

## Determinación de antocianinas mediante extracción asistida por radiación de microondas en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de alto consumo en Antioquia-Colombia

### Determination of anthocyanins by microwave assisted extraction in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) commonly consumed in Antioquia, Colombia

Dr. Miguel A. Puertas-Mejía<sup>I</sup>, Lic. Yersica Ríos-Yepes<sup>I</sup>, Dr. C. Benjamín Alberto Rojano<sup>II</sup>

<sup>I</sup> Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

<sup>II</sup> Escuela de Química. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Medellín, Colombia.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** el frijol además de ser una fuente nutricional importante en Colombia, también aporta un gran contenido de sustancias con potencial benéfico para la salud, como son flavonoides y antocianinas, entre otras, que contribuyen de manera significativa con sus propiedades medicinales y pueden tener un efecto positivo contra algunas enfermedades crónicas.

**Objetivos:** comparar el contenido de antocianinas del pericarpio del fruto de frijol de diferentes variedades con respecto al método de extracción.

**Métodos:** la piel del fruto de frijol deshidratada y macerada se sometió a extracciones sólido-líquido y asistida por microondas con metanol acidulado. Se evaluó el contenido de antocianinas por el método de diferencial de pH y el potencial antioxidante *in vitro* con base en el método de DPPH (catión radical  $\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazilo).

**Resultados:** la técnica de extracción asistida por microondas (MAE) mostró una mayor eficiencia respecto a la convencional, porque disminuyó considerablemente la cantidad de solvente, de muestra empleada y los tiempos de extracción. Los extractos obtenidos presentaron un contenido de antocianinas entre 8,33 y 25,5 mg cianidin-3-glucósido/L, sin embargo, el efecto de protección antioxidante resultó similar entre ellos y comparable con el de las sustancias de referencia.

**Conclusiones:** todos los extractos presentaron buena capacidad protectora contra radicales libres; la técnica de extracción asistida por microondas puede ser usada como método alternativo para una valoración rápida, eficiente y eficaz del contenido de sustancias bioactivas en diferentes matrices.

**Palabras clave:** antioxidantes naturales, antocianinas, extracción asistida por microondas (MAE), frijol, *Phaseolus vulgaris* L., pericarpio.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** apart from being an important nutritional source in Colombia, beans also provide a large amount of substances with potential beneficial effects on health, such as flavonoids and anthocyanins, among others, which stand out for their medicinal properties and potential positive action against some chronic diseases.

**Objectives:** compare the content of anthocyanins in the pericarp of the fruit of different varieties of beans with reference to the extraction method.

**Methods:** after dehydration and maceration, the bean fruit coat was subjected to solid-liquid and microwave assisted extraction with acidulated methanol. Anthocyanin content was determined by the pH differential method, and the cation radical  $\alpha$ - $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) method was used for determination of in vitro antioxidant potential.

**Results:** microwave assisted extraction (MAE) proved to be more efficient than the conventional technique, with a considerable reduction in the amount of solvent, sample and extraction time. Anthocyanin content in the extracts obtained was between 8.33 and 25.5 mg cyanidin-3-glucoside/L. However, their antioxidant protection effect was similar and comparable to that of reference substances.

**Conclusions:** all extracts showed good protective capacity against free radicals. Microwave assisted extraction may be used as an alternative method for fast, efficient and effective evaluation of the content of bioactive substances in various matrices.

**Key words:** natural antioxidants, anthocyanins, microwave assisted extraction (MAE), bean, *Phaseolus vulgaris* L., pericarp.

---

## INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos más trascendentales en varias regiones de Colombia, especialmente en climas fríos y medios, así como en zonas de economía campesina y participa con el 1,3 % en el IPC (índice de precios al consumidor) de los alimentos. Adicionalmente, es uno de los componentes de mayor relevancia en la dieta de la población en Antioquia, por sus diversas propiedades nutricionales, tales como el alto contenido de proteína y de minerales esenciales. En 2007, el consumo de frijol en Colombia fue de aproximadamente 3,7 kg/persona/año y en Antioquia se estimó en 6 kg/persona/año.<sup>1</sup> Por otro lado, esta leguminosa también es conocida por su contenido de sustancias funcionales de potencial aplicación en la salud, como proteínas, aminoácidos, carbohidratos, saponinas, fibra dietética, alcaloides, flavonoides, antocianinas, entre otras,<sup>2,3</sup> los cuales contribuyen de manera sinérgica con sus propiedades medicinales como antioxidante, diurético,

---

antiinflamatorio, antitumoral y antimicrobiano, con un efecto positivo contra algunas enfermedades crónicas.<sup>4,5</sup> No obstante, el principal uso que se la ha dado como parte fundamental de la dieta humana, ha dejado olvidada su potencial aplicación en medicina, bien sea como fuente alternativa de sustancias funcionales o como ingrediente activo de productos de consumo humano.

Por otro lado, en el proceso de preparación de la muestra siempre se busca un método que permita facilitar el análisis instrumental y la cuantificación de los componentes de interés.<sup>6-8</sup> Una de las técnicas de preparación de muestras desarrollada en las últimas décadas y ampliamente utilizada para muchos tipos de matrices, es la extracción asistida por la radiación de microondas (MAE, por sus siglas en inglés). El calentamiento por la radiación de microondas fue usado inicialmente en procesos de digestión ácida en condiciones atmosféricas, reduciendo el tiempo de la preparación de la muestra de 2 h a menos de 15 min.<sup>9,10</sup> El calentamiento con microondas difiere de los métodos conductivos, porque en estos últimos el calentamiento es independiente de la muestra, mientras que el calentamiento por microondas está relacionado directamente con las características absorbentes de la muestra, que permite calentar un gran número de estas en cortos períodos de tiempo.<sup>11</sup> Por tanto, teniendo en cuenta la importancia agroindustrial del frijol en Antioquia y a los pocos o ningún reporte del uso de la técnica MAE en este tipo de matrices a nivel nacional y local, en esta investigación se planteó el uso del método MAE para la obtención de compuestos bioactivos en el fruto del frijol. Se procedió a cuantificar el contenido de antocianinas a partir de extractos metanólicos usando como método alternativo la técnica MAE, con el fin de disminuir la manipulación de muestras y los tiempos de análisis, entre otros, que se llevan a cabo en la extracción convencional sólido-líquido (ESL).

## MÉTODOS

*Material vegetal:* las variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tomadas para el estudio resultaron de aquellas que se consumían con mayor preferencia en Antioquia y que se encontraban en la mayoría de tiendas distribuidoras de la ciudad de Medellín: cargamanto rojo, bola roja, nima, radical, zaragoza, calima y sabanero.

*Extracción sólido-líquido-(ESL):* una muestra de 0,5 g de la piel, previamente deshidratada y macerada se adicionó a 25 mL de metanol acidulado (0,1; 0,5; 1,0 y 1,2 % v/v en HCl) y se sometió a agitación magnética por 1 y 2 h. Luego, el extracto se centrifugó a 1 500 rpm durante 5 min, y el sobrenadante se rotoevaporó a sequedad. El extracto resultante se redisolvió en 1,0 mL de metanol y se guardó a 4 °C hasta los análisis posteriores.

*Extracción asistida por microondas (MAE):* una muestra de 0,5 g de la piel, previamente deshidratada y macerada, se adicionó a 5,0 mL de metanol acidulado (0,1; 0,5; 1,0 y 1,2 % v/v en HCl) y la mezcla resultante se sometió a radiación de microondas, usando un horno microondas convencional, a tiempos de exposición de la radiación de microondas de 20, 40, 60 y 80 s (con pulsos cada 5 s) a potencia de 30, 50 y 80 watts. El extracto obtenido se centrifugó a 1 500 rpm durante 5 min, y el sobrenadante se rotoevaporó a sequedad. El extracto resultante se redisolvió en 1,0 mL de metanol y se guardó a 4 °C hasta los análisis posteriores. El solvente de extracción, los volúmenes de solvente, la cantidad de muestra, el tiempo y la potencia de radiación de microondas descritos arriba, se basaron en los procedimientos optimizados.

*Evaluación de la reproducibilidad y la recuperación de los métodos de extracción:* se realizaron tres réplicas para cada procedimiento de extracción, usando como matrices semillas de frijol variedad cargamanto rojo. La reproducibilidad se evaluó sobre la base de la variación del área de los picos cromatográficos de los compuestos mayoritarios en los extractos. La eficiencia de los métodos de extracción se determinó sobre la base de la recuperación de 100 µL de una solución de la aglicona de la cianidina, adicionados a 500 µg de la muestra de frijol previamente deshidratada y macerada. La evaluación estadística se realizó mediante ANOVA (Microsoft Excel 2007) con un nivel de significancia de  $p < 0,001$ .

*Método HPLC-DAD-MS:* se usó un equipo HPLC-Agilent serie 1100 equipado con una bomba cuaternaria, válvula de inyección manual (Rheodyne) con un *loop* de 20 µL, desgasificador y compartimiento de termostato. La columna analítica empleada fue octadecilo C18 (4,6 × 150 mm, DI 5 µm). Se usaron 2 sistemas de solventes. El solvente A consistía de agua/acetonitrilo/ácido fórmico 85:5:10 (v/v/v), y el solvente B de agua/acetonitrilo/ácido fórmico 45:50:5 (v/v/v). El gradiente lineal empleado fue: 0 min, 10 % B; 15 min, 20 % B; 25 min, 40 % B; 40 min, 60 % B; 50 min, 90 % B; 55 min, 10 % B. Adicionalmente, el extracto se analizó por infusión directa al MS Agilent Technologies 6300 Series con trampa de iones (Ion Trap MS System) en un rango de masas de 200 a 800 m/z.

#### *Evaluación de la capacidad antioxidante*

*Contenido de antocianinas totales (TAC):* se determinó de acuerdo con el método de diferencial de pH<sup>12</sup> con algunas modificaciones, que permite realizar una medida rápida y confiable del contenido de antocianinas en matrices coloreadas, incluso en la presencia de pigmentos poliméricos degradados y otros componentes. Brevemente, una alícuota de la muestra (c.a. 1,0 mg) se colocó en un balón volumétrico de 25 mL y se ajustó el volumen con una solución *buffer* de pH 1,0 (ácido clorhídrico/cloruro de potasio; 0,025 M). De manera similar otra alícuota de la muestra se colocó en un balón volumétrico de 25 mL y se ajustó el volumen con una solución *buffer* de pH 4,5 (ácido acético/acetato de sodio; 0,4 M). Posteriormente, la absorbancia se midió a 510 y 700 nm, después de transcurridos 40 min de reacción en cada uno de los balones. La absorbancia final se calculó con la expresión:

$$Abs = [(A_{510} - A_{700}) - pH\ 1.0] [(A_{510} - A_{700}) - pH\ 4.5]$$

y el TAC se halló sobre la base de la ecuación:

$$TAC\ (mg/L) = (Abs \times PM \times FD \times 1\ 000) (\varepsilon \times 1)$$

Donde, *Abs* es la absorbancia, *PM* el peso molecular (449,2) para la cianidin-3-glucósido, *FD*, el factor de dilución y  $\varepsilon$ , la constante de absorptividad molar (29.600). El resultado se expresó como mg por litro de cianidin-3-glucósido. Los valores de TAC se normalizaron como contenido de cianidin-3-glucósido. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

*Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo de DPPH:* la capacidad antioxidante de cada fracción en diferentes concentraciones se determinó de acuerdo con la metodología descrita por *Puertas-Mejía* y otros,<sup>13</sup> con pequeñas modificaciones. Se determinó el porcentaje de inhibición de DPPH. En resumen, una alícuota (0,1 mL) de cada muestra (con la dilución necesaria) se adicionó a 1,0 mL de una solución etanólica de DPPH (73,5 µM). Inmediatamente después, se midió la absorbancia a 514 nm y luego cada 15 s, los primeros 2 min, luego, cada 30 s

hasta los 5 min, y finalmente en intervalos de 1 min hasta la obtención del estado estacionario en la reacción o una disminución en la absorbancia menor que 10 %. La concentración inicial exacta del DPPH en el medio de reacción se determinó mediante una curva de calibración de soluciones de DPPH (2,5 a 100  $\mu\text{M}$ ) medidas a 514 nm. Como sustancias de referencia se usaron el ácido ascórbico y tert-butil hidroxianisol (BHA) en diferentes concentraciones, dependiendo de la actividad de estas sustancias. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## RESULTADOS

En las tablas 1 y 2, se muestran cuadros comparativos entre los dos métodos de extracción, asistida por microondas (MAE) y convencional (ESL).

**Tabla 1.** Recuperación de antocianinas en frijol var. cargamanto rojo

Compuestos	Método de extracción	
	ESL	MAE
	Área de pico (mAU x min)	
Antocianinas totales	5524,18 $\pm$ 60,25a	5108,58 $\pm$ 57,32b
Aglicona de la cianidina	315,63 $\pm$ 8,4 <sup>1</sup>	312,25 $\pm$ 9,8c <sup>2</sup>

ESL: extracción convencional sólido-líquido; MAE: extracción asistida por microondas, siglas en inglés; <sup>1</sup>: estándar adicionado; <sup>2</sup>: estándar recuperado. Los valores representan el promedio de 3 réplicas  $\pm$  DE. Cada letra (a,b,c,d) representa diferencias significativas (ANOVA, factor simple,  $p < 0,001$ ).

**Tabla 2.** Comparación de la cantidad de antocianinas obtenidas a partir de frijol var. cargamanto rojo, mediante los métodos de extracción evaluados

Picos	ESL	MAE
	Área de pico (mAU x min)	
1	1 832,02 $\pm$ 16,3	1 758,62 $\pm$ 17,32
2	1 902,53 $\pm$ 15,8	1 851,15 $\pm$ 14,3
3	614,98 $\pm$ 8,2	547,88 $\pm$ 5,2
4	639,68 $\pm$ 9,3	463,40 $\pm$ 3,9
5	534,97 $\pm$ 7,5	397,53 $\pm$ 7,4

ESL: extracción convencional sólido-líquido; MAE: extracción asistida por microondas, siglas en inglés. Los valores representan el promedio de 3 réplicas  $\pm$  DE.

Sobre la base de los datos obtenidos se puede observar que, aunque no hubo diferencias importantes en la extracción de los compuestos de interés, la técnica MAE resultó más eficiente desde el punto de vista de la simplicidad del método.

La determinación del contenido de antocianinas mediante los parámetros usados en la técnica de extracción MAE presentaron muy buenos resultados en comparación con la extracción convencional, donde la muestra se sometió a largos períodos y volúmenes considerablemente grandes, lo cual podría ocasionar una posible degradación de los componentes de interés; mientras que pulsos cortos de potencia empleados en la radiación de microondas disminuyen la manipulación de la muestra, y reducen significativamente tanto la cantidad de solvente orgánico usado como la termodegradación de la matriz o los analitos (Fig.).

Luego, sobre la base de estos resultados, los parámetros establecidos para el método de extracción MAE fueron: volumen de muestra de 5 mL; tiempo de extracción de 60 s; potencia de extracción de 80 w y como solvente metanol acidulado (1 % v/v en HCl).

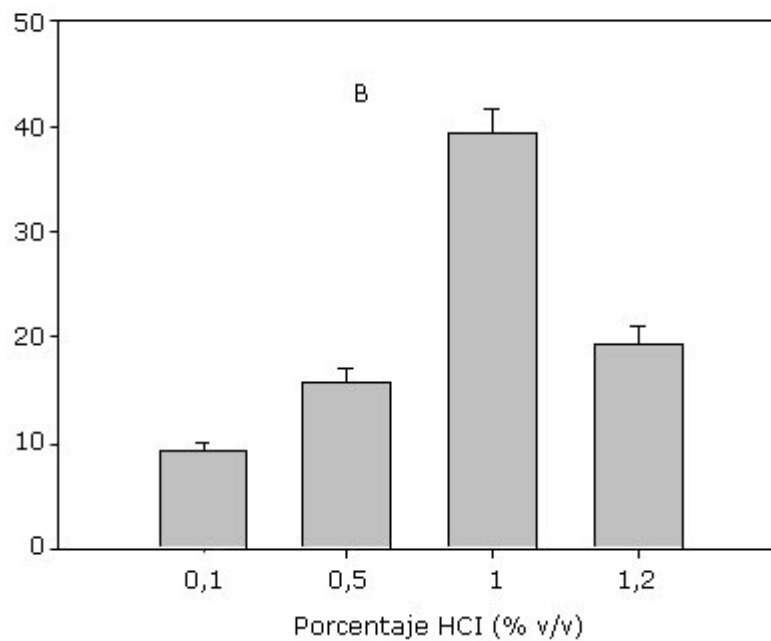
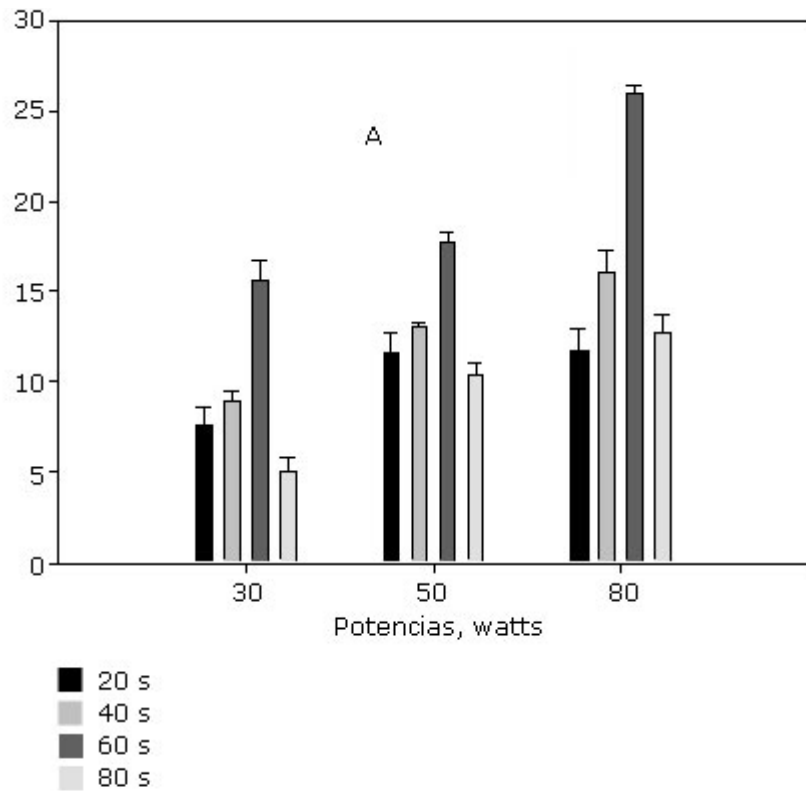
Los extractos para la determinación de la capacidad antioxidante se obtuvieron mediante MAE, usando los parámetros establecidos en la primera parte del trabajo. A partir de los datos experimentales (tabla 3) se dedujo que la radiación de microondas ejerció un pronunciado efecto en el proceso de extracción de los compuestos bioactivos presentes en el frijol, independientemente del tiempo de exposición a la radiación de microondas y de la potencia empleada. Por tanto, la MAE fue una técnica versátil y reproducible, que permitió obtener extractos ricos en los compuestos de interés para su posterior evaluación antioxidante.

En la tabla 4 se muestran los datos de capacidad antioxidante como secuestradores de radicales libres de los diferentes extractos de frijol y se correlacionan con el contenido de antocianinas. Se puede apreciar que todos los extractos mostraron un efecto de protección antioxidante comparable con el de las sustancias de referencia. Ese resultado corresponde al esperado, porque la presencia de antocianinas en los diferentes extractos potencializa el efecto antioxidante que, generalmente, se asocia a la presencia de polifenoles en este tipo de matriz.

**Tabla 3.** Evaluación preliminar de la posible capacidad antirradicalaria mediante el ensayo de DPPH (catión radical  $\alpha$ - $\alpha$ -difeníl- $\beta$ -picrilhidrazilo)

Muestra	Porcentaje de inhibición, %	
	MAE <sup>a</sup>	Extracción convencional
Cargamanto rojo	48,2 ± 2,6	41,2 ± 2,1 <sup>b</sup>
		47,2 ± 1,8 <sup>c</sup>
		51,2 ± 3,2 <sup>d</sup>
Bola roja	43,3 ± 3,4	36,75 ± 1,9 <sup>b</sup>
		43,9 ± 3,2 <sup>c</sup>
		42,7 ± 2,1 <sup>d</sup>

MAE: extracción asistida por microondas, siglas en inglés; <sup>a</sup>: ver parámetros operacionales en el texto; <sup>b,c,d</sup>: 1, 2 y 3 h de extracción, respectivamente.



A: extracción asistida por radiación de microondas en metanol/HCl 1 %; B: extracción convencional sólido-líquido, 2 h.

**Fig.** Evaluación del contenido de antocianinas totales en *Phaseolus vulgaris* L., var. cargamento rojo.

**Tabla 4.** Capacidad antioxidante de extractos obtenidos por extracción asistida por microondas<sup>1</sup> en diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* L.

Variedad de <i>Phaseolus vulgaris</i>	EC <sub>50</sub> , mg extracto/ $\mu$ mol DPPH	TAC, mg/L cianidin-3-glucósido
Cargamanto rojo	0,581 $\pm$ 0,012	25,5 $\pm$ 2,1
Bola roja	0,692 $\pm$ 0,001	10,03 $\pm$ 1,6
Nima	0,584 $\pm$ 0,004	13,30 $\pm$ 1,4
Radical	0,735 $\pm$ 0,011	8,33 $\pm$ 1,5
Zaragoza	0,816 $\pm$ 0,020	9,43 $\pm$ 1,71
Calima	0,782 $\pm$ 0,008	9,83 $\pm$ 1,7
Sabanero	0,623 $\pm$ 0,007	10,33 $\pm$ 1,6
Ácido ascórbico	0,220 $\pm$ 0,041	-
tert-butil hidroxianisol (BHA)	0,351 $\pm$ 0,043	-

<sup>1</sup>: ver parámetros operacionales en el texto.

## DISCUSIÓN

Las plantas cuentan con una gran variedad de componentes, como los carotenoides, vitaminas (C, E, D, etc.) y compuestos fenólicos, entre otros, que pueden interaccionar entre sí contribuyendo de manera sinérgica con su capacidad antioxidante, por lo cual resulta bastante arduo evaluar el efecto antioxidante de la planta a través de sus componentes individuales. Por lo anterior, en este estudio se determinó la capacidad antioxidante total por medio del método del radical estable DPPH, y los resultados se correlacionaron con el contenido de antocianinas totales.

En las diferentes variedades de frijol evaluadas el tipo y contenido de antocianinas producen una diferencia importante en la pigmentación de las diferentes especies de frijol; esta variación se define en colores que van desde el rojo pálido (var. Zaragoza) hasta el rojo intenso (var. Bola roja). Estas sustancias potencializan el uso del frijol como posible fuente de aditivos para la industria farmacéutica y de alimentos, con una actividad antioxidante prominente, además de sus propiedades farmacológicas y terapéuticas ya mencionadas. Por otro lado, la presencia de antocianinas en las variedades de frijol, lo hace un producto potencialmente útil para el suministro de colorantes y antioxidantes naturales; su diversidad fenotípica en la región andina se expresa en una extraordinaria variabilidad en color, tamaño, forma y textura del grano.

Los resultados de la presente investigación indicaron que la capacidad antioxidante encontrada en todos los extractos se podría correlacionar, en parte, con el contenido de antocianinas, teniendo en cuenta, naturalmente, que esta propiedad no se puede asociar directamente con una sola clase de componente o familia de componentes, tal y como se observa con la var. Nima, que presentó una EC<sub>50</sub> similar a la var. cargamanto rojo (0,584  $\pm$  0,004 y 0,581  $\pm$  0,012 mg extracto/ $\mu$ mol DPPH, respectivamente), pero su contenido de antocianinas fue inversamente proporcional al determinado para el cargamanto rojo (13,30  $\pm$  1,4 y 25,5  $\pm$  2,1 mg/L cianidin-3-glucósido, respectivamente), lo que sugiere la presencia



de otros componentes que potencian la capacidad antioxidante en los extractos evaluados.

Adicionalmente, porque en todo proceso de preparación de la muestra siempre se busca un método que permita facilitar el análisis instrumental y la cuantificación de los componentes de interés, el método MAE desarrollado en este trabajo permitió confirmar esa hipótesis, porque en comparación con la ESL, que requirió mayor manipulación de la muestra y costos de consumibles y a su vez la posibilidad de contaminación cruzada, esta fue más rápida y eficiente. En adición, la técnica evaluada en esta investigación como metodología analítica para la obtención de antocianinas presentes en 7 variedades de frijol, mostró una mayor eficiencia respecto a la convencional, porque disminuyó de modo considerable la cantidad de solvente, de muestra empleada y los tiempos de extracción. El mayor contenido de antocianinas se encontró en la variedad cargamanto rojo mientras que la variedad radical fue la de menor contenido. No obstante, la capacidad antioxidante en todos los extractos resultó muy similar, la cual también puede estar asociada a la presencia de otros componentes como por ejemplo derivados glicosídicos de quercetina y kaemferol, y los ácidos fenólicos (derivados del ácido cafeico), que se han reportado en diferentes variedades de frijol.<sup>14,15</sup> Luego, sobre la base de los resultados, la técnica MAE puede ser usada como método alternativo para una valoración rápida, eficiente y eficaz del contenido de sustancias bioactivas en diferentes matrices biológicas, y podría ser utilizada de manera preliminar para la búsqueda biodirigida de diferentes compuestos activos, sin invertir grandes cantidades de dinero en equipos de alto costo. Finalmente, este es el primer estudio reportado en Colombia, conocido hasta ahora por los autores; que comprende la aplicación de una técnica metodológica no-tradicional para el estudio de antocianinas en una leguminosa de gran importancia fitoterapéutica y nutricional para el país.

## AGRADECIMIENTOS

Vicerrectoría de Investigación, Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI), Universidad de Antioquia (*proyecto IN595CE*). Todos los experimentos fueron realizados bajo las normas y leyes colombianas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arias-Restrepo JH, Rengifo-Martínez T, Jaramillo-Carmona M. Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Frijol Voluble. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA. Bogotá: CTP Print Ltda; 2007.
2. Geil P, Anderson J. Nutrition and health implications of dry beans: a review. *J Am College Nutrition*. 1994;13(6):549-58.
3. Mishra SB, Rao CV, Ojha SK. An analytical review of plants for anti diabetic activity with their phytoconstituent and mechanism of action: a review. *International J Pharmacol Science Research*. 2010;1(1):29-44.
4. Díaz AM, Caldas GV, Blair MW. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. *Food Research International*. 2010;43(2):595-601.

5. Lin L-Z, Harnly JM, Pastor-Corrales MS. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Chemistry. 2008;107(1):399-410.
6. Buldini PL, Ricci L, Sharma JL. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. J Chromatography A. 2002;975(1):47-70.
7. Kataoka H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. TrAC. 2003;22(4):232-44.
8. Smith RM. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. J Chromatography A. 2003;1000(1-2):3-27.
9. Bose AK, Banik BK, Lavlinskaia N. More chemistry in a microwave. ChemTech. 1997;27(9):18-23.
10. LeBlanc G. Microwave-accelerated techniques for solid sample extraction. LC-GC. 1999;17(1):30-7.
11. Ganzler K, Salgó A, Valkó K. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. J Chromatography A. 1986;371(1):299-306.
12. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. J AOAC International. 2005;88(5):1269-78.
13. Puertas-Mejía MA, Zuleta-Montoya F, Rivera-Echeverry F. Capacidad antioxidante *in vitro* de comfrey (*Symphytum officinale* L.). Rev Cubana Plant Med. 2012;17(1):30-6.
14. Heimler D, Vignolini P, Dini M. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. J Agricultural Food Chemistry. 2005;53(8):3053-6.
15. Aparicio-Fernandez X, Yousef GG, Loarca-Pina G. Characterization of polyphenolics in the seed coat of Black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J Agricultural Food Chemistry. 2005;53(11):4615-22.

Recibido: 13 de agosto de 2012.

Aprobado: 30 de diciembre de 2012.

Miguel A. Puertas-Mejía. Instituto de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, A.A. 1226. Medellín, Colombia. Teléf.: +57(4) 219 5653; Fax +57(4) 219 8612. Correo electrónico: [mpuertas@exactas.udea.edu.co](mailto:mpuertas@exactas.udea.edu.co)