que durante la nixtamalización el pH alcalino del agua de cocimiento provoca cambios en la estructura de las antocianinas, formándose nuevos compuestos coloridos.

En las muestras de grano rojo las harinas nixtamalizadas tuvieron un color más claro que el de las respectivas harinas crudas, independientemente de que el pigmento se encuentre ubicado en el pericarpio (6820, 6828, rojo Chalco y rosa Chih.) o en la capa de aleurona (6868). Los pigmentos del pericarpio, al contacto con el álcali, adquieren un color café oscuro, lo que indica un cambio en su estructura química. Al enjuagar el nixtamal gran parte del pericarpio es eliminado, y con él los pigmentos desnaturalizados, de manera que los restos de esta estructura adheridos al grano son mínimos, por lo que su efecto sobre el color de la harina no es importante.

En todas las harinas crudas se observaron valores positivos de  $a^*$ , que corresponden a diferentes tonalidades del color rojo, y mayores a los que se presentaron en las harinas nixtamalizadas, lo cual indica la presencia de un tinte verdoso en estas últimas, que se atribuye al proceso de nixtamalización.

Considerando el color de la tortilla, los mejores maíces azules para la elaboración de productos nixtamalizados teñidos naturalmente son aquellos que presentan menor cambio en el valor de  $a^*$  una vez nixtamalizados. De los maíces de grano azul, los de la raza Arrocillo presentaron valores negativos de este parámetro en las harinas nixtamalizadas, y en la masa se observó un color azul verdoso poco atractivo.

De las harinas crudas, las de grano azul presentaron valores de  $b$  menores que las de grano rojo ( $p \leq 0.05$ ). Esto significa que las harinas crudas de grano azul

to the values of the L parameter, which measures the level of reflectancy or brilliance of the sample (Table 3). These results are possibly due to the fact that during the nixtamalization process, the alkaline pH of the cooking water causes changes in the structure of the anthocyanins, forming new color compounds.

In the samples of red grain the nixtamalized flours presented a lighter color than those of the respective raw flours, independently of whether the pigment is found in the pericarp (6820, 6828, red Chalco and pink Chih.) or in the aleurone layer (6868). The pericarp pigments, upon contact with the alkali, acquire a dark brown color, indicating a change in the chemical structure. When the nixtamal is rinsed, a great part of the pericarp is eliminated, and with it the denaturalized pigments. Thus, the remnants of this structure adhering to the grain are minimal, and their effect on the color of the flour is not important.

In all of the raw flours, positive  $a^*$  values were observed, corresponding to different tonalities of red, and these values were higher than those of the nixtamalized flours, thus indicating the presence of a greenish tint in the latter, which is attributable to the nixtamalization process.

Regarding the color of the tortilla, the best blue maize varieties for the elaboration of naturally tinted nixtamalized products are those which present the least change in the  $a^*$  value after nixtamalization. Of the blue maize varieties, Arrocillo presented negative values of this parameter in the nixtamalized flours, and an unattractive greenish blue color was observed in the dough.

Of the raw flours, those of blue maize presented  $b$  values lower than those of the red grain ( $p \leq 0.05$ ). This means that the raw flours of blue maize presented a tint which was less yellowish than that of the raw red flours. The nixtamalization process generates a yellow tone in the dough or flour; the intensity of this tone depends on the percentage of pericarp retained by the grain after nixtamalization. If more pericarp is retained, the yellow tonality is more intense than if little pericarp is retained. It may be that in the samples in which the nixtamalized flour was not as yellow as the raw flour, the percentage of retained pericarp was very low.

There were no significant differences in the  $b$  value between the raw and nixtamalized flours of the red and blue maize samples, although this value was numerically higher in the raw flours than in the nixtamalized flours.

Part of the anthocyanins of the grain were destroyed in the alkaline cooking process (Table 4). The percentage of loss was different among the evaluated samples, and was associated with the location of the pigment in the grain. The maize with pigment in the pericarp presented greater losses of anthocyanin during the nixtamalization process, with values ranging between 73 and 100%.

**Cuadro 3. Color de la harina cruda y nixtamalizada de los maíces pigmentados.**

**Table 3. Color of raw and nixtamalized flour of the pigmented maize samples.**

Color del grano	Tipo de harina <sup>†</sup>					
	L		a		b	
	C	N	C	N	C	N
Rojo	62.08 a	65.68 a	3.56 a	0.88 b	4.78 a	3.73 a
Azul	64.31 a	54.47 b	1.68 b	0.63 b	1.52 b	1.43 b

<sup>†</sup>C = cruda; N = nixtamalizada.

presentaron un tinte menos amarillo que el de las crudas de grano rojo. La nixtamalización genera una tonalidad amarilla en la masa o la harina; la intensidad de esta tonalidad depende del porcentaje de pericarpio que el grano retiene después de la nixtamalización. Si retiene más pericarpio, la tonalidad amarilla es más intensa que si retiene poco. Posiblemente en las muestras cuya harina nixtamalizada fue menos amarilla que la harina cruda, el porcentaje de pericarpio retenido fue muy bajo.

No existieron diferencias significativas del valor de *b* entre las harinas crudas y las nixtamalizadas de los maíces de grano rojo y azul; aunque este valor fue numéricamente mayor en las harinas crudas, en relación con las nixtamalizadas.

Con la nixtamalización se destruyen parte de las antocianinas del grano de maíz (Cuadro 4). El porcentaje de pérdida varió entre las muestras evaluadas, y estuvo asociado con la ubicación del pigmento en el grano. Los maíces con pigmento en el pericarpio presentaron mayores pérdidas de antocianina durante la nixtamalización, con valores entre 73 y 100%.

Entre los maíces con pigmento sólo en la capa de aleurona, el porcentaje de pérdida fue variable, ubicándose entre 19.5 y 50.2%.

Dado que todas las muestras fueron nixtamalizadas bajo las mismas condiciones y con un tiempo de 30 min, las diferencias en el porcentaje de pérdida se deben al patrón de antocianinas presente en cada muestra, y posiblemente a la protección que el pericarpio pudiera proporcionar a los pigmentos. Las colectas de maíz de la raza Bolita fueron las que menor porcentaje de pérdida presentaron.

Gran parte de los estudios que existen sobre la estabilidad de las antocianinas se han desarrollado evaluando el comportamiento de estos pigmentos con pH ácido, que son los que comúnmente se presentan en los alimentos factibles de teñir con estos compuestos (Sarni-Manchado *et al.*, 1996; Cormier *et al.*, 1997). Fossen *et al.* (1998) evaluaron la estabilidad de la cianidina 3-glucósido y la petanina, que es una antocianina diglucósido con un radical acilo en su estructura, en un intervalo de pH entre 1 y 9, destacando que la petanina es estable con pH ligeramente alcalino (8 a 9), en tanto que la cianidina 3-glucósido, que es una antocianina simple monoglucósido, se modifica con pH mayor de 5.

El pH durante la nixtamalización es de entre 11 y 12, y la temperatura de cocimiento supera 90 °C, de manera que en este proceso se conjugan dos de los factores a los que las antocianinas son más susceptibles (Markakis, 1982), y aunque el tiempo es corto, las condiciones son muy drásticas, y suficientes para destruir el pigmento del pericarpio del grano.

Con pH alcalino, el anillo de piridium de la antocianina se rompe, y el color azul desaparece para

**Cuadro 4. Porcentaje de pérdida de antocianina total durante el proceso de nixtamalización en trece muestras de maíces pigmentados.**

**Table 4. Percentage of total anthocyanin loss during the nixtamalization process in thirteen samples of pigmented maize.**

Muestra	Concentración de antocianinas (ppm)		
	Harina cruda	Harina nixtamalizada	Porcentaje de pérdida
6820	779	52	93.3
6828	690	87	87.4
6816	134	82	38.8
6840	143	71	50.2
6866	115	76	33.8
6867	127	87	31.5
6868	88	71	19.5
6869	134	87	35.1
6870	175	117	33.1
Rojo Chihuahua	35	0	100
Azul Chihuahua	157	89	43.7
Rojo Chalco	36	10	73
Azul Chalco	192	101	47.5

Among the maize samples with pigment located only in the aleurone layer, the percentage of loss was variable, ranging between 19.5 and 50.2%.

Given that all of the samples were nixtamalized under the same conditions and for a period of 30 min, the differences in the percentage of loss are due to the anthocyanin pattern present in each sample, and possibly to the protection that the pericarp could provide to the pigments. The group of samples of the Bolita variety presented the lowest percentage of loss.

Many of the existing studies on the stability of anthocyanins have been developed evaluating the behavior of these pigments with acid pH, which are those generally present in foods which can be tinted with these compounds (Sarni-Manchado *et al.*, 1996; Cormier *et al.*, 1997). Fossen *et al.* (1998) evaluated the stability of the cyanidin 3-glucoside and the petanin, which is a diglucoside anthocyanin with an acyl radical in its structure, in a pH interval between 1 and 9 mentioning that. The petanin is stable with a slightly alkaline pH (8 to 9), whereas the cyanidin 3-glucoside, which is a simple monoglucoside anthocyanin, is modified when the pH is greater than 5.

The pH during nixtamalization is between 11 and 12, and the cooking temperature is above 90 °C. Therefore, two of the factors to which anthocyanins are most susceptible are conjugated in this process (Markakis, 1982), and although the time is short, the conditions are very drastic, and sufficient to destroy the pigment of the grain's pericarp.

dar paso a una coloración amarillo pálida, que es representativa de la chalcona ionizada. Esta etapa no es muy estable y el color amarillo desaparece más o menos rápido, dependiendo del pH. Una vez que se alcanza este estado, aun cuando se acidifique el medio, ya no es posible regenerar la estructura de la antocianina, y entonces se puede decir que el pigmento se ha destruido (Brouillard, 1982).

### **Patrón de antocianinas en harina cruda y nixtamalizada**

#### **Maíces de grano rojo**

No fue posible identificar todas las antocianinas presentes en las muestras analizadas porque no existen estándares comerciales para todos, sobre todo para las antocianinas aciladas, que en los cromatogramas corresponden a las de mayores tiempos de retención.

En los maíces que presentan antocianinas únicamente en el pericarpio, como el caso del maíz rojo de Chihuahua, con la nixtamalización se destruyen prácticamente todas las antocianinas, por lo que en la harina nixtamalizada no existen estos compuestos (Figura 1, A).

Durante la nixtamalización de los maíces con pigmento en pericarpio y capa de aleurona (muestra 6828), el pericarpio adquiere un color café como resultado de la degradación de las antocianinas por el elevado pH.

El pericarpio, al ser solubilizado por la acción del álcali, se desprende y se elimina cuando se enjuaga el nixtamal, de manera que las dos antocianinas que se observan en la muestra nixtamalizada son las que provienen de la capa de aleurona, y corresponden a cianidina 3-glucósido (1) y a un derivado de cianidina (6) que, por su tiempo de retención largo, podría ser una antocianina acilada.

Los cambios en el perfil de antocianinas entre las harinas cruda y nixtamalizada fueron básicamente en el porcentaje relativo de la pelargonidina 3-glucósido (1) y la antocianina 4, que fue mayor en la muestra nixtamalizada que en la cruda. La antocianina 6 mostró una reducción de su porcentaje en la muestra nixtamalizada, con relación al de la cruda.

Estos cambios podrían deberse al efecto que el pH alcalino tiene sobre las antocianinas, sobre todo las de tipo acilado, que son las de mayores tiempos de retención. El enlace éster que une al radical acilo con el glucósido en este tipo de antocianinas es inestable con pH alcalino, por lo que posiblemente se rompe, liberando el radical acilo y quedando únicamente la antocianina simple.

La estabilidad de las antocianinas de la muestra 6868 a condiciones extremas de temperatura y pH durante la nixtamalización, ya se había apreciado al comparar el

With an alkaline pH, the pyridium ring of the anthocyanin is broken, and the blue coloration disappears to give way to a pale yellow, which is representative of the ionized chalcona. This stage is not very stable and the yellow coloration disappears more or less rapidly, depending on the pH. Once this state has been reached, even when the medium is acidified, it is no longer possible to regenerate the structure of the anthocyanin, and it can be said that the pigment has been destroyed (Brouillard, 1982).

### **Pattern of anthocyanins in raw and nixtamalized flour**

#### **Red maize**

It was not possible to identify all of the anthocyanins present in the analyzed samples, because there are no commercial standards for all of them, especially for the acyl anthocyanins, which correspond to the longest times of retention in the chromatograms.

In the maizes which present anthocyanins only in the pericarp, as in the case of the red Chihuahua grain, practically all of the anthocyanins are destroyed with nixtamalization; therefore, these compounds are not present in the nixtamalized flour (Figure 1, A).

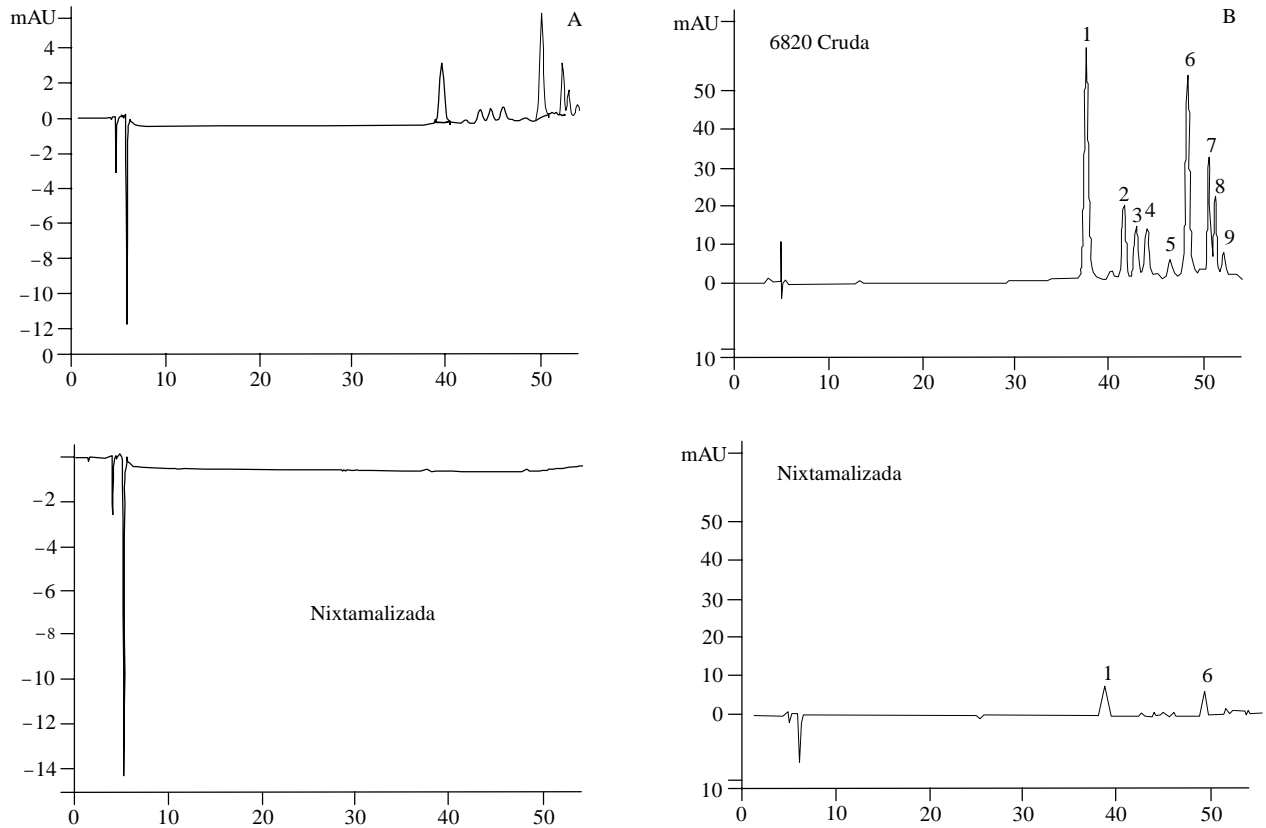
During nixtamalization of the maizes with pigment in the pericarp and aleurone layer (sample 6828), the pericarp acquires a brownish coloring as a result of the degradation of the anthocyanins due to the elevated pH. As the pericarp becomes solubilized by the action of the alkali, it becomes detached and is eliminated when the nixtamal is rinsed. Therefore, the two anthocyanins which are observed in the nixtamalized sample are those from the aleurone layer, and correspond to cyanidin 3-glucoside (1) and to a cyanidin derivative (6), which, due to its long retention time, could be an acyl anthocyanin.

The changes in the anthocyanin profile between the raw and nixtamalized flours were basically in the relative percentage of the pelargonidin 3-glucoside and the anthocyanin 4, which was greater in the nixtamalized sample than in the raw one. Anthocyanin 6 presented a reduction in percentage in the nixtamalized sample, in relation to that of the raw sample.

These changes could be a result of the effect that the alkaline pH has on the anthocyanins, especially those of the acyl type, which present the longest retention times. The ester link which unites the acyl radical with the glucoside in this type of anthocyanins is unstable with alkaline pH, and thus may break, liberating the acyl radical, remaining only the simple anthocyanin.

The stability of the anthocyanins of sample 6868 in presence of extreme temperature conditions and pH during the alkaline cooking process had already been

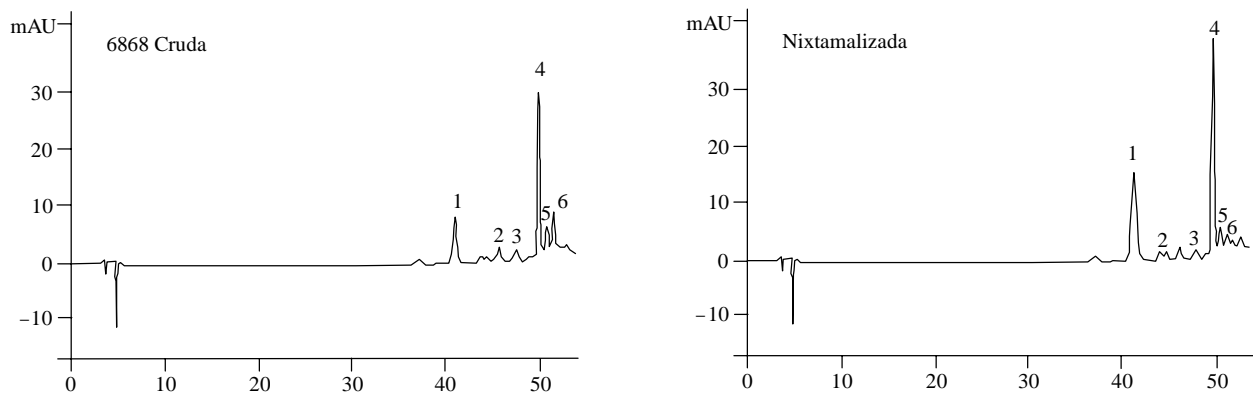




Antocianinas identificadas 1: cianidina 3-glucósido; 3: pelargonidina 3-glucósido; 4: peonidina 3-glucósido; 5: malvidina 3-glucósido.

**Figura 1.** Cromatogramas de las harinas cruda y nixtamalizada obtenidas de las muestras Rojo Chihuahua (A) y 6828 (B), con pigmentos en pericarpio, y en pericarpio y capa de aleurona, respectivamente.

**Figure 1.** Chromatograms of raw and nixtamalized flours obtained from samples of red Chihuahua (A) and 6828 (B), with pigment in the pericarp, and in pericarp and aleurone layer, respectively.



Antocianinas identificadas 1: pelargonidina 3-glucósido; 2: malvidina 3-glucósido

**Figura 2.** Cromatogramas de grano crudo y nixtamalizado de la muestra de grano rojo (6868) con pigmentos sólo en la capa de aleurona.

**Figure 2.** Chromatograms of raw and nixtamalized grain from the red grain sample (6868), with pigment in the aleurone layer only.

color de la harina cruda y nixtamalizada, entre las que se observaron mínimos cambios (Cuadro 3). Este comportamiento podría deberse al tipo de antocianinas que presenta, que se derivan principalmente de la pelargonidina (Salinas *et al.*, 1999).

Los maíces de grano rojo con antocianinas en mayor proporción o exclusivamente en el pericarpio, no son adecuados para la elaboración de productos nixtamalizados teñidos de manera natural, ya que el pericarpio, al contacto con el álcali, adquiere un color café pardo, que podría provenir de la destrucción de las antocianinas por el elevado pH, ya que, de acuerdo con Brouillard (1982), cuando el pH del medio es mayor de 7, estos compuestos son destruidos.

### Maíces de grano azul

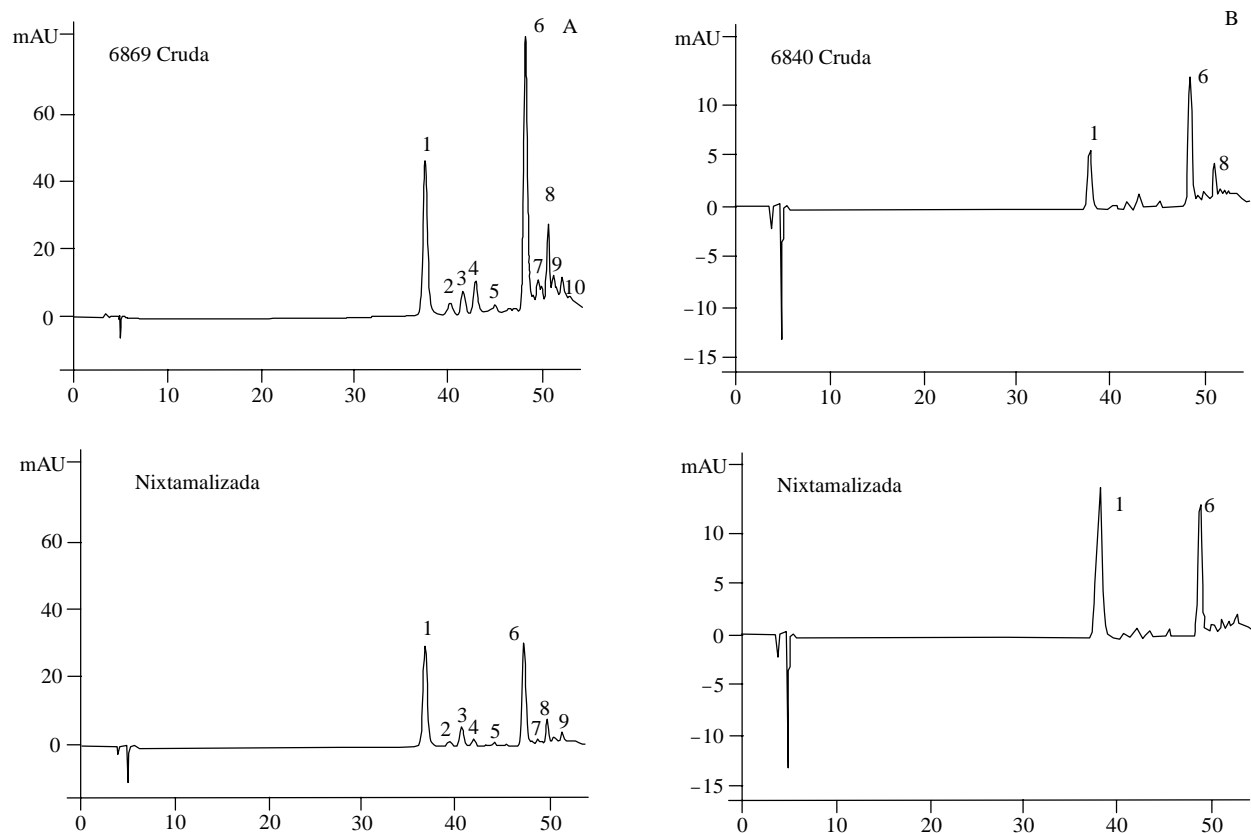
El efecto de la nixtamalización sobre el patrón de antocianinas en las muestras de maíz azul (con pigmento sólo en la capa de aleurona) se manifestó reduciendo las proporciones relativas de algunas de éstas, como

observed when comparing the color of the raw and nixtamalized flour, in which minimum changes were observed (Table 3). This behavior may be due to the type of anthocyanins present, derived mainly from pelargonidin (Salinas *et al.*, 1999).

The red maizes with anthocyanins in greater proportion or exclusively in the pericarp, are not adequate for the elaboration of naturally tinted nixtamalized products, because the pericarp, as it comes into contact with the alkali, acquires a dark brown coloration. This may be a result of the destruction of the anthocyanins by the elevated pH since, according to Brouillard (1982), when the pH of the medium is greater than 7, these compounds are destroyed.

### Blue maize varieties

The effect of nixtamalization on the anthocyanin pattern in the blue maize samples (with pigment only in the aleurone layer) was manifested in a reduction of the relative proportions of the anthocyanins, as occurred with



Antiocianinas identificadas 1: cianidina 3-glucósido; 2: pelargonidina 3-glucósido; 4: malvidina 3-glucósido.

**Figura 3. Cromatogramas de harina cruda y nixtamalizada de los maíces de grano azul 6869 y 6840.**  
**Figure 3. Chromatograms of raw and nixtamalized flour of blue grain maize 6869 and 6840.**

ocurrió con las antocianinas 6 y 8, e incrementando el porcentaje relativo de la antocianina 1 (cianidina 3-glucósido). Este comportamiento fue similar en las ocho muestras de maíz azul. Por razones de espacio sólo se presentan los cromatogramas de dos de ellas (Figura 3, A y B).

En la muestra de harina cruda, los picos 1 y 6 presentan una diferencia notable entre sí, y los porcentajes relativos de cada antocianina son 24.0% y 36.9% respectivamente (datos no mostrados); sin embargo, en la muestra nixtamalizada el porcentaje relativo de la antocianina 1 se incrementa a 42.4%, en tanto que en la 6 se redujo a 35.8%. El mismo comportamiento se observó en la muestra 6840, en la que los porcentajes relativos de estas antocianinas en la muestra cruda fueron 31.0% y 58.9%, respectivamente, mientras que en la muestra nixtamalizada cambiaron a 58.1% y 41.9% en el mismo orden (datos no mostrados).

Las diferencias en las proporciones relativas de cada antocianina no son fáciles de apreciar en los cromatogramas de harina cruda y nixtamalizada, ya que algunas antocianinas prácticamente desaparecen en el cromatograma de harina nixtamalizada.

El incremento de la proporción de la cianidina 3-glucósido en la harina nixtamalizada de los maíces de grano azul podría estar relacionado con la degradación de las antocianinas 6 y 8, que son de tipo acilado, y de acuerdo con los reportes de Fossen *et al.*, (2001) y de Pascual-Teresa *et al.*, (2002) corresponden a cianidina 3-(6"-malonilglucósido) y cianidina 3-(3",6" dimalonilglucósido), en ese orden. Ambas son derivados de la cianidina y posiblemente el enlace éster con el que está unido el radical malonil al azúcar, sea sumamente inestable a las condiciones de temperatura y pH que se dan durante el proceso de nixtamalización, y sean degradadas a cianidina 3-glucósido.

### CONCLUSIONES

Durante el proceso de nixtamalización hay destrucción de antocianinas, siendo mayor en los maíces con pigmento en el pericarpio. En los maíces de grano azul la nixtamalización provoca oscurecimiento de la harina, en tanto que en los de grano rojo este proceso no tiene efecto sobre su color. El proceso de nixtamalización modifica el patrón de antocianinas, incrementando el porcentaje relativo de la antocianina 3 glucósido en maíces de grano azul.

### AGRADECIMIENTOS

Parte de esta investigación fue financiada con apoyo del CONACYT a través del Proyecto 137936-B.

anthocyanins 6 and 8, and an increase in the relative percentage of anthocyanin 1 (cyanidin 3-glucoside). This behavior was similar in the eight samples of blue maize. For reasons of space, the chromatograms of only two of the samples are presented (Figure 3, A and B).

In the raw flour sample, peaks 1 and 6 present a notable difference between them, and the relative percentages of each anthocyanin are 24.0% and 36.9%, respectively (data not shown). However, in the nixtamalized sample the relative percentage of anthocyanin 1 increased to 42.4%, whereas anthocyanin 6 decreased to 35.8%. The same behavior was observed in sample 6840, in which the relative percentages of these anthocyanins in the raw sample were 31% and 58.9%, respectively, while in the nixtamalized sample these percentages changed to 58.1% and 41.9% in the same order (data not shown).

The differences in the relative proportions of each anthocyanin are not easily observed in the chromatograms of raw and nixtamalized flour, given that some anthocyanins practically disappear in the chromatogram of nixtamalized flour.

The increase in proportion of the cyanidin 3-glucoside in the nixtamalized flour of the blue maize could be related to the degradation of anthocyanins 6 and 8, which are of the acyl type, and according to the reports of Fossen *et al.* (2001) and of Pascual-Teresa *et al.* (2002), correspond to cyanidin 3-(6"-malonilglucoside) and cyanidin 3-(3", 6" dimalonilglucoside), in that order. Both are derivatives of the cyanidin, and possibly the ester link with which the malonyl radical is united to the sugar is very unstable under the conditions of temperature and pH which occur during the alkaline cooking process, and are degraded to cyanidin 3-glucoside.

### CONCLUSIONS

During the alkaline cooking process anthocyanins are destroyed, mainly in maize with pigment in the pericarp. In the blue grain maize, the nixtamalization process provokes darkening of the flour, whereas in the case of red maize, the process does not affect the color. Nixtamalization modifies the anthocyanin pattern, thus increasing the relative percentage of the 3-glucoside anthocyanin in blue maize varieties.

—End of the English version—



### LITERATURA CITADA

American Association of Cereal Chemists (AACC). 1976. Approved methods of the AACC. The Association. 7<sup>th</sup>. edition. St. Paul, MN.

- Brouillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. *In: Anthocyanins as food colors*. P. Markakis (ed). Academic Press. New York. pp: 1-38.
- Cormier, F., R. Couture, C. B. Do, T. Q. Pham, and V. H. Tong. 1997. Properties of anthocyanins from grape cell culture. *J. Food Sci.* 62(2): 246-248.
- de Pascual-Teresa, S., C. Santos-Buelga, and J.C. Rivas-Gonzalo. 2002. LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *J. Sci. Food Agric.* 82: 1003-1006.
- Fossen, T., L. Cabrita, and O.M. Andersen. 1998. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry* 63(4): 435-440.
- Fossen, T., R. Slimestad, and O. M. Andersen. 2001. Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *J. Agric. Food Chem.* 49: 2318-2321.
- Gross, J. 1987. *Pigments in fruits*. Academic Press. NY. pp: 59-63.
- Harbone, J. B. 1984. *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Ed. Chapman and Hall. UK. pp: 61-68.
- Kniep, K. R., and S. C. Mason. 1989. Kernel breakage and density of normal and opaque-2 maize grain as influenced by irrigation and nitrogen. *Crop Sci.* 29: 158-163.
- Macheix, J. J., A. Fleuriot, and J. Billot. 1990. *Fruit phenolics*. CRC Press, Inc. Boca Ratón, FL. pp: 105-148.
- Markakis, P. 1982. Stability of anthocyanins in foods. *In: Anthocyanins as food colors*. P. Markakis (ed) Academic Press. New York. pp: 163-178.
- Mohamed, A. A., R. B. Ashman, and A. W. Kirleis. 1993. Pericarp thickness and other kernel physical characteristics related to microwave popping quality of popcorn. *Journal of Food Science* 58(2): 340-342.
- Ortega, P., R. A., J. Sánchez, G. F., Castillo G., y J. M. Hernández C. 1991. Estado actual de los estudios sobre maíces nativos de México. *In: Avances en el estudio de los recursos fitogenéticos de México*. R. Ortega P., G. Palomino H., F. Castillo G., V. A. González H., y M. Livera M. (eds) SOMEFI, A. C. México. pp: 161-196.
- SAS Institute. 1996. *SAS/STAT Guide for Personal Computers, Versión 6.12*. SAS Institute. Cary, N.C. 1028 p.
- Salinas M, Y., y J. L. Arellano V. 1989. Calidad nixtamalera y tortillera de híbridos de maíz con diferente tipo de endospermo. *Rev. Fitotec. Méx.* 12: 129-135.
- Salinas M., Y., J. L. Arellano V., y F. Martínez B. 1992. Propiedades físicas, químicas y correlaciones de maíces híbridos precoces para Valles Altos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 42: 161-167.
- Salinas M. Y., y P. Pérez H. 1997. Calidad nixtamalera-tortillera en maíces comerciales de México. *Rev. Fitotec. Mex.* 20: 121-136.
- Salinas M.Y., M Soto H, F Martínez B, V González H, y R Ortega P. 1999. Análisis de antocianinas en maíces de grano azul y rojo provenientes de cuatro razas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 22: 161-174.
- Sarni-Manchado, P., H. Fulcrand, J. M. Souquet, V. Cheynier, and M. Moutounet. 1996. Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *J. Food Sci.* 61(5): 938-941.
- Strack, D., and V. Wray. 1989. Anthocyanins. *In: Methods in plant Biochemistry*. Vol. I. Plant Phenolics. H. B. Harborne (ed.). Academic Press, N.Y. pp: 325-356.
- Wellhausen, E. J., L. M. Roberts, E. Hernández X., and P. C. Mangelsdorf. 1951. Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución. *In: Xolocotzia. Obras del Efraín Hernández Xolocotzi*. Revista de Geografía Agrícola. Tomo II. Universidad Autónoma Chapingo.