

# COMPUESTOS FENÓLICOS DEL GRANO DE MAÍZ Y SU RELACIÓN CON EL OSCURECIMIENTO DE MASA Y TORTILLA

## PHENOLIC COMPOUNDS OF MAIZE GRAIN AND THEIR RELATIONSHIP WITH DARKENING IN DOUGH AND TORTILLA

Yolanda Salinas-Moreno<sup>1</sup>, José de J. López-Reynoso<sup>2</sup>, Guadalupe B. González-Flores<sup>3</sup> y Gricelda Vázquez-Carrillo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Calidad de Maíz. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP). 56230. Chapingo, Estado de México. (yolysamx@yahoo.com.mx). <sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia. <sup>3</sup>Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. (jjlr200@yahoo.com.mx)

### RESUMEN

Algunos de los híbridos y variedades de maíz cultivados en el Estado de México producen masa y tortilla que se oscurecen. No se conoce la causa de este oscurecimiento, pero los compuestos fenólicos del grano podrían estar involucrados. Los objetivos del presente estudio fueron determinar si el contenido de compuestos fenólicos en el grano de maíz está relacionado con el oscurecimiento de masa y tortilla en los maíces evaluados, y obtener el perfil de ácidos fenólicos en muestras de maíz cuya masa y tortilla presenta este fenómeno. Se utilizaron 10 muestras de maíces seleccionadas por el color de sus tortillas: cinco se clasificaron como muestras que oscurecen (MQO) y cinco como muestras que no oscurecen (MQNO). Se cuantificó el contenido de fenoles libres (FL) y totales (FT) en endospermo y pericarpio del grano crudo, así como en masa y tortilla mediante el método de Folin-Cicalteu; el perfil de ácidos fenólicos se obtuvo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La mayor concentración de FL y FT se presentó en el pericarpio del grano, sin diferencias significativas entre las MQO y las MQNO; en el endospermo se encontró una mayor concentración de estos compuestos en las MQO con relación a las MQNO. Esta misma tendencia se observó para masa y tortilla, donde el contenido de FT en esta última fue 39 % mayor en las MQO que en las MQNO. En el pericarpio y endospermo del grano crudo de los dos grupos de muestras se observaron los ácidos *p*-cumárico, ferúlico y sinápico, con mayor proporción del ferúlico. Estos mismos ácidos se encontraron en el extracto de fenoles libres de masa de ambos grupos de muestras.

**Palabras claves:** Ácidos fenólicos, maíz, nixtamalización, oscurecimiento, tortilla.

### INTRODUCCIÓN

**E**n el Estado de México el maíz se produce a alturas entre 2200 y 2600 m y se cultivan principalmente maíces criollos, ya que la semilla

### ABSTRACT

Some maize varieties and hybrids cultivated in the State of México become dark when made into dough and tortillas. The cause of this darkening is not known, but phenolic compounds in the grain could be involved. The objectives of this study were to determine whether the content of phenolic compounds in maize grain is related to darkening of dough and tortillas made from the evaluated maize varieties, and to obtain the profile of phenolic acids in samples of maize whose dough and tortillas exhibit this phenomenon. Ten samples of maize selected for the color of their tortillas were used: five were classified as samples that darken (MQO) and five were classified as samples that do not darken (MQNO). The content of free (FL) and total (FT) phenols was quantified in the endosperm and pericarp of the raw grain, as well as in dough and in tortillas following the method of Folin-Cicalteu; the phenolic acid profiles was obtained with high precision liquid chromatography (HPLC). The highest concentration of FL and FT was found in the grain pericarp, with no significant differences between the MQO and MQNO. In the endosperm a higher concentration of these compounds was found in the MQO than in the MQNO. This same trend was observed for dough and tortilla, where FT content of the latter was 39% higher in MQO than in MQNO. In the raw-grain pericarp and endosperm of both groups of samples *p*-cumaric, ferulic, and sinapic acids were observed; the proportion of ferulic acid was higher. These same acids were found in the free phenol extract from dough of both groups of samples.

**Key words:** Phenolic acids, maize, nixtamalization, darkening, tortilla.

### INTRODUCTION

**I**n the State of México, maize is produced at altitudes between 2200 and 2600 m, and mainly landraces are grown; improved seed is sown on less than 20% of the cultivated area. Of all of the maize produced, nearly 300 thousand t year<sup>-1</sup> is sold on the market, but marketing is problematic since this maize produces grayish dough and tortillas, and thus acceptance by

Recibido: Febrero, 2006. Aprobado: Diciembre, 2006.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 41: 295-305. 2007.

mejorada se usa en menos de 20% de la superficie cultivada. Del total del maíz producido, cerca de 300 mil t año<sup>-1</sup> se ofertan al mercado, pero tienen problemas para su comercialización debido a que producen masa y tortilla de colores grises que afectan su aceptación por el consumidor<sup>4</sup>. Por esta razón su precio es inferior al de los maíces de Sinaloa, los cuales se consideran con muy buena calidad para elaborar estos productos.

Entre las reacciones de oscurecimiento en alimentos está la que ocurre por la polifenoloxidasas (PFO) que cataliza dos reacciones de muchos fenoles, generando compuestos como el *p*-cresol y la *o*-benzoquinona, cuya oxidación y polimerización conduce a la formación de melaninas, responsables del oscurecimiento en frutas y verduras (Fenema, 2000). El oscurecimiento de la masa y tortilla de algunos maíces no puede ser producto de una reacción enzimática de este tipo, ya que el pH alcalino (11-13) y la alta temperatura durante la nixtamalización inactivarían cualquier enzima, particularmente la PFO cuyo pH de actividad es 3 a 6 (Núñez-Delgado *et al.*, 2005) y se ubica en el pericarpio y la capa de aleurona del grano (Hatcher y Kruger 1997). Otra reacción de oscurecimiento en alimentos es la de Maillard, producida por calentamiento o almacenamiento, y se debe a una reacción química entre azúcares reductores, principalmente D-glucosa, y un aminoácido libre. Tampoco es factible que ésta sea la responsable, ya que los niveles de grupos reactivos de aminoácidos y azúcares no son suficientes para que se desarrolle esta reacción química (Carmen Durán)<sup>5</sup>. Una tercera es la oxidación de fenoles como el ácido *p*-hidroxibenzoico, catecol, ácido caféico, gossipol y quercitina, por acción del oxígeno atmosférico a pH alcalino, hacia quinonas que pueden sufrir reacciones de condensación y formar compuestos pardos como las melaninas y melanoidinas (Fenema, 2000).

Hay pocos reportes sobre oscurecimiento de productos alimenticios derivados de cereales; hay algunos en trigo (Fuerts *et al.*, 2006) y cebada (Quinde *et al.*, 2004) donde se considera la posible participación de los compuestos fenólicos. Por tanto, los objetivos del estudio fueron determinar si el contenido de compuestos fenólicos en el grano de maíz está relacionado con el oscurecimiento de masa y tortilla y determinar si el perfil de ácidos fenólicos es el mismo en las muestras que oscurecen o no la tortilla.

consumers<sup>4</sup> is affected. For this reason, prices are lower than maize from Sinaloa, which is considered of very good quality for tortilla making.

Among the reactions that darken food is that which occurs by polyphenoloxidase (PFO), which catalyzes two reactions of many phenols, generating compounds such as *p*-cresol and *o*-benzoquinone. Their oxidation and polymerization leads to the formation of melanins, which are responsible for darkening in fruits and vegetables (Fenema, 2000). Darkening of dough and tortilla made from some maize varieties can not be the product of an enzymatic reaction of this type since the alkaline pH (11-13) and the high temperatures during nixtamalization would inactivate any enzyme, particularly PFO, which is found in the pericarp and aleurone layer of the grain (Hatcher and Kruger, 1997) and is active at a pH of 3 to 6 (Núñez-Delgado *et al.*, 2005). Another darkening reaction in food is that of Maillard; produced by heating or storage, it is due to a chemical reaction among reducing sugars, principally D-glucose, and a free amino acid. Neither is it feasible that this be the cause since the levels of reactive amino acid and sugar groups are not sufficient for this reaction to develop this chemical reaction (Carmen Durán)<sup>5</sup>. A third possibility is oxidation of phenols such as *p*-hydroxybenzoic acid, catechol, caffeic acid, gossypol and quercetin, through the action of atmospheric oxygen at alkaline pH, resulting in quinones that can undergo reactions of condensation and form brown compounds such as melanins and melanoids (Fenema, 2000).

There are few reports on darkening of food products derived from cereals: there are some in wheat (Fuerts *et al.*, 2006) and barley (Quinde *et al.*, 2004) in which the possible participation of phenolic compounds is considered. Therefore, the objectives of this study were to determine whether the content of phenolic compounds in maize grain is related to darkening of dough and tortillas, and to determine whether the profile of phenolic acids is the same in the samples that darken, or do not darken, the tortilla.

## MATERIALS AND METHODS

Ten maize samples were used: five selected because of the darkening of their tortillas and denominated samples that darken (STD) and five selected because darkening does not occur and denominated samples that do not darken (STND).

<sup>4</sup> SEDAGRO, 2003. Proyecto estratégico del maíz. Documento del taller de la cadena agroalimentaria de maíz grano para Valles Altos. Febrero de 2003. p:21.

<sup>5</sup> Comunicación Personal, 2004.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon 10 muestras de maíz: cinco seleccionadas por el oscurecimiento de sus tortillas, denominadas como muestras que oscurecen (MQO); y cinco por no presentar oscurecimiento, denominadas como muestras que no oscurecen (MQNO).

### Caracterización física del grano

Las determinaciones físicas fueron: peso hectolítrico (método 14-40; AACC, 1976), índice de flotación (Salinas *et al.*, 1992), peso de 100 granos, color de grano medido como porcentaje de reflectancia con el colorímetro Agtrón 500, usando el selector de color en verde (546 nm). Todos los análisis se hicieron al menos por duplicado.

### Variables de nixtamalización

Para la nixtamalización se usaron 100 g de grano con 0.7 g de óxido de calcio y 200 mL de agua destilada (Salinas y Arellano, 1989), que se mezclaron en un vaso de precipitados (600 mL) y calentados hasta ebullición (92 °C). Con base en la dureza del grano, medida con el índice de flotación, se calculó el tiempo de nixtamalización para cada muestra.

El grano nixtamalizado se reposó 14 a 16 h a temperatura ambiente, con los vasos cubiertos con un vidrio de reloj para reducir la evaporación. Se separó el agua de cocimiento y el nixtamal se lavó con agua potable para eliminar parte del pericarpio y residuos de cal. El nixtamal se molió en un molino de piedras tradicional artesanal para obtener la masa. Las tortillas se prepararon con 20 g de masa usando una prensa manual metálica hasta un diámetro de  $12.5 \pm 1$  cm y grosor de  $1.19 \pm 1$  mm. El cocimiento se hizo en un comal metálico a una temperatura de  $150 \pm 10$  °C.

Las variables evaluadas fueron humedad de nixtamal, humedad de tortilla y pérdida de sólidos (Salinas y Arellano, 1989); el pericarpio retenido se cuantificó determinando el contenido de pericarpio en el grano, luego se hizo la nixtamalización, se enjuagó el nixtamal y se cuantificó el pericarpio adherido al grano. Con el dato del porcentaje de pericarpio en el grano crudo y el obtenido en el grano nixtamalizado se calculó el porcentaje de pericarpio remanente.

El color de la tortilla se determinó con el colorímetro empleado para medir el color del grano crudo.

### Fenoles libres y totales en grano crudo

De cada muestra se tomaron 100 granos sanos en los cuales se separó con un bisturí el pericarpio y el endospermo con germen. Estas fracciones del grano se molieron en un molino tipo ciclónico (Ika, Works, Inc. Wilmington, NC) con malla de 0.5 mm y se deshidrataron en una estufa a 60 °C por 12 h. Se pesaron 200 mg de muestra y se agregaron 15 mL de disolvente (metanol acuoso 1:1 v/v), agitando la mezcla por 90 min para realizar la extracción. Las muestras se centrifugaron por 10 min a 4500 rpm para separar el sobrenadante y el residuo al cual se añadieron 10 mL del mismo

## Physical characterization of the grain

Physical determinations were hectoliter weight (method 14-40; AACC, 1976), floatation index (Salinas *et al.*, 1992), 100-grain weight, grain color measured as percentage of reflectance using an Agtron 500 colorimeter, using the green color selector (546 nm). All of the analyses were performed at least in duplicate.

### Nixtamalization variables

One hundred maize grains were nixtamalized with 0.7 g of calcium oxide and 200 mL of distilled water (Salinas and Arellano, 1989), which were mixed in a precipitation beaker (600 mL) and heated to boiling (92 °C). Time of nixtamalization was calculated for each sample based on grain hardness, which was measured with the floatation index.

Nixtamalized grain was left to set 14 to 16 h at room temperature. Beakers were kept covered with a glass dome to reduce evaporation. Cooking water was drained and the nixtamal was washed with potable water to eliminate part of the pericarp and lime residues. The nixtamal was milled in a traditional stone handcrafted mill to obtain the dough. Tortillas were prepared with 20 g of dough using a manual metal press; pressure was applied until they were  $12.5 \pm 1$  cm in diameter and  $1.19 \pm 1$  mm thick. Baking was done on a metal griddle at a temperature of  $150 \pm 10$  °C.

Variables assessed were nixtamal moisture, tortilla moisture, and loss of solids (Salinas and Arellano, 1989). The retained pericarp was quantified determining the content of pericarp on the grain was quantified; after nixtamalization and rinsing, the pericarp that remained adhered to the grain was quantified. With the data of percentage of pericarp on the raw grain and that obtained on nixtamalized grain, the percentage of remaining pericarp was calculated.

Tortilla color was determined with the colorimeter used to measure raw grain color.

### Free and total phenols in raw grain

From each sample, 100 healthy grains were selected; with a scalpel the pericarp was separated from the endosperm with germ. These fractions of the grain were ground with a cyclonic type mill (Ika Works, Inc., Wilmington, NC) with a 0.5 mm screen. They were then dehydrated in an oven at 60 °C for 12 h. Two hundred mg of sample were weighed and 15 mL of solvent (aqueous methanol 1:1 v/v) were added. The mixture was shaken for 90 min to prepare for extraction. The samples were centrifuged for 10 min at 4500 rpm to separate the supernatant from the residue; to this, 10 mL of the same solvent was added and the mixture was shaken. The supernatant of the second extraction was added to the first and filtered with Whatman #1 filter paper, then concentrated under low pressure to dryness; the extract was then re-dissolved in distilled water and decanted to 10 mL in a volumetric flask (Adom and Liu, 2002).

For the colorimetric test, the Folin-Ciocalteu method (Makkar, 2002) was used, expressing phenol content as  $\mu\text{M}$  of gallic acid equivalent. Detection of phenolic compounds was performed at 760 nm.

disolvente y se agitó. El sobrenadante de la segunda extracción se juntó con el primero, se filtró con papel filtro Whatman No. 1 y se concentró a baja presión hasta sequedad, redisolviendo el extracto en agua destilada y aforando a 10 mL en un matraz volumétrico (Adom y Liu (2002).

Para el ensayo colorimétrico se usó el método de Folin-Ciocalteu's (Makkar, 2002), expresando el contenido de fenoles como  $\mu\text{M}$  de ácido gálico equivalente; la detección de compuestos fenólicos se hizo a 760 nm.

Para fenoles totales se procedió de manera similar que para fenoles libres, pero empleando como solución extractora ácido clorhídrico 1.2 M en metanol:agua (1:1 v/v), según Vinson *et al.* (2001).

#### Fenoles libres y totales en masa y tortillas

Del grupo MQNO se eligieron tres que producían las tortillas más blancas y tres que presentaban las tortillas más oscuras del grupo MQO. Se tomaron 6 g de masa de cada muestra nixtamalizada con el tiempo de cocción de acuerdo a su índice de flotación, y 4 g de tortilla. Las muestras se deshidrataron 12 h en una estufa a 60 °C y se molieron usando una malla de 0.5 mm. La cuantificación de fenoles libres y totales se hizo según lo descrito para grano crudo.

#### Análisis de ácidos fenólicos por HPLC

Se realizó mediante el extracto de fenoles libres (Cai *et al.*, 2003). Para grano crudo se usó el extracto obtenido del endospermo, ya que en esta estructura se observaron diferencias en el contenido de fenoles libres y totales entre las muestras que oscurecen y las que no oscurecen. También se hizo el análisis con la masa. De la muestra usada para el análisis de fenoles libres y totales se pasaron 4 mL por un cartucho Sep-Pakc C<sub>18</sub> (Phenomenex, Torrance, CA) previamente activado (Glowniak *et al.*, 1996). La muestra purificada se filtró mediante un acrodisco de 0.45 mm antes de inyectarse al HPLC (Perkin-Elmer Series 200) controlado por una computadora personal con el software TotalChrom 2002 (Perkin-Elmer). Se usó una columna analítica Hypersil ODS.2 (250×46mm) con tamaño de partícula de 5 mm y como eluyente una mezcla de metanol: ácido acético: agua (25:1:75 v/v) bajo un sistema isocrático con un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. El volumen de muestra inyectado fue 20 mL y el tiempo de corrida 20 min. Los ácidos fenólicos se detectaron a 254 nm manteniendo la columna a 30 °C; para identificar los ácidos fenólicos se usaron estándares de ácido ferúlico, sinápico y p-cumárico (Sigma, St. Louis, MO), en concentración de 1mg mL<sup>-1</sup>, en metanol.

#### Análisis estadístico

Los resultados del contenido de fenoles libres y totales en grano, masa y tortilla se sometieron a un análisis de varianza y comparaciones de medias (Tukey;  $p \leq 0.05$ ), utilizando un diseño de bloques al azar (SAS, 1998).

For total phenols, the procedure was similar to that for free phenols, but 1.2 M hydrochloric acid extracting solution was used in methanol:water (1:1 v/v), following Vinson *et al.* (2001).

#### Free and total phenols in dough and tortillas

Of the STND group, three that produced whiter tortillas were selected, while from the STD group three were selected that produced darker tortillas. From each nixtamalized sample, 6 g of dough, with the baking time according to their flotation index, and 4 g of tortilla were taken. The samples were dehydrated in an oven at 60 °C for 12 h and milled, using a 0.5 mm screen. Quantification of free and total phenols was done as described above for raw grain.

#### HPLC analysis of phenolic acids

Analysis was done using the extract of free phenols (Cai *et al.*, 2003). For raw grain, the extract obtained from the endosperm was used since, in this structure, differences in the content of free and total phenols were observed between samples that darken and those that do not. The analysis was also performed with dough. Of the sample used for the analysis of free and total phenols, 4 mL were passed through a Sep-Pakc C18 cartridge (Phenomenex, Torrance CA), previously activated (Glowniak *et al.*, 1996). The purified sample was filtered through a 0.45 mm acrodisk before injecting it into the HPLC (Perkin-Elmer Series 200) controlled by a personal computer with the software TotalChrom 2002 (Perkin-Elmer). An analytical column Hypersil ODS.2 (250×46mm) was used with 5 mm particle size. A mixture of methanol:acetic acid:water (25:1:75 v/v) was used as an eluant under the isocratic system with a flow of 1 mL min<sup>-1</sup>. The sample volume injected was 20  $\mu\text{L}$ , and run time was 20 min. Phenolic acids were detected at 254 nm, maintaining the column at 30 °C. To identify the phenolic acids, ferulic, sinapic and p-cumaric acid standards (Sigma, St. Louis, MO) were used at a 1 mg mL<sup>-1</sup> concentration in methanol.

#### Statistical analysis

The results of free and total phenol content in grain, dough and tortilla were subjected to an analysis of variance and comparison of means (Tukey;  $p \leq 0.05$ ), using a random block design (SAS, 1998).

## RESULTS AND DISCUSSION

STND grains were harder (measured with the flotation index) than the STD grains, the latter being flourier (Table 1). All of the samples were classified visually as creamy-colored, but instrument reading gave a higher percentage of reflectance to STD, meaning that these were a lighter creamy color than the STNP maize. Generally, when the proportion of floury endosperm is higher, grain color tends to be whiter (Salinas *et al.*, 1992).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los granos MQNO fueron más duros, según el índice de flotación, que los MQO porque éstos fueron más harinosos (Cuadro 1). Todas las muestras se clasificaron visualmente como color cremoso, pero el valor instrumental de esta variable mostró un porcentaje de reflectancia superior en las MQO, es decir tuvieron un color cremoso más claro que el de los maíces MQNO. Generalmente, a mayor proporción de endospermo harinoso, el color del grano tiende a ser más blanco (Salinas *et al.*, 1992).

La humedad de nixtamal fue mayor en las MQO que en las MQNO. Estas diferencias no se expresaron en la humedad de la tortilla, que fue similar en ambos grupos de maíces. La pérdida de sólidos en nejayote fue menor en las MQO que en las MQNO, debido posiblemente al mayor tiempo de cocimiento de estas últimas por su grano más duro. Un mayor tiempo de cocimiento favorece la desintegración del pericarpio y con ello su liberación durante el enjuague del nixtamal. De los sólidos presentes en el nejayote, la mayor proporción corresponde al pericarpio desprendido del grano (Pflugfelder *et al.*, 1988); sin embargo en este caso, los dos grupos de muestras tuvieron un porcentaje similar de pericarpio retenido.

El color de la tortilla de las MQNO tuvo valores de reflectancia más altos que en las MQO; en promedio, las tortillas de las MQNO fueron 15% más blancas que las de las MQO. Esta diferencia es pequeña, sin embargo visualmente era evidente el aspecto gris de las tortillas de las MQO, lo que podría significar que la medición con el equipo Agtron no es lo más adecuado para detectar este tipo de coloraciones.

Nixtamal moisture was higher in the STD than in STND. These differences were not expressed in tortilla moisture, which was similar for both groups of maize. The loss of solids in the drained cooking water (*nejayote*) was less in STD than in STND, due possibly to the longer cooking time of the latter because the grain was harder. Longer cooking time favors disintegration of the pericarp, so that it is freed when the nixtamal is rinsed. Of the solids present in the *nejayote*, the pericarp that comes off the grain accounts for a larger proportion (Pflugfelder *et al.*, 1988). In this case, however, the two groups of samples had a similar percentage of retained pericarp.

Tortilla color of the MQNO had higher reflectance values than the MQO; on average, the MQNO tortillas were 15% whiter than MQO tortillas. This difference is small; however, visually, the grayish aspect of the MQO tortillas was evident. This could mean that measurement with the Agtron equipment may not be the most suitable for detecting this type of coloring.

### Free and total phenols in pericarp and endosperm of raw grain

The pericarp had a higher concentration of free and total phenols than the endosperm (Table 2). The content of free phenols in the pericarp varied from 3.46 to 5.91  $\mu\text{mol g}^{-1}$  and in the endosperm from 1.24 to 3.76  $\mu\text{mol g}^{-1}$ . Total phenols in the pericarp varied from 8.98 to 14.56  $\mu\text{mol g}^{-1}$  and in the endosperm from 2.93 up to 4.98  $\mu\text{mol g}^{-1}$  (Table 2). For free and total phenols in whole grain maize, values reported are 2.12 and 15.55  $\mu\text{mol g}^{-1}$  (Adom and Liu, 2002).

**Cuadro 1. Caracterización física y variables de nixtamalización en las muestras que oscurecen (MQO) y muestras que no oscurecen (MQNO).**

**Table 1. Physical characterization and nixtamalization variables in samples that darken (STD) and samples that do not darken (STND).**

Maíces		IF %	CG %	PR %	HN %	HT %	PS %	CT (%)	Color visual del grano
MQNO	Gavilán	38	54.5	29	45	44	3.4	86	cremoso
	C- 694	16	52.5	64.1	40	44	5.1	95	cremoso
	C-696	17	46	45.2	40	46	4.3	92	cremoso
	C-697	15	49.5	72.7	43	45	4.5	96	cremoso
	C-903	41	58.5	52.7	40	42	4.8	93	cremoso
Media		25.4	52	52.7	42	44	4.42	92	
MQO	H-50	51	52.5	54.1	45	43	3.2	85	cremoso
	C-656	74	58.5	51.2	44	44	2.9	86	cremoso
	C-48	19	58.5	54.5	45	45	3.6	75	cremoso
	C-65	45	55.5	36.4	38	43	3.7	76	cremoso
	C-1025	77	58	54.9	46	44	2.3	75	cremoso
Media		53.2	57	50.2	44	44	3.14	79	

IF=índice de flotación; CG=color de grano en % de reflectancia; PR=pericarpio remanente; HN=humedad de nixtamal; HT=humedad de tortilla; PS=pérdida de sólidos; CT=color de tortilla en % de reflectancia.

### Fenoles libres y totales en pericarpio y endospermo de grano crudo

El pericarpio tuvo mayor concentración de fenoles libres y totales que el endospermo (Cuadro 2). El contenido de fenoles libres en pericarpio varió de 3.46 a 5.91  $\mu\text{mol g}^{-1}$  y en endospermo de 1.24 a 3.76  $\mu\text{mol g}^{-1}$ . Los fenoles totales en pericarpio variaron de 8.98 a 14.56  $\mu\text{mol g}^{-1}$  y en endospermo de 2.93 a 4.98  $\mu\text{mol g}^{-1}$  (Cuadro 2). Para fenoles libres y totales en grano entero de maíz los valores reportados son 2.12 y 15.55  $\mu\text{mol g}^{-1}$  (Adom y Liu, 2002).

En el grano de maíz los compuestos fenólicos están conformados por flavonoides y ácidos fenólicos; estos últimos contribuyen a la tolerancia del grano al ataque de insectos (Serratos *et al.*, 1987; Arnason *et al.*, 1992). Se concentran en el pericarpio del grano libre o esterificados a las heteroxilanas que constituyen las hemicelulosas de esta estructura (Duodu *et al.*, 2003).

Los ácidos fenólicos más importantes en el grano de maíz son el ferúlico, p-cumárico y sinápico (Classen *et al.*, 1990). El contenido total de fenoles fue más alto que el de fenoles libres en el pericarpio del grano de maíz, y provienen de los ácidos fenólicos liberados por la hidrólisis causada por el ácido clorhídrico, en el enlace éster que los une a las heteroxilanas. Este incremento también se observó en el endospermo, pero más moderado.

Las MQO tuvieron mayor contenido de fenoles libres y totales en endospermo que las MQNO (Figura

In the maize grain the phenolic compounds are composed of flavonoids and phenolic acids; the latter contribute to tolerance of the grain to insect attack (Serratos *et al.*, 1987; Arnason, *et al.*, 1992). These are concentrated in the grain pericarp, free or esterified to heteroxilanes that constitute the hemicelluloses of this structure (Duodu *et al.*, 2003).

The most important phenolic acids in the grain are ferulic, p-cumaric and sinapic (Classen *et al.*, 1990). Total phenol content was higher than free phenols in the maize grain pericarp, and they originate from the phenolic acids released by the hydrolysis caused by the hydrochloric acid upon the ester bond that joins them to the heteroxylanes. This increase was also observed in the endosperm, but was more moderate.

The STD had a higher content of total and free phenols in the endosperm than the STND (Figure 1). The content of free and total phenols in the pericarp was not different for the two groups of samples analyzed. Therefore, the content of phenols in the pericarp could not be associated with darkening of the dough and tortilla, but the content of phenols in the endosperm is. A negative correlation was found between the content of total phenols in the endosperm of the grain with tortilla color measured in percentage of reflectance ( $R^2=0.573$ ;  $p\leq 0.01$ ).

### Free phenols in dough and tortilla

The content of free phenols in the masa varied from 6.05 to 8.75  $\mu\text{mol g}^{-1}$  and in tortilla from 5.46 to

**Cuadro 2. Contenido de fenoles libres y totales en pericarpio y endospermo de muestras que oscurecen (MQO) y muestras que no oscurecen (MQNO).**

**Table 2. Content of free and total phenols in pericarp and endosperm of samples that darken (STD) and samples that do not darken (STND).**

Maíces	Fenoles libres ( $\mu\text{M}$ ácido gálico $\text{g}^{-1}$ muestra seca)		Fenoles totales ( $\mu\text{M}$ ácido gálico $\text{g}^{-1}$ muestra seca)	
	Pericarpio	Endospermo	Pericarpio	Endospermo
MQO:				
C-1025	3.56 ab	2.51 b	9.68 bc	4.98 a
C-48	3.95 ab	3.76 a	14.56 a	4.3 bc
C-65	4.24 a	2.61 b	9.93 bc	4.55 ab
C-656	3.46 b	2.49 b	10.815 b	4.42 bc
H-50	3.56 ab	2.55 b	9.4b c	3.99 c
DSH*	0.669	0.788	0.988	0.450
MQNO:				
Gavilán	3.79 cb	2.14 ab	11.69 b	2.93 b
C-694	4.24 b	2.618 a	14.96 a	3.18 b
C-696	4.09 b	2.38 ab	9.75 c	3.05 b
C-697	3.48 c	1.89 bc	8.98 c	3.43 ab
C-903	5.91 a	1.24 c	11.65 b	3.83 a
DSH*	0.533	0.725	1.268	0.573

\*DSH: diferencia significativa honesta. Medias con diferente letra en una columna, dentro del mismo grupo, son estadísticamente diferentes ( $p\leq 0.05$ ).

1). El contenido de fenoles libres y totales en el pericarpio no fue diferente para los dos grupos de muestras analizadas. Por tanto, el contenido de fenoles en el pericarpio podría no estar asociado con el oscurecimiento en masa y tortilla, pero sí el contenido de fenoles en el endospermo. Se encontró una correlación negativa entre el contenido de fenoles totales en el endospermo del grano con el color de la tortilla medido en porcentaje de reflectancia ( $R^2 = -0.573$ ;  $p \leq 0.01$ ).

### Fenoles libres en masa y tortillas

El contenido de fenoles libres en masa varió de 6.05 a 8.75  $\mu\text{mol g}^{-1}$  y en tortilla de 5.46 a 9.025  $\mu\text{mol g}^{-1}$  (Cuadro 3). Respecto al contenido de fenoles en el grano de maíz (Cuadro 2), los valores de fenoles libres en masa y tortilla aumentaron considerablemente en los dos grupos de muestras (MQO y MQNO). Esto se debe a la hidrólisis alcalina que sufren las diferentes estructuras del grano durante el cocimiento con agua más  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en la nixtamalización, lo que induce la liberación de la mayoría de los compuestos fenólicos ligados a las hemicelulosas del pericarpio (Doner y Hickcs, 1997) y la ruptura de enlaces con las heteroxilanas (Duodu *et al.*, 2003). También es posible que los restos de pericarpio adheridos al grano después del lavado del nixtamal contribuyan a aumentar el contenido de estos compuestos, pues de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, el pericarpio posee una mayor cantidad de fenoles que el endospermo.

Los fenoles totales en masa variaron de 5.56 a 7.58  $\mu\text{mol g}^{-1}$  y en tortilla de 4.69 a 8.73  $\mu\text{mol g}^{-1}$ . En masa y tortilla los fenoles totales son inferiores a los libres, pero en el pericarpio y el endospermo del grano crudo los fenoles totales fueron mayores que los libres.

Estos resultados muestran que durante la extracción ácida para obtener los fenoles totales en masa y tortilla, ocurre una degradación de los compuestos fenólicos, particularmente de los ácidos hidroxicinámicos liberados durante el procesamiento alcalino. Dentro de ellos están el *p*-cumárico, ferúlico y sinápico, que son decarboxilados por el HCl hacia los correspondientes hidroxiestirenos (Krygier *et al.* 1982); éstos no reaccionan con el reactivo Folin-Ciocalteu para desarrollar el color azul característico.

Los fenoles totales en cereales están en mayor cantidad que los libres (Adom y Liu, 2002), lo cual se observó en los valores obtenidos en el grano crudo de maíz (Cuadro 2) pero no en masa y tortilla de este trabajo. Al realizar el análisis por grupo, se observó que el contenido de fenoles libres y totales en masa y tortilla de las MQO fue mayor que el de las MQNO. El contenido de fenoles totales en tortilla de las MQO fue 39% mayor que en las MQNO (Figura 2).

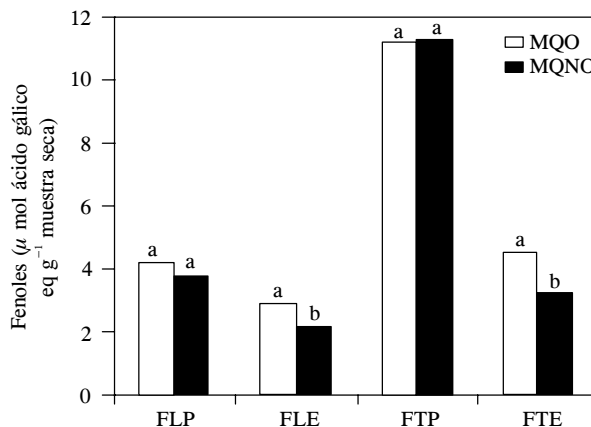


Figura 1. Fenoles libres y totales en pericarpio y en endospermo de muestras de maíz que oscurecen masa y tortilla (MQO) y muestras que no oscurecen (MQNO). FLP=fenoles libres en pericarpio; FLE=fenoles libres en endospermo; FTP=fenoles totales en pericarpio; FTE=fenoles totales en endospermo. Letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Figure 1. Free and total phenols in pericarp and endosperm of maize samples that darken (MQO) and samples that do not darken (MQNO) dough and tortilla. FLP=free phenols in pericarp; FLE=free phenols in endosperm; FTP=total phenols in pericarp; FTE=total phenols in endosperm. Different letters (a, b) indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

9.025  $\mu\text{mol g}^{-1}$  (Table 3). Regarding phenol content in maize grain (Table 2), the values of free phenols in masa and tortilla increased considerably in both groups of samples (MQO and MQNO). This is due to alkaline hydrolysis that the different structures of the grain underwent during cooking with water and  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  during nixtamalization, which leads to the release of most of the phenolic compounds linked to the hemiceluloses of the pericarp (Doner and Hickcs, 1997) and rupture of bonds with heteroxilanes (Duodu *et al.*, 2003). It is also possible that the remains of pericarp adhered to the grain after rinsing contribute to increasing the content of these compounds. According to the results obtained in this study, the pericarp possesses a larger quantity of phenols than the endosperm.

Total phenols in the dough varied from 5.56 to 7.58  $\mu\text{mol g}^{-1}$  in dough and 4.69 to 8.73  $\mu\text{mol g}^{-1}$  in the tortilla. In the dough and tortilla total phenols were less than free phenols, but in the pericarp and endosperm of raw grain total phenols were higher than free phenols.

These results show that during acid extraction to obtain total phenols in dough and tortilla a degradation of phenolic compounds occurs, particularly of the hydroxycinnamic acids released during alkaline processing. Among these are *p*-cumaric, ferulic and sinapic acids, which are decarboxylated by HCl to corresponding hydroxystyrenes (Krygier *et al.*, 1982).

**Cuadro 3. Contenido de fenoles libres y totales en masa y tortilla de muestras que oscurecen (MQO) y muestras que no oscurecen (MQNO).****Table 3. Content of free and total phenols in masa and tortilla of samples that darken (STD) and samples that do not darken (STND).**

Maíces	Fenoles libres ( $\mu\text{M}$ ácido gálico $\text{g}^{-1}$ muestra seca)		Fenoles totales ( $\mu\text{M}$ ácido gálico $\text{g}^{-1}$ muestra seca)	
	Masa	Tortilla	Masa	Tortilla
<b>MQO:</b>				
C-1025	7.24 b	7.54 c	6.87 b	7.35 c
C-48	8.76 a	9.03 a	6.96 b	8.74 a
C-65	8.59 a	8.46 b	7.58 a	8.46 b
DSH*	0.3099	0.4161	0.2345	0.2703
<b>MQNO:</b>				
C-694	7.08 a	7.08 a	5.56 a	4.69 b
C-696	6.33 ab	5.88 b	5.62 a	4.93 ab
C-697	6.05 b	5.46 b	5.82 a	5.03 a
DSH*	0.777	0.2244	0.2979	0.3259

\*DSH: diferencia significativa honesta. Medias con diferente letra en una columna, dentro del mismo grupo, son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

### Identificación de ácidos fenólicos por HPLC

Los compuestos fenólicos en maíz están conformados principalmente por flavonoides y ácidos fenólicos (Scalbert y Willianson, 2000), pero en esta investigación se trabajó sólo con ácidos fenólicos. Los resultados se obtuvieron del extracto de fenoles libres de endospermo crudo y de masa de MQO y MQNO. Para endospermo crudo se observaron los tres ácidos fenólicos predominantes en el grano de maíz (*p*-cumárico, ferúlico y sinápico) (Figura 3). La proporción de cada uno de estos ácidos fue parecida entre ambas muestras, salvo que en la MQNO se apreció un pico antes del ácido *p*-cumárico y que podría ser el *Z*-ferúlico (Claseen *et al.*, 1990).

En la masa de las MQO también se encontraron los tres ácidos comunes para maíz, además del compuesto que aparece antes del *p*-cumárico que se observó en mayor proporción en la muestra 48 (Figura 4). Este compuesto también apareció en las MQNO (Figura 5), por lo que su presencia no se relaciona con el oscurecimiento de la tortilla. Sin embargo, en el cromatograma obtenido del extracto de fenoles libres en masa de las dos MQO, un compuesto de baja polaridad, con un tiempo de retención de 19.4 min sale después del ácido sinápico (Figura 4) y no se observó en los cromatogramas de las MQNO (Figura 5); por tanto, podría tener alguna relación con el oscurecimiento.

### CONCLUSIONES

En el grano de maíz de las muestras analizadas, el contenido de fenoles libres y fenoles totales en el pericarpio fue mayor que en el endospermo. El contenido

These do not react with the Folin-Ciocalteu reactive to develop the characteristic blue color.

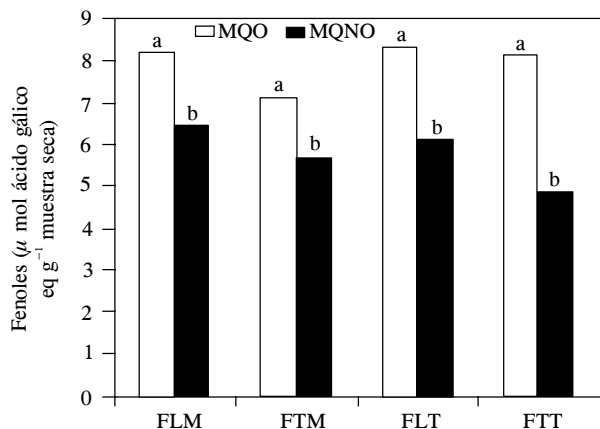
Total phenols in cereals are found in greater quantity than free phenols (Adom and Liu, 2002). This was observed in the values obtained in raw maize grain (Table 2), but not in dough or tortilla in our study. When the analysis was performed by group, it was observed that the content of free and total phenols in dough and tortilla of MQO was greater than in the MQNO. The content of total phenols in MQO tortillas was 39% higher than in MQNO (Figure 2).

### HPLC identification of phenolic acids

Phenolic compounds in maize are composed mainly of flavonoids and phenolic acids (Scalbert and Willianson, 2000), but in our research we worked only with phenolic acids. The results were obtained from extracts of free phenols from raw endosperm and STD and STND dough. In raw endosperm the three predominating phenolic acids in the maize grain (*p*-cumaric, ferulic and sinapic) were observed (Figure 3). The proportion of each of these acids was similar in the two samples, except that in MQNO a peak before the *p*-cumaric acid peak was observed, which could be *Z*-ferulic (Classen *et al.*, 1990).

In STD dough the three acids commonly found in maize were also found, besides the compound that appears before *p*-cumaric, which was observed in greater proportion in sample 48 (Figure 4). This compound also appeared in the STND (Figure 5), suggesting that its presence is not related to tortilla darkening. However, in the chromatogram obtained from the free phenol extract in MQO dough a low





**Figura 2.** Fenoles libres y totales en masa y tortilla de muestras de maíz que oscurecen (MQO) y muestras que no oscurecen (MQNO). FLM=fenoles libres en masa; FTM=fenoles totales en masa; FLT=fenoles libres en tortilla; FTT=fenoles totales en tortilla. Letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).  
**Figure 2.** Free and total phenols in dough and tortilla of maize samples that darken (STD) and samples that do not darken (STND). FLM=free phenols in dough; FTM=total phenols in dough; FLT=free phenols in tortilla; FTT=total phenols in tortilla. Different letters (a, b) indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

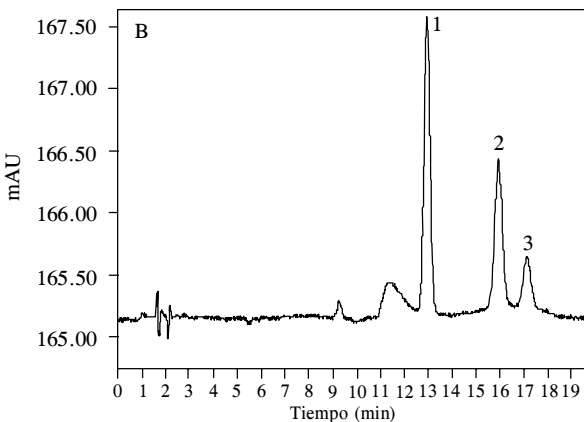
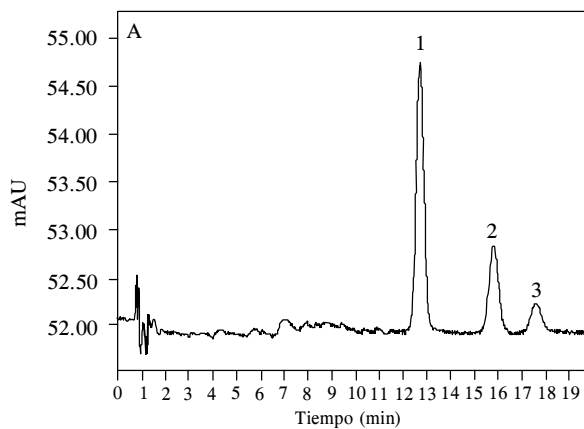
de estos dos grupos de fenoles en el pericarpio de las MQO no fue diferente al de las MQNO.

Las MQO tuvieron mayor contenido de fenoles libres y totales en endospermo de grano crudo, que las MQNO. Esta misma tendencia se observó en la masa y la tortilla; en esta última el contenido de fenoles totales fue 39% mayor en las MQO que en las MQNO.

Los ácidos fenólicos presentes en el endospermo de las muestras analizadas fueron p-cumárico, ferúlico y sinápico, que están en las muestras que oscurecen y en las que no oscurecen.

**LITERATURA CITADA**

American Association of Cereal Chemists' (AACC). 1976. Approved methods of the AACC. The Association. 7th. Edition. StPaul. MN.  
 Adom, K. K., and R. H. Liu. 2002. Antioxidant activity of grains. J. Agric. Food Chem. 50: 6182-6187.  
 Arnason, J. T., J. Gale, J. B. Conilh De Beyssac, S. S. Sen, A., B. J. R. Philogene, J. D. H. Lambert, R. G. Fulcher, A. Serratos, and J. Mihm. 1992. Role of phenolics in resistance of maize grain to the stored grain insects, *Prostephanus truncatus* (Horn) and *Sitophilus zeamais* (Motsch). J. Stored Prod. Res. 28: 119-126.  
 Cai, R., N. S. Ettiarachchiy, and M. Jalaluddin. 2003. High-performance liquid chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. J. Agric. Food Chem. 51: 1623-1627.  
 Classen, D., J. T. Arnason, A. Serratos, J. D. H. Lambert, C. Nozillo, and B. J. R. Philogéne. 1990. Correlation of phenolic



**Figura 3.** Cromatogramas del extracto de fenoles libres en endospermo crudo de muestra de maíz que oscurece la tortilla (A) y de la que no la oscurece (B). Los ácidos identificados fueron p-cumárico (1), ferúlico (2) y sinápico (3).

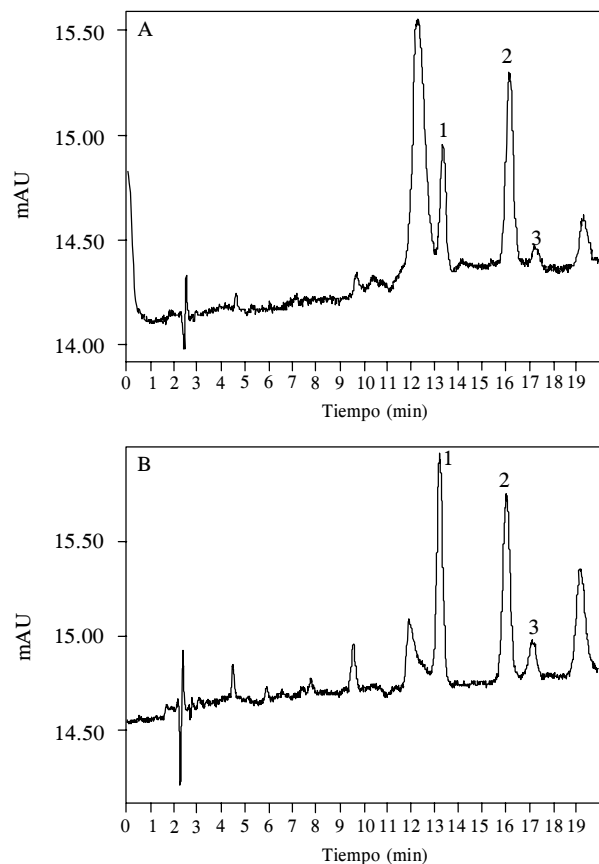
**Figure 3.** Chromatograms of free phenol extract from raw endosperm of maize sample that produces tortilla that darkens (A) and that which produces tortilla that does not darken (B). Acids identified were p-cumaric (1), ferulic (2) and sinapic (3).

polarity compound with a retention time of 19.4 min appears after sinapic acid (Figure 4) and is not observed in the MQNO chromatograms (Figure 5). Therefore, this could have some relationship with darkening.

**CONCLUSIONS**

In the maize grain of the samples analyzed, the free phenols and total phenols content in the pericarp was higher than in the endosperm. The content of these two groups of phenols in the STD pericarp was not different from that of STND.

The STD had higher contents of free and total phenols in the endosperm of raw grain than STND. The same trend was observed in dough and tortilla; in



**Figura 4. Cromatogramas de ácidos fenólicos libres en masa de muestras ue oscurecen (MQO) la tortilla. A) muestra 48; B) muestra 65. Los ácidos fenólicos identificados fueron 1) p-cumárico, 2) ferúlico y 3) sinápico.**  
**Figure 4. Chromatograms of free phenolic acids in dough that darkens (STD) the tortilla. A) sample 48; B) sample 65. The phenolic acids identified were 1) p-cumaric, 2) ferulic, and 3) sinapic.**

acids content of maize to resistance to *Sitophilus zeamais*, the maize weevil, in CIMMYT's collections. *J. Chem. Ecology* 16(2): 301-314.

Doner, L. W., and K. B. Hicks. 1997. Isolation of hemicellulose from corn fiber by alkaline hydrogen peroxide extraction. *Cereal Chem.* 74: 176-181.

Duodu, K. G. K., J. R. N. Taylor, P. S. Belton, and B. R. Hamaker. 2003. Factors affecting sorghum protein digestibility. *J. Cereal Sci.* 38:117-131.

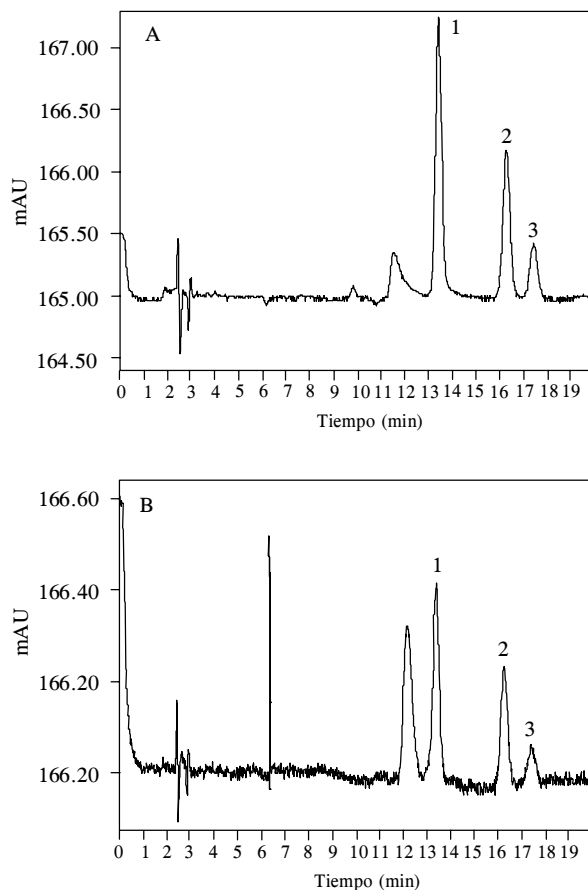
Fenema, O. 2000. *Química de Alimentos*. Ed. Acribia. España. Tercera edición. pp: 493-494.

Fuerst, E. P., J. V. Anderson, and C. F. Morris. 2006. Delineating the role of polyphenol oxidase in the darkening of alkaline wheat noodles. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2378-2384.

Glowniak, K., G. Zgora, and M. Kozyra. 1996. Solid phase extraction and reversed-phase HPLC of free phenolic acids in some *Echinacea* species. *J. Chromatography* 730: 25-29.

Hatcher, D. W., and J. E. Kruger. 1997. Simple phenolic acids in flours prepared from Canadian wheat: Relationship to ash content, color and polyphenol oxidase activity. *Cereal Chem.* 74:337-343.

Krygier, K., F. Sosulski, and L. Hogge. 1982. Free, sterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.* 30: 330-334.



**Figura 5. Fenoles libres en masa de muestras que no oscurecen (MQNO) la tortilla. Los ácidos fenólicos identificados fueron 1) p-cumárico, 2) ferúlico y 3) sinápico.**  
**Figure 5. Free phenols in masa samples that do not darken (STND) the tortilla. The phenolic acids identified were 1) p-cumaric, 2) ferulic, and 3) sinapic.**

tortilla the content of total phenols was 39% higher in STD than in STND.

Phenolic acids present in the endosperm of the samples analyzed were p-cumaric, ferulic and sinapic acids, which are in both the samples that darkened and those that did not.

—End of the English version—



Makkar, H. P. S. 2002. *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage*. Kluwer Academic Publishers, Vienna, Austria. pp: 49-99.

Núñez-Delgado, E., M. Serrano-Megías, J. A. Pérez-López, and J. M. López-Nicolás. 2005. Polyphenol oxidase from Dominga table grapes. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6087-6093.

Pflugfelder, R. L., L. W. Rooney, and R. D. Waniska. 1988. Dry matter losses in commercial corn masa production. *Cereal Chem.* 65:127-132.

- Quinde, Z., S. E. Ullrich, and B. K. Baik. 2004. Genotypic variation in color and discoloration potential of barley-based food products. *Cereal Chem.* 81: 752-758.
- Salinas, M. Y., y J. L. Arellano V. 1989. Calidad nixtamalera y tortillera de híbridos de maíz con diferente tipo de endospermo. *Rev. Fit. Mex.* 12: 129-135.
- Salinas, M. Y., B. F. Martínez, y E. J. Gomes. 1992. Comparación de métodos para medir la dureza del maíz (*Zea mays* L.). *Arch. Latin. Nutr.* 42:59-63.
- SAS Institute Inc. 1998. SAS/STAT Guide for Personal Computers. Version 8.0. Cary, NC. USA. 595 p.
- Scalbert, A., and G. Williamson. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130:2073-2085.
- Serratos, J.A., J. T. Arnason, C. Nozzolillo, J.D. H. Lambert, and J. B. R. Philogene. 1987. The factors contributing to resistance of exotic maize populations to maize weevil *Sitophilus zeamais*. *J.Chem. Ecol.* 13, 751-762.
- Vinson, A.J., X. Su, L. Zubik, and P. Bose. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 49:5315-5321.