



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

*Extracción de Plumbagina: Un Estudio Verde*  
*(Plumbagin Extraction: A Green Study)*

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA

PRESENTA

FERNANDA ITZEL CALZADA GONZÁLEZ

ASESOR:

DR. RENÉ MIRANDA RUVALCABA

CO ASESOR:

DR. JOEL OMAR MARTÍNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# VOTOS



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
SECRETARÍA DE EVALUACIÓN Y DESARROLLO  
DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



Coordinación: Licenciatura de Química

Oficio No. FESC/JGA/208/X/2023

ASUNTO: Asignación de Jurado

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, autoriza al egresado (a):  
Fernanda Itzel Calzada González

con número de cuenta: 316350763 de la carrera de: Licenciatura de Química

a presentar el trabajo: Extracción de Plumbagina: Un Estudio Verde  
(Plumbagin Extraction: A Green Study)

Bajo la asesoría de:

Asesor (a): Interno Dr. René Miranda Ruvalcaba

Coasesor (a): Interno Dr. Joel Omar Martínez

Para titularse bajo la opción de titulación: Actividad de investigación

Asignando como sinodales:

CATEGORÍA	ANTIGÜEDAD	SINODAL	FIRMA	FECHA
PRESIDENTE	16/07/1984	Dra. Yolanda Marina Vargas Rodríguez		18/10/23
VOCAL	05/01/1989	M. en C. Brígida del Carmen Camacho Enríquez		6-Dic-23
SECRETARIO	12/08/2014	Dr. Joel Omar Martínez		9/10/23
1er SUPLENTE	05/09/1994	M. en C. Judith García Arellanes		09/10/23
2do SUPLENTE	16/02/2016	M. en C. Anuar Gómez Tagle González		09/10/23

Los miembros del jurado designado deberán emitir su **VOTO APROBATORIO** por escrito, o en su caso las observaciones o recomendaciones, en un plazo máximo de 15 días hábiles, contados a partir de la fecha de recepción del trabajo escrito. Cuando existan observaciones o correcciones al trabajo escrito por parte de los miembros del jurado, se darán a conocer al sustentante. Una vez que éste regrese el trabajo escrito corregido, el o los miembros del jurado, según el caso, tendrán un plazo máximo de 15 días hábiles para emitir su **VOTO APROBATORIO** por escrito, de acuerdo con el Art. 23 del Reglamento para Titulación de la FES Cuautitlán.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México a 03 de octubre 20 23

M. en C. Judith García Arellanes

Nombre y Firma del Coordinador (a) de la carrera

Fernanda Itzel Calzada González

Nombre y Firma del egresado (a)



El egresado cuenta con cinco días hábiles para solicitar el cambio de sinodal  
Este formato no será válido sin sello y firma de la Coordinación

Este trabajo, se desarrolló en el laboratorio L-122 de estudios sobre Química Verde perteneciente a la sección de Química Orgánica, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. René Miranda Ruvalcaba y el Dr. Joel Omar Martínez.

Y en la Unidad de Biología Tecnología y Prototipos (UBIPRO), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, bajo la asesoría del M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla.

## **DEDICATORIA**

Te lo dedico a ti lector que, destinaste un fragmento de tu tiempo para leer este trabajo, el cual espero te sirva de guía para ampliar tu conocimiento.

Este trabajo está especialmente dedicado a mi familia; mis padres y hermanos; que gracias a su constante apoyo y motivación hicieron posible no solo la conclusión de este escrito, sino el inicio de una nueva etapa en mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo en la realización de este trabajo a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA-PAPIIT (proyecto IN211023).

Al CONAHCYT por el apoyo económico otorgado, vía la beca de ayudante investigador SNI, No. I1200/051/2023.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Un enorme agradecimiento al Dr. René Miranda Ruvalcaba y al Dr. Joel Omar Martínez, por la guía y la enseñanza otorgada en mi trayectoria dentro de la investigación y del trabajo realizado. Gracias por compartir un poco de la gran sabiduría que poseen.

A mis padres, Nallely y Fernando, por su gran amor, guía y apoyo en este camino, donde me enseñaron que todo lo que una persona se proponga es posible.

A mis hermanos, Brenda e Ian, por su afecto y confianza.

A mi abuela, Juana, que desde siempre me impulsó a seguir adelante.

A Shael, quien estuvo conmigo en los momentos de estrés y alegría. Gracias por tu apoyo, confianza y cariño.

A todas las personas con las que llegué a cruzar camino en mi estancia dentro de la facultad, cuya presencia tuvo un impacto fructífero, enriqueciendo mi persona.

Al M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla y a la Unidad de Biología Tecnología y Prototipos (UBIPRO), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM por el apoyo relacionado con la CG-EM para llevar a cabo de manera apropiada los estudios de la extracción de plumbagina.

# INDICE

LISTA DE ACRÓNIMOS .....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ARTÍCULO ORIGINAL.....	5
TRADUCCIÓN DEL ARTÍCULO.....	17
CONCLUSIONES.....	29
APÉNDICE .....	30
Apéndice A. ....	30
Apéndice B. ....	32
Apéndice C. ....	33
REFERENCIAS .....	50

## LISTA DE ACRÓNIMOS

A continuación, se presentan los símbolos y acrónimos empleados en este trabajo conforme su aparición, junto con sus respectivos significados en español e inglés.

<b>Acrónimo</b> <b>(Acrónimo en inglés)</b>	<b>Significado (Significado en inglés)</b>
IOD (DOI)	Identificador de objeto digital (Digital Object Identifier)
PQV (GCP)	Protocolo de Química Verde (Green Chemistry Protocol)
IRC (NIR)	Infrarrojo cercano (Near-infrared)
MO (MW)	Microondas (Microwave)
TB-MQ (TB-MCh)	Triboquímica-Mecanoquímica (Tribochemistry-Mechanochemistry)
US **	Ultrasonido (Ultrasound)
MC (MH)	Mantilla de calentamiento (Mantle heating)
M **	Maceración (Maceration)
CG-EM (GC-MS)	Cromatografía de gases-espectrometría de masas (Gas chromatography–mass spectrometry)
(ANOVA) *	Análisis de varianza (Analysis of variance)
AcOEt (EtOAc)	Acetato de etilo (Ethyl acetate)
MeOH **	Metanol (Methanol)
(HRMS-DART) *	Análisis directo en tiempo real – Espectrometría de masas de alta resolución (Direct analysis in real time - High resolution mass spectrometry)
eV **	Electronvoltio (Electronvolt)
$m/z$ *	Masa/número atómico (Mass/charge number)
ar% (ra%)	% Abundancia relativa (Relative abundance %)
SC (SS)	Suma de cuadrados (Sum of squares)
SCM (MSS)	Media de suma de cuadrados (Mean sum of squares)
Valor-F (F-value)	Índice de variación de fisher (Fisher variation ratio)
Valor-P (P-value)	Probabilidad (Probability)
$R^2$ **	R cuadrada (R-squared)
$R^2$ Aj (Adj $R^2$ )	R cuadrada ajustada (Adjusted R squared)
$R^2$ Pred (Pred $R^2$ )	R cuadrada predicha (Predicted R squared)
Precisión Ad (Adeq presicion)	Precisión adecuada (Adequate presicion)
h **	Hora (Hour)
mg **	Miligramos (Miligrames)
g **	Gramos (Grames)
°C **	Grados Celsius (Grade Celsius)
% **	Porcentaje (Percentage)
W **	Vatio (Watts)
Bar **	Barómetro (Barometer)



V **	Voltio (Volt)
Hz **	Hercio (Hertz)
kHz **	Kilohercio (Kilohertz)
8-HQ **	8-Hidroxiquinolina (8-Hidroxiquinoline)
CLAR (HPLC)	Cromatografía de líquidos de alta resolución (High-performance liquid chromatography)
CCF (TLC)	Cromatografía en capa fina (Thin-layer chromatography)
UV **	Ultravioleta (Ultraviolet)
(TIC) *	Cromatografía de iones totales (Total ion chromatogram)

---

\*El acrónimo no tiene traducción.

\*\*El acrónimo permanece igual en español e inglés.

## INTRODUCCIÓN

Formación y educación, dos palabras que juntas deberían conformar los cimientos fundamentales de toda sociedad, apegadas a normas y leyes, proveen de evolución. Por lo tanto, es esencial contar con profesionistas e instituciones que impulsen este desarrollo. En la educación superior o profesional, se llevan a cabo procesos de aprendizaje, donde se forman profesionistas en pro de la sociedad, con la intención de innovar e impulsar a la sociedad. Sin embargo, previo a concluir esta formación, es necesario acreditar el grado y esto solo se logra mediante una titulación profesional.

La Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México cuenta con varias opciones de titulación, de entre las cuales se encuentra una modalidad que consiste en que el egresado se incorpore oficialmente a un proyecto de investigación que dé como resultado un “Artículo de Investigación”. En consecuencia, la participación del egresado en la elaboración de un escrito ya sea tesis o tesina y un artículo académico aceptado para su publicación en una revista arbitrada de acuerdo con las características que el Consejo Técnico o Comité Académico correspondiente haya determinado. En adición a esta modalidad, se debe presentar una réplica oral de dicho trabajo de investigación.

Al respecto de lo antes mencionado, en la presente tesina, se presenta un artículo intitulado **Plumbagin Extraction: A Green Study**, publicado por la revista *Natural Product Communications*, en el volumen 18, número 7, páginas 1-11, DOI: 10.1177/1934578X231191345. Esta investigación es parte de un volumen especial en memoria del profesor Dr. Pedro Joseph-Nathan (ver Apéndice A).

En este artículo se informa sobre la extracción de plumbagina, a partir del espécimen *Plumbago pulchella* Boiss (endémico de México) empleando métodos alternos para activar la extracción, incidiendo en el Protocolo de la Química Verde (PQV), conocido más comúnmente como Los Doce Principios, que bien aplicados ayudan en el desarrollo e innovan procesos para lograr bajo o nulo riesgo para el ambiente y, en consecuencia, para la salud humana. La Química Verde (QV) es una manera excelente de contribuir al Desarrollo Sostenible (DS).

La plumbagina es un metabolito natural del género *Plumbago*, que ha creado gran interés, dado que posee importantes actividades farmacológicas. Es apropiado resaltar, que los métodos de extracción empleados comúnmente en la literatura regularmente presentan desventajas significativas, ya que implican tanto el uso de disolventes inapropiados, así como de tiempos de extracción prolongados.

En consecuencia, el presente estudio surge ante esta necesidad y expone opciones para la extracción de plumbagina, resaltando la aplicación de algunos principios de la QV.

Además, es conveniente resaltar que, este trabajo implica la primera contribución química para esta planta; afirmación inequívoca como lo demuestra el resultado de una profunda revisión de la literatura química.

Los resultados, presentados de forma resumida revelan que: se requirieron tiempos cortos de extracción, cantidades bajas de espécimen vegetal, además de emplearse comparativamente diversas fuentes alternas para la activación: dos irradiaciones electromagnéticas el infrarrojo cercano (IRC) y las microondas (MO), así como dos técnicas mecánicas, el ultrasonido (US) y la triboquímica-mecano química (TQ), evaluándolos con respecto a la forma clásica de mantilla de calentamiento (MC) y la maceración (M). Los métodos de activación MO y US con calentamiento (US-MC) resultaron los mejores. En cuanto a los disolventes, se utilizaron acetona, *n*-hexano, acetato de etilo y metanol, donde el AcOEt (verde) y el *n*-hexano (no verde) proporcionaron los mejores rendimientos. Es obligado resaltar que tanto el seguimiento de extracción y la cuantificación del metabolito se realizaron por CG-EM usando como referencia 8-hidroxiquinolina, validado el estudio con la norma-guía ICH Q2 R2 2022 y estadísticamente mediante ANOVA.


En adición, el artículo fue presentado en la modalidad presencial como un cartel estudiantil en el Congreso Internacional de la Sociedad Química de México, CISQM2023, “La Química: de México para el Mundo”, titulado: “Estudio de la extracción verde de la plumbagina”, de los autores “Fernanda Itzel Calzada González, Joel Omar Martínez, Yolanda Marina Vargas Rodríguez, Luis Barbo Hernández Portilla, María Inés Nicolás Vázquez, René Miranda Ruvalcaba”, y con clave asignada “CISQM-QSUS-CE02”, evento acontecido del 2 al 6 de octubre, 2023. El trabajo consiguió una mención honorífica (ver Apéndice B)

## ARTÍCULO ORIGINAL

A continuación, se presenta el artículo original, no se ha alterado para conservar la esencia de este. En el Apéndice C se encuentra la información complementaria del artículo, entregada a la Editorial de la revista *Natural Product Communications*.



# Plumbagin Extraction: A Green Study

Fernanda I. Calzada-González<sup>1</sup>, Joel Martínez<sup>1</sup> ,  
Yolanda M. Vargas-Rodríguez<sup>1</sup>, Luis B. Hernández-Portilla<sup>2</sup>,  
M. Inés Nicolás-Vázquez<sup>1</sup> and René Miranda<sup>1</sup>

Natural Product Communications  
Volume 18(7): 1–11  
© The Author(s) 2023  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/1934578X231191345  
journals.sagepub.com/home/npx



## Abstract

A green study was undertaken for the extraction of plumbagin, an important natural naphthoquinone, from the roots of *Plumbago pulchella* Boiss. In the first stage, four solvents were comparatively evaluated, acetone, *n*-hexane, ethyl acetate, and methanol; attending *Principle* #5, only green solvents (ethyl acetate and acetone) were underscored. In a second step, considering *Principle* #6, various green alternative activating modes were assessed: two electromagnetic methods, microwave (MW) and near-infrared (NIR), in addition to mechanical approaches, ultrasound (US), and tribochemistry-mechanochemistry (TB-MCh). These green modes were studied in comparison to the classical mantle heating (MH) and finally with maceration (M). MW and US-MH ensued the better modes, and EtOAc (green) and *n*-hexane (non-green) displayed the best yields (0.027% and 0.025%, respectively). Focusing on *Principle* #11, the monitoring and quantification of the extractions were performed by GC-MS employing 8-hydroxyquinoline as a reference. Some other involved *Principles* (#1, #3, #7, #12) will be commented on in the discussion. As an important complement, a statistical technique based on the analysis of variance (ANOVA) and response surface methodology was used to establish the degree of dependence of the amount of plumbagin extracted with the parameters time and amount of root, in addition to a GC-MS validation process carried out according to ICH Q2 R2 2022 guidelines. Finally, it is convenient to highlight that the target plant is native to Mexico, and according to a profound literature search, no chemical information for *Plumbago pulchella* Boiss is accessible.

## Keywords

*Plumbago pulchella* Boiss, quinone, plumbagin, extraction, green approach

Received: April 7th, 2023; Accepted: July 13th, 2023.

## Introduction

Nowadays the green chemistry paradigm has acquired great importance wishing; to highlight that it is focused on the molecular level, accomplishing sustainability.<sup>1,2</sup> In this sense, it is unequivocally positioned as an important scientific tool to prevent pollution (or at least minimize it). Green chemistry is engaged by a protocol, the *Twelve Principles*,<sup>3</sup> it being important to emphasize that along with it, the green chemical researchers design, develop, and many times innovate processes to attain low or no risk to the environment and consequently to human health. It is also important to highlight, that no chemical activity is completely risk-free and waste-free. Therefore, the “*Twelve Principles* of green chemistry” must be assumed and accomplished as a scientific reflection.<sup>4</sup> In addition, it is noteworthy that green chemistry is currently considered an excellent way to contribute to sustainable development.<sup>2,5</sup> Consequently, chemists are required to attend both the “*UNESCO-Decade Call* (2005–2014) for a sustainable education (teaching, investigation, and diffusion),” in addition to Agenda 30-ONU (2015-2030), a protocol related to the 17 sustainable development goals.

Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) (Figure 1), a naturally occurring metabolite of the *Plumbago* genus, has created

great interest. It exhibits many valuable pharmacological activities<sup>6</sup>: anti-cancer,<sup>7-11</sup> leishmanicidal,<sup>12</sup> bactericidal,<sup>13</sup> anti-fungal,<sup>14</sup> anti-fertility,<sup>15</sup> hypolipidemic,<sup>16</sup> hyperglycemic,<sup>17</sup> and antioxidant,<sup>18</sup> among others. The major commercial species of the *Plumbago* genus is *Plumbago zeylanica*, which is highly cultivated in the south of India. However, it is important to mention that the content of plumbagin in this genus is low, *Plumbago zeylanica* 0.25 to 1.34%, *Plumbago rosea* 0.57 to 1.0%, and *Plumbago capensis* 0.15 to 0.43%.<sup>6</sup>

As a consequence of the last comments, some research groups have focused their efforts on improving the extraction of plumbagin, employing several extraction methods: maceration,<sup>19-21</sup> serial maceration,<sup>21</sup> dynamic maceration,<sup>20</sup> mantle

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, Mexico

<sup>2</sup>Laboratorio Nacional en Salud, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, Mexico

## Corresponding Author:

René Miranda, Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, 54740, México.

Email: mirruv@yahoo.com.mx





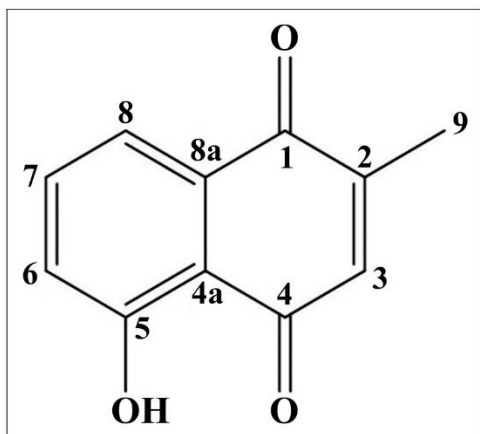


Figure 1. Plumbagin structure.

heating,<sup>20,21</sup> and ultrasound.<sup>20,21</sup> However, some of them have shown disadvantages: the use of chloroform<sup>20</sup> or its mixture with dichloromethane,<sup>19</sup> which are considered toxic solvents,<sup>22</sup> and the requirement of long extraction times, even days, employing as solvents, *n*-hexane, methanol, water, chloroform, or ethyl acetate.<sup>19-21</sup>

After an exhaustive search of the literature, and consequently, to our knowledge, there is minimal information related to the chemistry and extraction of *Plumbago pulchella* Boiss: only three studies were found: cytotoxic activity,<sup>23</sup> skincare formulation,<sup>24</sup> and the hyperaccumulation occurring in ultramafic vegetation.<sup>25</sup> It is important to highlight that this species is native to Mexico (Figure S1; Supporting Information).<sup>26</sup>

As a part of our research program, green chemistry, attending both “UNESCO-Decade Call (2005-2014) for a Sustainable Education (teaching, investigation, and diffusion)” and the Agenda 30-ONU (2015-2030), we have performed interesting comparative natural product isolation studies.<sup>27,28</sup> This is in addition to accomplishing various green synthetic strategies to achieve the pharmacological activity of many important molecules.<sup>29-33</sup>

Related to the above comments, this work is offered as a green approach for the extraction of plumbagin from the roots of *Plumbago pulchella* Boiss: evaluating mainly green solvents (Principle #5), ethyl acetate, and acetone, estimating green alternative activating modes (Principle #6), microwave (MW) and near-infrared (NIR) electromagnetic irradiations, also mechanical approaches such as ultrasound (US), and tribochemistry-mechanochemistry (TB-MCh), in comparison with classical mantle heating (MH) and maceration (M). It is significant to mention that the quantification and monitoring (Principle #11) of the extractions were determined by GC-MS. Moreover, a statistical technique (ANOVA) was used to establish the degree of dependence of the amount of plumbagin extracted with the parameters time and amount of root. In addition, a GC-MS validation

Table 1. Quantification of Plumbagin by GC-MS (1 g of Root).

Extraction time (h)	2.5	5	7.5
Solvent	Extraction yield (mg/50 g)		
MeOH	0.69	0.70	0.72
Acetone	0.79	0.82	0.83
EtOAc	1.03	1.12	2.25
<i>n</i> -Hexane	1.61	1.78	2.26

The provided data are the mean of three replications.

study was performed working with the ICH Q2 R2 2022 guidelines.

## Results and Discussion

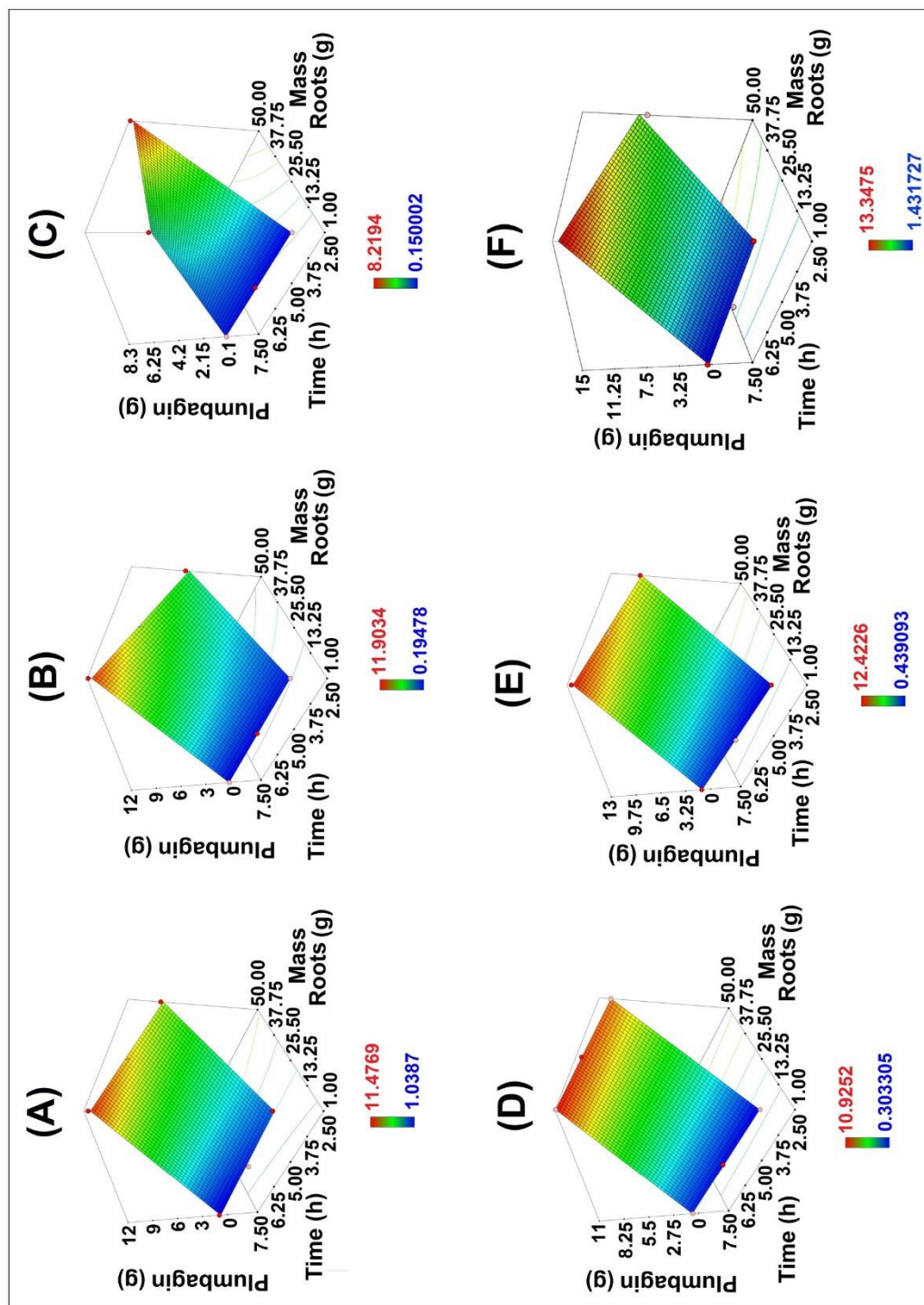
Plumbagin/5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone was identified from its physical, spectroscopic, and mass spectrometric data and comparison with literature<sup>34-36</sup>: identification complemented by new information: HRMS-DART<sup>+</sup> (19.8 eV) *m/z* (% ra) [assignment]: 189(100%) [M + 1]<sup>+</sup>, accurate mass 189.05562, exact value 189.05517, error: 0.45 ppm, unsaturations 7.5, for C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>, protonated molecule [M + H]<sup>+</sup>.

To establish appropriate primary conditions, the results of previously reported works<sup>19-21</sup> were considered: the solvents used were chloroform,<sup>20</sup> dichloromethane,<sup>19</sup> *n*-hexane, EtOAc, MeOH, and water,<sup>21</sup> in addition to chloroform-MeOH and chloroform-dichloromethane<sup>19</sup> mixtures. The employed modes used for extraction were Soxhlet (MH),<sup>20</sup> and serial maceration extraction (M),<sup>21</sup> the times were 2.5, 5, and 7.5 h.<sup>19-21</sup>

In the first stage, the MH mode was assessed considering two quantities of plant roots, 50 and 1 g, employing four solvents: *n*-hexane, EtOAc, MeOH, and acetone (chloroform and dichloromethane are unquestionable non-green), for three extraction times: 2.5, 5, and 7.5 h, screening the extracts by GC-MS (Table 1). As can be seen, the solvents *n*-hexane and EtOAc provided better extraction yields (2.26 and 2.25 mg/g at 7.5 h). However, using acetone, considered a green solvent, this level was not reached. It is also noteworthy that both *n*-hexane and MeOH have been recently considered highly toxic according to the TRI-list<sup>22</sup>; disrupting the green chemistry protocol.<sup>37</sup> They were, therefore, discarded from the green study.

Consequently, according to the previously obtained results, the green study was implemented using only EtOAc (in this work, the best green solvent) for the extraction of plumbagin, with 10 or 120 mL for 1 or 50 g of roots, respectively, at low extraction times of 7.5, 5, and 2.5 h, using for comparison, the following extraction modes: MH, US, TB-MCh, MW, US-MH, NIR, and M, monitoring the extraction by quantification of plumbagin by GC-MS.

The obtained data, in general, the mean of three replicates, of all the extractions are summarized in Table S1 (Supporting Information), and the corresponding graphical representation (providing enhanced objectivity) is shown in Figure 2.



**Figure 2.** Quantification of plumbagin employing GC-MS for 50 g of roots, (A) MH, (B) NIR, (C) TB-MCh, (D) US, (E) US-MH, and (F) MW. Abbreviations: MH, mantle heating; NIR, near-infrared; TB-MCh, tribochemistry-mechanochemistry; US, ultrasound; MW, microwave.



**Table 2.** Levels of Variables Considered for Experimental Design.

Variable	Symbol	Unit	Coded and levels		
			Low	Middle	High
Mass roots	X1	g	1	–	50
Time	X2	h	2.5	5	7.5

### Statistical ANOVA Analysis

Through the analysis of variance and response surface methodology, a random experimental factorial design was generated, using the data from Table 2.

The results of the analysis were evaluated based on statistical values of the sum of squares (SS), degrees of freedom, the mean SS (MSS), Fisher variation ratio ( $F$ -value), and probability ( $P$ -value). Results of the ANOVA analysis are shown in Table 3, and the interaction between the process variables is illustrated by the 3D response surface plots (Figure 2). The optimum process parameters are calculated using the fitted model 2FI and validated by the experiments.

The  $\text{Prob} > F$  values were 0.0059, <0.0001, 0.0034, 0.0008, 0.0043, and 0.158 for the extractions using the NIR, US, MH, US-MH, TB-MCh, and MW methods, respectively. These results were less than 0.050, indicating that this model term is significant.<sup>38</sup> Regarding time, was found that the  $\text{Prob} > F$  values for the activation modes of US, US-MH, and TB-MCh were 0.0187, 0.0311, and 0.0222, respectively, indicating that time is also significant for these extraction methods. For the MW, NIR, and MH activation methods, the  $\text{Prob} > F$  values were 0.2868, 0.0602, and 0.2232, respectively. These results were greater than 0.05, and, therefore, not significant for the MW, NIR, and MH activation modes. However, if the values of  $\text{Prob} > F$  are not greater than 0.100, they can be considered significant. Thus, in all those cases, only NIR is significant.

The analysis of the standard deviation, R-squared ( $R^2$ ), adjusted R squared (Adj R squared), predicted R squared (pred R squared), and the adequate precision (Adeq precision) of the models are in reasonable agreement (Table 4). Adequate precision (Adeq precision) measures the signal-to-noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Ratios of 18.31, 122.23, 21.85, 42.94, 23.63, and 10.30 for NIR, US, MH, US-MH, TB-MCh, and MW modes, respectively, showed adequate signals. These results indicate that this model can be used to navigate in the design space (Figure 2).

Based on the ANOVA analysis, the final equations that represent the behavior of the model for the extraction of plumbagin based on the activation modes NIR, US, MH, US-MH, TB-MCh, and MW are represented by equations S1-S6 (Supplementary Information).

Considering the comments, which agree with the data shown in Figure 2, Table 5 displays the best yields, both in weight and in percent, of plumbagin, for the different employed methods for the extraction of the target molecule. It is convenient to note that to obtain better objectivity the same results are displayed in Figure 3.

**Table 3.** ANOVA for the Response Surface Model 2FI Suggested Extraction.

Source	Sum of squares	Degrees of freedom (df)	Mean square	F	Prob > F
MH					
Model	104.35	3	34.78	103.89	0.0095
A-Mass roots	98.38	1	98.38	293.82	0.0034
B-Time	1.02	1	1.02	3.04	0.2232
AB	4.96	1	4.96	14.80	0.0614
Residual	0.67	2	0.33		
Cor Total	105.02	5			
NIR					
Model	114.13	3	38.04	67.27	0.0147
A-Mass roots	94.71	1	94.71	167.47	0.0059
B-Time	8.55	1	8.55	15.12	0.0602
AB	10.87	1	10.87	19.23	0.0483
Residual	1.13	2	0.57		
Cor Total	115.26	5			
TB-MCh					
Model	52.22	3	17.41	107.02	0.0093
A-Mass roots	37.35	1	37.35	229.63	0.0043
B-Time	7.09	1	7.09	43.60	0.0222
AB	7.78	1	7.78	47.84	0.0203
Residual	0.33	2	0.16		
Cor Total	52.55	5			
US					
Model	145.11	3	48.37	4308.06	0.0002
A-Mass roots	144.38	1	144.38	12,859.12	<0.0001
B-Time	0.58	1	0.58	52.04	0.0187
AB	0.15	1	0.15	13.02	0.0689
Residual	0.022	2	0.011		
Cor Total	145.14	5			
US-MH					
Model	153.07	3	51.02	429.39	0.0023
A-Mass roots	148.21	1	148.21	1247.22	0.0008
B-Time	3.64	1	3.64	30.63	0.0311
AB	1.23	1	1.23	10.33	0.0847
Residual	0.24	2	0.12		
Cor Total	153.31	5			
MW					
Model	186.28	3	62.09	22.62	0.0426
A-Mass roots	169.78	1	61.86	61.68	0.158
B-Time	5.68	1	5.68	2.07	0.2868
AB	10.82	1	10.82	3.94	0.1855
Residual	5.49	2	2.74		
Cor Total	191.77	5			

### Prime Results

The response surface data of the 2FI model (Figure 2A–E) are conveniently summarized in Table 5 and Figure 3A–B. The optimal conditions for the extraction of plumbagin, employing EtOAc, the better green solvent, and 50 g roots were: MH time 7.5 h (11.48 mg/0.023%), NIR time



7.5 h (11.90 mg/0.024%), TB-MCh time 2.5 h (8.22 mg/0.016%), US time 7.5 h (10.93 mg/0.022%), US-MH time 7.5 h (12.42 mg/0.025%), and MW time 7.5 h (13.35 mg/0.027%).

In this regard, the most convenient green approaches correspond to US-MH time 7.5 h (12.42 mg/0.025%), employing EtOAc as the solvent. Nevertheless, the use of MW (1300 Watts, 65 °C, 0.7799 bar) as activating mode for the extraction of the target compound must be highlighted since at the first assessment of 50 g roots, time 5 h, and EtOAc-greener solvent, the higher yields were achieved (13.34 mg corresponding to 0.027%).

**Table 4.** Descriptive Statistics Data Analysis for the 2FI Model.

Extraction method	Standard deviation	R-squared	Adj R squared	Pred R squared	Adeq precision
MH	0.58	0.9936	0.9841	0.9139	21.85
NIR	0.75	0.9902	0.9755	0.8675	18.31
TB-MCh	0.40	0.9938	0.9845	0.9164	23.63
US	0.11	0.9998	0.9996	0.9979	122.23
US-MH	0.34	0.9984	0.9961	0.9791	42.94
MW	1.66	0.9714	0.9284	0.6136	10.30

Adj, adjusted; Pred, predicted; Adeq, adequate.

Abbreviations: MH, mantle heating; NIR, near-infrared; TB-MCh, tribochemistry-mechanochemistry; US, ultrasound; MW, microwave.

**Table 5.** Summarized Yields of Plumbagin.

Activation energy	Mass root (g)	Yield (mg plumbagin)	Yield (% plumbagin)
MH	50	11.48	0.023
NIR	50	11.90	0.024
TB-MCh	50	8.22	0.016
US	50	10.93	0.022
US-MH	50	12.42	0.025
MW	50	13.35	0.027

Abbreviations: MH, mantle heating; NIR, near-infrared; TB-MCh, tribochemistry-mechanochemistry; US, ultrasound; MW, microwave.

Complementarily, it is convenient to comment that the maceration mode (M), with excellent incidence in *Principle #6* of green chemistry, was discarded since even after more than 12 h (50 g/EtOAc), only traces of plumbagin were detected, as evidenced by monitoring by GC-MS, see Supplementary Information (Figures S3–S8).

### Conventional Mantle Heating-Thermal Conditions for (Reflux) Extraction

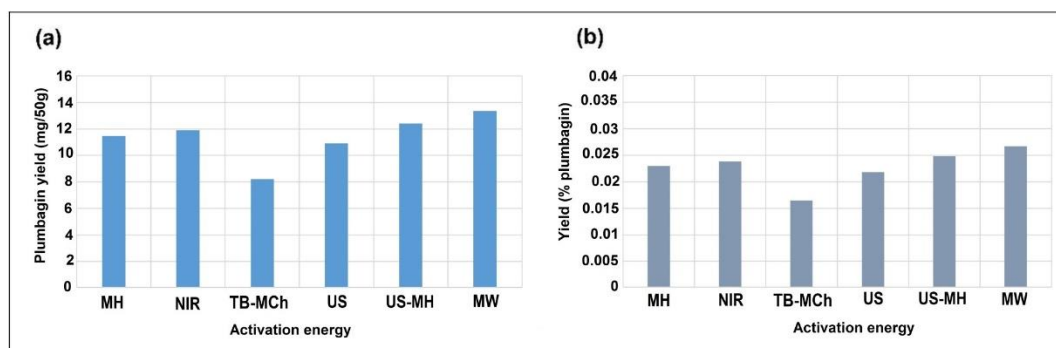
It is well known that MH processes are governed by temperature and solvent recycling<sup>28</sup>; in this work, plumbagin was obtained with good yield (mg and %) (Figures S3–S8). In this case, the solvent, EtOAc, has a convenient dielectric constant of 6.0 D<sup>39</sup> to improve the solvent/plumbagin interactions, favoring the solubility-selectivity of the target compound. According to the response surface of the 2FI model shown in Figure 2(A), the optimal conditions for the extraction of plumbagin with MH were 7.5 h and 50 g roots.

### NIR Promoted Extraction

The plumbagin yield obtained by NIR was very close to that of the MH process, according to the TIC chromatogram (Figures S6–S8). In addition, infrared irradiation can induce different vibration modes in the molecules providing high energy efficiency.<sup>40,41</sup> Additionally the irradiation can be directly absorbed by the root tissues and solvent. Consequently, this irradiation can directly heat the solvent-*Plumbago* roots mixture, facilitating the extraction of the metabolite from the sample matrix.<sup>27,28</sup> According to the response surface of the 2FI model shown in Figure 2(B), the optimal conditions for the extraction of plumbagin with NIR were 7.5 h and 50 g roots.

### TB-MCh-Assisted Extraction

An appropriate explanation related to the low plumbagin yields for this procedure (Figures S3–S8) is the poor production of



**Figure 3.** Summarized yields in percent of plumbagin, using 50 g of root: (A) plumbagin yield (mg), and (B) yield (% plumbagin).

tribomicroplasma in the vicinity of the sliding contact area between the *Plumbago* roots and the mortar-pestle,<sup>42</sup> in addition to lower friction conditions provoking lesser intensity toward the extract mixture.<sup>43</sup> According to the response surface of the 2FI model shown in Figure 2(C), the optimal conditions for the extraction of plumbagin with TB-MCh were 2.5 h and 50 g roots.

#### US-Assisted Extraction

Extraction assisted only by ultrasound displayed a yield slightly lower than that of MH and NIR (Figures S3–S5). In other words, the cavitation effects produced good interaction with the cellular structure in the tissues and disruption of the cell walls, releasing the metabolite of interest by a convenient solvent penetration.<sup>27,28</sup> According to the response surface of the 2FI model shown in Figure 2(D), the optimal conditions for the extraction of plumbagin with US were 7.5 h and 50 g roots.

#### Ultrasound-Reflux-Assisted Extraction

This procedure offered better plumbagin extraction, in comparison to the previously reported methods<sup>19–21</sup> (Figures 3, and S3–S8); however, it was not for this study. At this point, the synergy between the cavitation effect and the direct heating by a typical reflux process increased the yield by a higher disruption of the root cell walls and solvent/solute interactions, facilitating the release of the target molecule due to better mass transfer of the metabolite from the sample matrix.<sup>27,28</sup> According to the response surface of the 2FI model shown in Figure 2(E), the optimal conditions for the extraction of plumbagin with US-MH were 7.5 h and 50 g roots.

#### Microwave-Assisted Extraction

It is convenient to highlight that the MW mode afforded the best extraction yield of 13.35 mg/50 g roots (Figures 3 and S6–S8) and the best yield percent (0.27%) of plumbagin (Table 5). Appropriate facts to explain these results are in agreement between the solvent and the plumbagin polarity (convenient dielectric constant)<sup>39</sup> required by the MW procedure to achieve suitable interactions. In addition, MW engenders high pressures, supporting a rupture of the cell wall of the roots, favoring the interaction of solvent-plumbagin.<sup>28,44–46</sup> According to the response surface of the 2FI model shown in Figure 2(F), the optimal conditions for the extraction of plumbagin with MW were 5 h and 50 g roots.

#### Conventional Extraction by Maceration

This procedure provided the lowest extraction value and longest extraction time (days) in comparison to MH, US, US-MH, NIR, TB-MCh, and MW. This was probably due to lower mass transfer of the metabolite from the sample matrix and poor solvent/solute interactions<sup>28</sup>; heat is necessary to obtain a good extraction.

#### Green Chemical Discussion

The green chemistry protocol is offered as an eco-study for the extraction of plumbagin from the roots of *Plumbago pulchella* Boiss. In this sense, green chemistry is not different from traditional chemistry but only has special considerations for the implementation of new designs to prevent pollution.<sup>3</sup> According to Anastas and Warner,<sup>3</sup> the green chemistry protocol is based on *Twelve Principles*. However, in this study, the only principles discussed are those with evident concern toward the green chemistry protocol. (a) Related to *Principle #1* (it is better to prevent waste than to treat or clean up waste after it is formed).<sup>3</sup> This is shown by the TIC chromatogram in which peaks other than that of plumbagin must be due to other metabolites (not of interest in this study). Hence the employment of methanol was avoided, and the selectivity was improved by ethyl acetate diminishing the waste. (b) Ethyl acetate, a green solvent,<sup>22,47</sup> was the best option, provoking the incidence of *Principle #5* (the use of auxiliary substances [eg, solvents, separation agents, etc] should be made unnecessary wherever possible and innocuous when used).<sup>3</sup> (c) A high prevalence of *Principle #6* (energy requirements should be recognized for their environmental and economic impacts and should be minimized. Synthetic methods should be conducted at ambient and pressure),<sup>3</sup> diminishing the energetic consumption and the economic impacts; this fact is unequivocally involved since several green alternative activating modes, microwave and NIR electromagnetic irradiations, also mechanical approaches such as ultrasound, and tribochemistry-mechanochemistry, in comparison with the classical mantle heating (MH) and maceration (M). (d) *Principle #7* (raw material of feedstock should be renewable rather than depleting wherever technically and economically practicable)<sup>3</sup> was involved. The roots of *Plumbago pulchella* Boiss are renewable, and the species is perennial. (e) Significant incidence of *Principle #11* (analytical methodologies need to be further developed to allow for real-time, in process monitoring and control prior to the formation of hazardous substances)<sup>3</sup> is highlighted and displayed since the monitoring of the extractions was by GC-MS.<sup>48</sup> (f) Finally, *Principles #3* (wherever practicable, synthetic methodologies should be designed to use and generate substances that possess little or no toxicity to human health and the environment)<sup>3</sup> and *#12* (substances and the form of a substance used in a chemical process should be chosen so as to minimize the potential for chemical accidents, including releases, explosions, and fires)<sup>3</sup> were implicated, since EtOAc has been categorized as a green solvent due to its low toxicity, explosiveness, flammability, and good degradability.<sup>47</sup>

#### Conclusions

A green study for the extraction of plumbagin, an important natural naphthoquinone, from the roots of *Plumbago pulchella* Boiss was accomplished. According to a profound literature search, it seems that it is the first chemical contribution for



the target plant; in this sense, it is convenient to highlight that the evaluated specimen is a native of Mexico.

Ethyl acetate, in general, was the best solvent, giving the best yields (weight and %) with MW irradiation; the US-MH procedure also gave good results.

Evaluation of the extraction of plumbagin was validated by the application of profound statistical analysis.

Finally, unequivocally a green approach is offered since a metrical evaluation has been performed. In this sense, the obtained results are in excellent agreement with the Green Chemistry Protocol, which is currently considered an excellent way to contribute to Sustainable Development; in addition, the results complied with both the “UNESCO-Decade Call (2005-2014) for a Sustainable Education (teaching, investigation, and diffusion)” and the Agenda 30-ONU (2015-2030).

## Ethical Approval

Ethical approval is not applicable to this article.

## Statement of Human and Animal Rights

This article does not contain any studies with human or animal subjects.

## Statement of Informed Consent

There are no human subjects in this article and informal consent is not applicable.

## Material and Methods

### General

Plumbagin, 8-hydroxyquinoline ( $\geq 99\%$ , 8-HQ) and HPLC grade *n*-hexane were purchased from Sigma-Aldrich Chemistry (St. Louis, MO, USA). *n*-hexane, ethyl acetate, acetone, and methanol were technical grade and were used as received from Materiales y Abastos Especializados S.A. de C.V. (Zapopan, Jalisco, Mexico). The plumbagin extractions were accomplished from the roots of *Plumbago pulchella* Boiss. The identification and presence of the target molecule were monitored by GC-MS (Figures S2), in addition to comparative thin-layer chromatography (TLC), using *n*-hexane/ethyl acetate 85:15 as eluent, employing silica gel 60-F<sub>254</sub> coated aluminum sheets and visualization with a 254 nm UV lamp.

Microwave-assisted extraction of 50 g of roots was achieved using a Multiwave Pro Solv 60 Hz reactor (Anton Paar, México). However, for 1 g of material, the microwave-assisted extraction was performed using a CEM Focused Microwave™ Synthesis System (CEM Corporation, Matthews, NC, USA). For the NIR irradiation extractions, a commercially available Flavor Wave device was used (Model AX-767MH, 1350 W/

110 V/120 V-60 Hz–220 V/240 V-60 Hz) (Made in China). US-assisted extraction was performed using a Branson 1510 ultrasonic bath (80 W, 40 kHz) (Gaithersburg, MD, USA). Mecanochemical-assisted extraction experiments were performed using an IntelliMixer device model RM-2M (ELMI Ltd, Latvia) for samples of 1 g, and a mortar and pestle (volcano rocks) was used for samples of 50 g. In the NIR and US experiments, the temperatures were determined using an infrared thermometer (Infrared + Type K Thermometer, Extch Instruments, Sigma-Aldrich 2509388-1, St. Louis, MO, USA), with the laser point directed toward the center of the extraction mixture. GC-MS was carried out and validated (see Supplementary Information) using a 6850 G2630A/G3170A gas chromatogram in line with a JMS 5975C spectrometer (Agilent Technologies, CA, USA). GC was performed using a 5% phenylmethylsilicon column (30 m  $\times$  0.25  $\mu$ m, 0.25  $\mu$ m) Agilent 19091s-433e. The linear velocity of the helium carrier gas was 0.9 mL/min. The injector and detector temperatures were 250 and 300 °C, respectively, and they were held for 6 min with a split mode of 1:50. 8-Hydroxyquinoline (8-HQ) was employed as an internal reference to quantify the plumbagin. Related to the physical and spectroscopic characterization of plumbagin, the melting point was determined using a Fisher Johns apparatus and is uncorrected. The EIMS (70 eV) was determined using a JEOL JMS-700 MStation mass spectrometer (JEOL, Peabody, MA, USA). The HRMS-DART<sup>+</sup> data were obtained using a JEOL AccuTOF (Direct Analysis in Real Time) mass spectrometer (JEOL, Peabody, MA, USA). The measurements were performed using a DART experiment with polyethylene glycol 400 as an internal reference at 6000 resolutions and triplet helium as carrier gas at 350 °C.

### Plant Material

The roots of *Plumbago pulchella* Boiss were collected in January 2022 in the northeast of State Park Sierra de Guadalupe, Ecatepec de Morelos, Mexico, at the coordinates: west hill 19.5917678, north hill -99.0597134, height 7767.98 feet. The specimen was identified by authorities of the Ecological Park Ehécatl, zone leader Luis Hernández Ramírez, and biologist Montserrat Ramírez Hernández.

### Typical Extraction by Maceration

Independent experiments were conducted using 0.5, 1, 5, 10, 30, or 50 g of dried and milled roots of *Plumbago pulchella* Boiss. These samples were mixed with 10, 15, 30, 60, 90, or 120 mL of *n*-hexane, ethyl acetate, acetone, or methanol and macerating for 2.5, 5, 7.5, or 12 h at room temperature.<sup>21</sup> Each experiment was systematically monitored by TLC (*n*-hexane/ethyl acetate 85:15; in silica) employing an authentic commercial sample of plumbagin; after this time, the extracts were filtered and dried under vacuum.

### Extraction Using Typical Mantle Heating-Thermal Conditions (Reflux)

Independent experiments were conducted with either 1 g or 50 g of dried and milled roots of *Plumbago pulchella* Boiss with either 10 or 120 mL of ethyl acetate, *n*-hexane, MeOH, or acetone, respectively, and refluxed for 2.5, 5, or 7.5 h at 63–65 °C.<sup>21</sup> Each extract was systematically monitored by TLC (*n*-hexane/ethyl acetate 85:15; on silica gel) employing an authentic commercial sample of plumbagin; after this time, the extracts were filtered and dried under vacuum.

### Typical Extraction Using Nonconventional Activating Sources

NIR irradiation: independent experiments were conducted using either 1 or 50 g of *Plumbago pulchella* Boiss roots, with either 10 or 120 mL of EtOAc, respectively, for 2.5, 5, or 7.5 h between 63 °C and 65 °C. In this extraction, several irradiations of 10 min each were carried out, with a pause of 5 min between each irradiation, to avoid the solvent boiling. Each extract was systematically monitored by TLC (*n*-hexane/ethyl acetate 85:15; on silica gel) employing an authentic commercial sample of plumbagin; after this time, the extracts were filtered and dried under vacuum.

Microwave irradiation: independent experiments were conducted. Either 1 or 50 g of the roots of *Plumbago pulchella* Boiss, along with either 10 or 120 mL of EtOAc, respectively, was irradiated with 300 W of power for 2.5, 5, or 7.5 h, or 1300 W of power at 60 °C for 2.5, 5, or 7.5 h. Each extract, was monitored by TLC (*n*-hexane/ethyl acetate 85:15; on silica gel) employing an authentic sample of plumbagin; after this time, the extracts were filtered and dried under vacuum.

Tribochemistry-mechanochemical: either 1 or 50 g of *Plumbago pulchella* Boiss roots, along with either 10 or 120 mL of EtOAc, respectively, were ground either in an intelli mixer with the shake and rocking UU mode with 80 r/min, using five carbon steel balls of 3/16 inches diameter, or mechanical milled with a mortar and pestle, respectively, for 2.5, 5, or 7.5 h at room temperature. Hence, it is important to note that due to solvent evaporation in the second method, it was necessary to add an extra 100 mL of solvent. The extract of each experiment was systematically monitored by TLC (*n*-hexane/ethyl acetate 85:15; in silica) employing an authentic commercial sample of plumbagin; after this time, the extracts were filtered and dried under vacuum.

Ultrasound: independent experiments were conducted using either 1 or 50 g of *Plumbago pulchella* Boiss roots with either 10 or 120 mL of EtOAc, respectively. These were sonicated for 2.5, 5, or 7.5 h at room temperature. All the extracts were systematically monitored by TLC (*n*-hexane/ethyl acetate 85:15; on silica gel) employing an authentic sample of plumbagin; after this time, the extracts were filtered and dried under vacuum.

Ultrasound extraction under reflux: independent experiments were conducted using either 1 or 50 g of *Plumbago pulchella* Boiss roots with either 10 or 120 mL of EtOAc, respectively. These were sonicated for 2.5, 5, or 7.5 h between

63 °C and 65 °C. The extract of each experiment was systematically monitored by TLC (*n*-hexane/ethyl acetate 85:15; on silica gel) employing an authentic sample of plumbagin; after this time, the extracts were filtered and dried under vacuum.

### Plumbagin Quantification

*GC-MS Determinations.* Plumbagin quantification in the extract was performed by GC-MS using 8-HQ as an internal standard. The 8-HQ solution was prepared by dissolving 2 mg of 8-HQ in 0.5 mL HPLC grade *n*-hexane. Then, 2.8 mL of HPLC grade *n*-hexane was added to each extract. The analysis of the sample was prepared by mixing 20 µL of the extract with 20 µL of 8-HQ, and dissolving the mixture in HPLC-grade *n*-hexane. Then, 2 µL of the mixture was injected into the GC-MS equipment. The quantification was determined as follows:

$$\text{Plumbagin} \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \text{mg of 8 - HQ in 2 } \mu\text{L} \\ \times \frac{\text{peak total area of plumbagin}}{\text{peak total area of 8 - HQ}} \times \frac{40 \mu\text{L}}{2 \mu\text{L}} \\ \times \frac{2.8 \text{ mL}}{0.02 \text{ mL}}$$

*GC-MS Validation Process.* The GC-MS validation process was carried out according to ICH Q2 R2 2022 guidelines. The suitability of the system was established by verifying the operation of the internal calibration system and using authentic plumbagin standards with known concentration. Linearity, specificity, accuracy, precision, quantification, and detection of limit parameters were determined for validation of the process. The obtained results gave  $R^2 > 0.9919$  linearity acceptance, an accuracy of 98.84%, and, related to precision criteria, a variance coefficient of 1.34%. In addition, the detection limit was 20.66 ng/mL, and the quantification limit was 68.87 ng/mL. The specificity of the GC-MS method was validated by injecting 1 µL of pure plumbagin and methanol (100%) as control, individually. Five different concentrations (200–1000 ng) of plumbagin were analyzed in triplicate, and the respective calibration curve was generated. The linearity between peak areas and concentration of plumbagin was calculated using linear regression analysis (Graphic S1–S3). The detection limit and the quantification limit were calculated based on the standard deviation of the intercept ( $y$ ) and slope of the calibration curve obtained from linear regression (Graphic S4) (see Supplementary Information).

### Statistical Process Control

Experimental design and statistical analysis of the results were performed using the software Design Expert 7.0.0 (version 2005, Stat-Ease, In. 2021, MN, USA). The amount of plumbagin obtained in milligram per gram of initial root was selected as the dependent response variable. The mathematical relationship between the response function ( $Y$ ) and the independent variables ( $X$ ) can be approximated by a 2FI model equation.



## Supporting Information

The following supporting information can be seen (Table S1). Quantification of plumbagin in EtOAc extracts was done by GC-MS. Figure S1. Endemic and native distribution of *Plumbago pulchella* Boiss in Mexico. Endemic: Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Quintana Roo, Sonora, Sinaloa, Tabasco, Yucatán. Native: Aguascalientes, Colima, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, México, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas. Figure S2. (a) TIC chromatogram, (b) mass spectrum of plumbagin, and (c) TIC chromatogram of 8-hydroxyquinone (8-HQ). Figure S3. TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 1 g of root, with 2.5 h extraction. Figure S4. TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 1 g of root with 5 h extraction. Figure S5. TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 50 g of root, and 2.5 h extraction. Figure S6. TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 50 g of root, and 5 h extraction. Figure S7. TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 50 g of root, and 7.5 h extraction. Figure S8. TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 50 g of root, and 7.5 h extraction. Equation S1. Surface model of the behavior of extraction by MH. Equation S2. Surface model of the behavior of extraction by NIR. Equation S3. Surface model of the behavior of extraction by TB-MCh. Equation S4. Surface model of the behavior of extraction by US. Equation S5. Surface model of the behavior of extraction by US-MH. Equation S6. Surface model of the behavior of extraction by MW. Validation of Gas Chromatography studies by ICH Q2 R2 2022 guidelines.

## Authors' Note

This article is dedicated to the memory of Professor Pedro Joseph-Nathan.

## Acknowledgments

The authors acknowledge Secretaría del Medio Ambiente del Estado de México for authorization to collect the plant specimen. Also, to Draucín Jiménéz Celi (FES-Cuautitlán UNAM) and Anabel Ruiz Flores (UBIPRO, FES-Iztacala UNAM) for technical assistance.

## Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA-PAPIIT (grant IN211023) and by Programa Interno de Cátedras de Investigación Convocatoria 2022, FESC-UNAM (grant CI2218).

## ORCID iD

Joel Martínez  <https://orcid.org/0000-0002-6683-6738>

## Supplemental Material

Supplemental material for this article is available online.

## References

- Martínez J, Cortés JF, Miranda R. Green chemistry metrics, a review. *Processes*. 2022;10(7):1274.
- Sustainable Development Goals. United Nations Programme. 2023. Accessed February 03, 2023. <https://www.undp.org/sustainable-development-goals#responsible-consumption-and-production>
- Anastas P, Warner J. *Green chemistry: Theory and practice*. Oxford University; 1998.
- Clark JH, Macquarrie DJ. *Handbook of green chemistry and technology*. Blackwell Science; John Wiley & Sons; 2002.
- Naciones Unidas. Resolución Aprobada por la Asamblea General el 25 de Septiembre de 2015. Septuagésimo Periodo de Sesiones. Tema 5 y 116 del Programa. A/RES/70/1. Accessed February 03, 2023. [https://unctad.org/system/files/official-document/ares70d1\\_es.pdf](https://unctad.org/system/files/official-document/ares70d1_es.pdf)
- Roy A, Bharadvaja N. A review on multi-purpose medicinal plant *Plumbago zeylanica* and *in-vitro* production of plumbagin. In: *Scope of phytochemically unexplored medicinal plants*. 1st ed., Chapter 12, Enriched Publications Pvt. Ltd; 2017, pp. 129-139.
- Kapare HS, Metkar SR, Shirolkar SV. Anticancer potential of *Plumbago zeylanica* Linn. and its isolated constituent plumbagin: a review. *Int J Pharm Sci Res*. 2020;11(10):4859-4865.
- Subramaniya BR, Srinivasan G, Mohammed Sadullah SS, et al. Apoptosis inducing effect of plumbagin on colonic cancer cells depends on expression of COX-2. *PLoS One*. 2011;6(4):e18695.
- Li Y-L, Zhu X-M, Chen N-F, et al. Anticancer activity of ruthenium(II) plumbagin complexes with polypyridyl as ancillary ligands via inhibiting energy metabolism and GADD45A-mediated cell cycle arrest. *Eur J Med Chem*. 2022;236:114312.
- Liang X, Pan Q, Liao Y, et al. *In silico* analysis and experimental validation to exhibit anti-nasopharyngeal carcinoma effects of plumbagin, an anti-cancer compound. *J Sci Food Agric*. 2022;102(12):5460-5467.
- Wei Y, Lin Y, Chen W, Liu S, Jin L, Huang D. Computational and *in vitro* analysis of plumbagin's molecular mechanism for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Front Pharmacol*. 2021;12:594833.

12. Chan-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep.* 2001;18(6):674-688.
13. Durga R, Sridhar P, Polasa H. Conjugates of plumbagin and phenyl-2-amino-1-thioglucoside inhibits MshB a deacetylase involved in the biosynthesis of mycothiol. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(7):2501-2514.
14. Krishnaswamy M, Purushothaman KK. Plumbagin: a study of its anticancer, antifungal activities. *Indian J Exp Biol.* 1980;18(8):876-877.
15. Premakumari P, Rathinam K, Santhakumari G. Antifertility activity of plumbagin. *Indian J Med Res.* 1977;65(6):829-838.
16. Sharma I, Gusain D, Dixit VP. Hypolipidaemic and antiatherosclerotic effect of plumbagin in rabbits. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1991;3581(1):10-14.
17. Olangunju JA, Jobi AA, Oyedappo O. An investigation into biochemical basis of the observed hyperglycaemia in rats treated with ethanol extract of *P. zeylanica*. *Phytother Res.* 1999;13(4):346-348.
18. Tan M, Liu Y, Luo X, Chen Z, Liang H. Antioxidant activities of plumbagin and its Cu(II) complex. *Bioinorgan Chem Appl.* 2011;2011:1-5.
19. Bothiraja C, Joshi PP, Dama GY, Pawar AP. Rapid method for isolation of plumbagin, an alternative medicine from roots of *Plumbago zeylanica*. *Eur J Integr Med.* 2011;3(1):39-42.
20. De Paiva SR, Lima LA, Figueiredo MR, Auxiliadora M, Kaplan C. Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. *Anais Acad Brasil Ci.* 2004;76(3):499-504.
21. Muralidharan K, Jayanthi M, Surendran R, Balasubramanian M, Girija S. Effect of simple extraction, preparation methods on HPLC quantification of plumbagin in *in vivo* and *in vitro* plants of *Plumbago zeylanica* L. *Afr J Biotechnol.* 2018;17(33):1021-1030.
22. Toxics Release Inventory (TRI) Program. 2022. <https://www.epa.gov/toxics-release-inventory-tri-program/tri-listed-chemicals>
23. Villareal ML, Alonso D, Melesio G. Cytotoxic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Fitioterapia.* 1992;43(3):518-521.
24. Sakata O, Hoshino H, Tabata H, Yoshitani S, Yoshimi F. Skin care preparation and skin care composition. Patent JP2002020232A, Mitsui Chemicals Inc. Kose Corp.; 2002.
25. Navarrete D, Pons M, Cuvás J, Echevarria G. Is metal hyperaccumulation occurring in ultramafic vegetation of central and southern Mexico? *Ecol Res.* 2018;33(3):641-649.
26. Berendsohn W, Müller A, Jiménez Rosenberg R, Hernández D. *Plumbago pulchella* Boiss. 2023. eFloraMEX. Las plantas vasculares de México. [https://efloramex.ibunam.mx/cdm\\_dataportal/taxon/9775bf37-f5b4-4ae0-bb73-8ec4e956e203](https://efloramex.ibunam.mx/cdm_dataportal/taxon/9775bf37-f5b4-4ae0-bb73-8ec4e956e203), and references therein.
27. Escobedo-González R, Vázquez Cabañas A, Martínez González A, et al. Green approach to the extraction of perezzone from the roots of *Acoortia platyphilla* (A. Grey): a comparison of four activating modes and supercritical carbon dioxide. *Molecules.* 2019;24(17):3035.
28. Martínez J, Rosas J, Pérez J, Saavedra Z, Carranza V, Alonso P. Green approach to the extraction of major capsaicinoids from habanero pepper using near-infrared, microwave, ultrasound and Soxhlet methods, a comparative study. *Nat Prod Res.* 2019;33(3):447-452.
29. Gomez Pliego R, Ramirez-San Juan E, Miranda R, et al. Vasodilator effects of *bis*-dihydropyridines structurally related to nifedipine. *Med Chem.* 2006;2(5):527-534.
30. Martínez J, Romero-Vega S, Abeja-Cruz R, Álvarez-Toledano C, Miranda R. Green approach-multicomponent production of boron-containing Hantzsch and Biginelli esters. *Int J Mol Sci.* 2013;14(2):2903-2915.
31. Escobedo-González RG, Pérez Martínez H, Nicolás-Vázquez MI, et al. Green production of indolyquinones derivatives of perezzone, and related molecules, promising antineoplastic compounds. *J Chem.* 2016;2016:1-10.
32. Zarco Juarez M, Martínez JO, Noguez Cordova O, et al. A green approach to the production of hybrid diindolymethane-phenylboronic acids via a 3MCR: promising antineoplastic molecules. *J Chem.* 2013;2013:1-9.
33. Martínez J, Hernández Rodríguez M, Escobedo-González R, Nicolás-Vázquez MI, Saavedra-Leos Z, Miranda Ruvalcaba R. Computational characterization of perezzone, isoperezzone and their sulfur-derivatives: anti-inflammatory activity. *ChemistrySelect.* 2019;4(45):13333-13346.
34. Tezuka M, Takahashi C, Kuroyanagi M, Satake M, Yoshihira K. New naphthoquinones from diospyros. *Phytochemistry.* 1973;12(1):175-183.
35. Gammon DW, Steenkamp DJ, Mavumengwana V, et al. Conjugates of plumbagin and phenyl 2-amino-1-thioglucoside inhibit MshB a deacetylase involved in the biosynthesis of mycothiol. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(7):2501-2514.
36. Khan N, Krishna Rao D. The role of NMR in structural elucidation of small molecules and proteins. In: Krishna Rao D, ed. *Nuclear magnetic resonance (NMR) theory, applications and technology.* Chapter 1. Nova Publishers; 2014:1-26.
37. Li H-P, Yang B-Y, Su Y, et al. Sustainable and robust closed-loop enzymatic platform for continuous/semi-continuous synthesis of ursodeoxycholic acid. *ACS Sustainable Chem Eng.* 2022;10(50):16916-16923.
38. Montgomery DC. *Design and analysis of experiments.* 10th ed. Wiley; 2019.
39. Hayes BL. *Microwave synthesis. Chemistry at the speed of light.* CEM Publishing; 2002.
40. Martínez J, Miranda R. Infrared irradiation, an excellent, alternative green energy source. In: *Green chemistry applications.* Intech Open; 2019, pp. 35-55.
41. Escobedo R, Miranda R, Martínez J. Infrared irradiation: toward green chemistry, a review. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):453.
42. Nakayama K, Martin J-M. Tribochemical reactions at and the vicinity of a sliding contact. *Wear.* 2006;261(3-4):235-240.
43. Friederike Burmeister C, Kwade A. Process engineering with planetary ball mills. *Chem Soc Rev.* 2013;42(18):7660-7667.
44. Kaufmann B, Christen P, Veuthey J-L. Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides. *Phytochem Anal.* 2001;12(5):327-331.

45. Kratchanova M, Pavlova E, Panchev I. The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruits tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydr Polym.* 2004;56(2):181-185.
46. Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S. Microwave assisted extraction – an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacogn Rev.* 2007;1:7-18.
47. Morales LM, Martínez JO, Reyes-Sánchez LB, et al. ¿Qué tan verde es un experimento? *Educ Quim.* 2011;22(3):240-248.
48. Gałuzka A, Konieczka P, Migaszewski ZM, Namieśnik J. Analytical eco-scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends Anal Chem.* 2012;37:61-72.

## TRADUCCIÓN DEL ARTÍCULO

En seguida, se presenta la traducción del artículo original, procurando conservar la esencia de este, a su vez, en el Apéndice C se encuentra la información complementaria del artículo, entregada a la Editorial de la revista *Natural Product Communications*.



# Extracción de plumbagina: un estudio verde

Fernanda I. Calzada-González,<sup>1</sup> Joel Martínez,<sup>1</sup>  
Yolanda M. Vargas-Rodríguez,<sup>1</sup> Luis B. Hernández-Portilla,<sup>2</sup>  
M. Inés Nicolás-Vázquez,<sup>1</sup> René Miranda<sup>1</sup>

Natural Product Communications  
Volumen 18(7): 1-11  
© The Author(s) 2023  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/1934578X231191345  
journals.sagepub.com/home/npj



## Resumen

Se presentó un estudio verde para la extracción de plumbagina, una importante naftoquinona natural, de las raíces de *Plumbago pulchella* Boiss. En la primera etapa, se evaluaron comparativamente cuatro disolventes; acetona, *n*-hexano, acetato de etilo y metanol; incidiendo en el Principio #5, destacando sólo los disolventes verdes (acetato de etilo y acetona). En un segundo paso, considerando el Principio #6, se evaluaron varios métodos verdes de activación alternativos; dos electromagnéticos, microondas (MO) e infrarrojo cercano (IRC); además de enfoques mecánicos; ultrasonido (US) y triboquímica-mecanoquímica (TB-MQ). Estos métodos verdes fueron estudiados en comparación con la clásica mantilla de calentamiento (MC) y, finalmente, con maceración (M). MO y US-MC fueron los mejores métodos, AcOEt (verde) y *n*-hexano (no verde) mostraron rendimientos superiores (0.027 % y 0.025 %, respectivamente). Centrándonos en el Principio #11, el seguimiento y la cuantificación de las extracciones se realizaron mediante CG-EM empleando 8-hidroxiquinolina como referencia. Algunos otros principios involucrados (#1, #3, #7, #12) serán comentados en la discusión. Como complemento importante, se utilizó una técnica estadística basada en el análisis de varianza (ANOVA) y la metodología de superficie de respuesta para establecer el grado de dependencia de la cantidad de plumbagina extraída con los parámetros de tiempo y cantidad de raíz, además de un proceso de validación CG-EM, establecido en la norma ICH Q2 R2 2022. Finalmente, es conveniente resaltar que la planta objetivo es nativa de México, y de acuerdo con una profunda búsqueda bibliográfica, no se encuentra información química de *Plumbago pulchella* Boiss accesible.

## Palabras clave

*Plumbago pulchella* Boiss, quinona, plumbagina, extracción, enfoque verde

Recibido: 7 de abril, 2023; Aceptado: 13 de julio, 2023.

## Introducción

Hoy en día el paradigma de la química verde ha adquirido gran importancia; resaltando que está enfocado a nivel molecular, logrando la sostenibilidad.<sup>1,2</sup> En este sentido, está posicionada inequívocamente como una herramienta científica importante para prevenir la contaminación (o al menos minimizarla). La química verde está instituida por un protocolo, los *Doce Principios*,<sup>3</sup> siendo importante destacar que, junto con ello, los investigadores de la química verde diseñan, desarrollan y muchas veces innovan procesos para lograr bajo o nulo riesgo para el medio ambiente y, en consecuencia, para la salud humana. También es importante señalar que ninguna actividad química está completamente exenta de riesgos y residuos. Por lo tanto, se deben asumir los “*Doce Principios de la Química Verde*” y realizar una reflexión científica.<sup>4</sup> Además, es de destacar que la química verde actualmente se considera una excelente manera de contribuir al Desarrollo Sostenible.<sup>2,5</sup> En consecuencia, los químicos deben atender tanto a: la “Convocatoria de la Década de la UNESCO (2005-2014) para una Educación Sostenible (enseñar, investigar y difundir-divulgar),”

además de la Agenda 30-ONU (2015-2030), un protocolo relacionado con los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible.

La plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona) (Figura 1), es un metabolito natural del género *Plumbago*, que ha creado gran interés. Esta, exhibe muchas actividades farmacológicas valiosas<sup>6</sup>: anticancerígeno,<sup>7-11</sup> leishmanicida,<sup>12</sup> bactericida,<sup>13</sup> antifúngico,<sup>14</sup> antifertilidad,<sup>15</sup> hipolipidémico,<sup>16</sup> hiperglucémico,<sup>17</sup> y antioxidante,<sup>18</sup> entre otros. La principal especie comercial del género *Plumbago* es *Plumbago zeylanica*, que se cultiva mucho en el sur de la India. Sin embargo, es importante mencionar que el contenido de plumbagina en este género es bajo, *Plumbago*

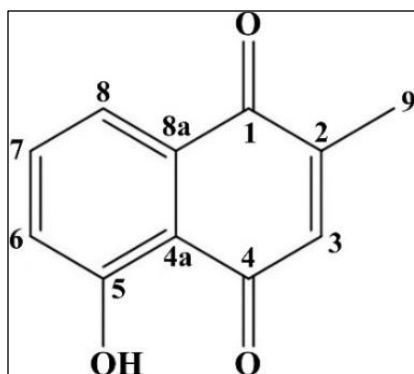
<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México

<sup>2</sup> Laboratorio Nacional en Salud, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México

### Autor de correspondencia:

René Miranda, Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, 54740, México.

Email: mirruv@yahoo.com.mx



**Figura 1.** Estructura de plumbagina.

*zeylanica* 0.25 a 1.34%, *Plumbago rosea* 0.57 a 1.0% y *Plumbago capensis* de 0.15 a 0.43%.<sup>6</sup>

Como una consecuencia de lo anterior, algunos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en mejorar la extracción de plumbagina, empleando varios métodos de extracción: maceración,<sup>19-21</sup> maceración en serie,<sup>21</sup> maceración dinámica,<sup>20</sup> mantilla de calentamiento<sup>20,21</sup> y ultrasonido<sup>20,21</sup>. Sin embargo, algunos de ellos tienen las siguientes desventajas: el uso de cloroformo<sup>20</sup> o su mezcla con diclorometano,<sup>19</sup> que se consideran disolventes tóxicos<sup>22</sup> y la exigencia de largos tiempos de extracción, incluso días, empleando como disolventes, *n*-hexano, metanol, agua, cloroformo o acetato de etilo.<sup>19-21</sup>

Después de una búsqueda exhaustiva en la literatura, existe información mínima relacionada con la química y extracción de *Plumbago pulchella* Boiss, sólo se encontraron tres estudios: actividad citotóxica,<sup>23</sup> formulación para el cuidado de la piel,<sup>24</sup> y la hiperacumulación que ocurre en la vegetación ultramáfica.<sup>25</sup> Es importante resaltar que esta especie es originaria de México. (Figura S1; Información complementaria).<sup>26</sup>

Como parte de nuestro programa de investigación, Química Verde, atendiendo a la “Convocatoria de la Década de la UNESCO (2005-2014) para una Educación Sostenible (enseñanza, investigación y difusión)” y la Agenda 30-ONU (2015-2030), hemos realizado interesantes estudios comparativos de aislamiento de productos naturales.<sup>27, 28</sup> Esto se suma a la realización de diversas estrategias sintéticas verdes para lograr la actividad farmacológica de muchas moléculas importantes.<sup>29-33</sup>

En relación con los comentarios anteriores, este trabajo se ofrece como un enfoque verde para la extracción de plumbagina de las raíces de *Plumbago pulchella* Boiss: evaluando principalmente disolventes verdes (Principio #5), acetato de etilo y acetona, estimando métodos verdes de activación alternativos (Principio #6), microondas (MO) e irradiaciones electromagnéticas de infrarrojo cercano (IRC), también enfoques mecánicos como ultrasonido (US) y triboquímica-mecanoquímica (TB-MQ), en comparación con el método clásico empleando mantilla de calentamiento (MC) y la maceración (M). Es importante mencionar que la cuantificación y el seguimiento (Principio #11) de las extracciones se determinó mediante CG-EM. Además, una técnica estadística (ANOVA) se

utilizó para establecer el grado de dependencia de la cantidad de plumbagina extraída con los parámetros tiempo y cantidad de raíz.

**Tabla 1.** Cuantificación de plumbagina por CG-EM (50g de raíz).

Tiempo de extracción (h)	2.5	5	7.5
Disolvente	Rendimiento de extracción (mg/50g)		
MeOH	0.69	0.70	0.72
Acetona	0.79	0.82	0.83
AcOEt	1.03	1.12	2.25
<i>n</i> -Hexano	1.61	1.78	2.26

Los datos proporcionados son la media de tres experimentos.

Adicionalmente, se llevó a cabo una validación del método analítico de CG-EM, empleado en el estudio, trabajando con la norma ICH Q2 R2 2022.

## Resultados y Discusión

Plumbagina/5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona se identificó a partir de sus características físicas, espectroscópicas y datos de espectrometría de masas, en comparación con la literatura<sup>34-36</sup>: identificación complementada con nueva información: HRMS-DART<sup>+</sup> (19.8 eV) *m/z* (%ar) [asignación]: 189(100%) [M+1]<sup>+</sup>, valor observado 189.05562 Da, valor exacto 189.05517 Da, error: 0.45 ppm, insaturaciones: 7.5, para C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>, molécula protonada [M+H]<sup>+</sup>.

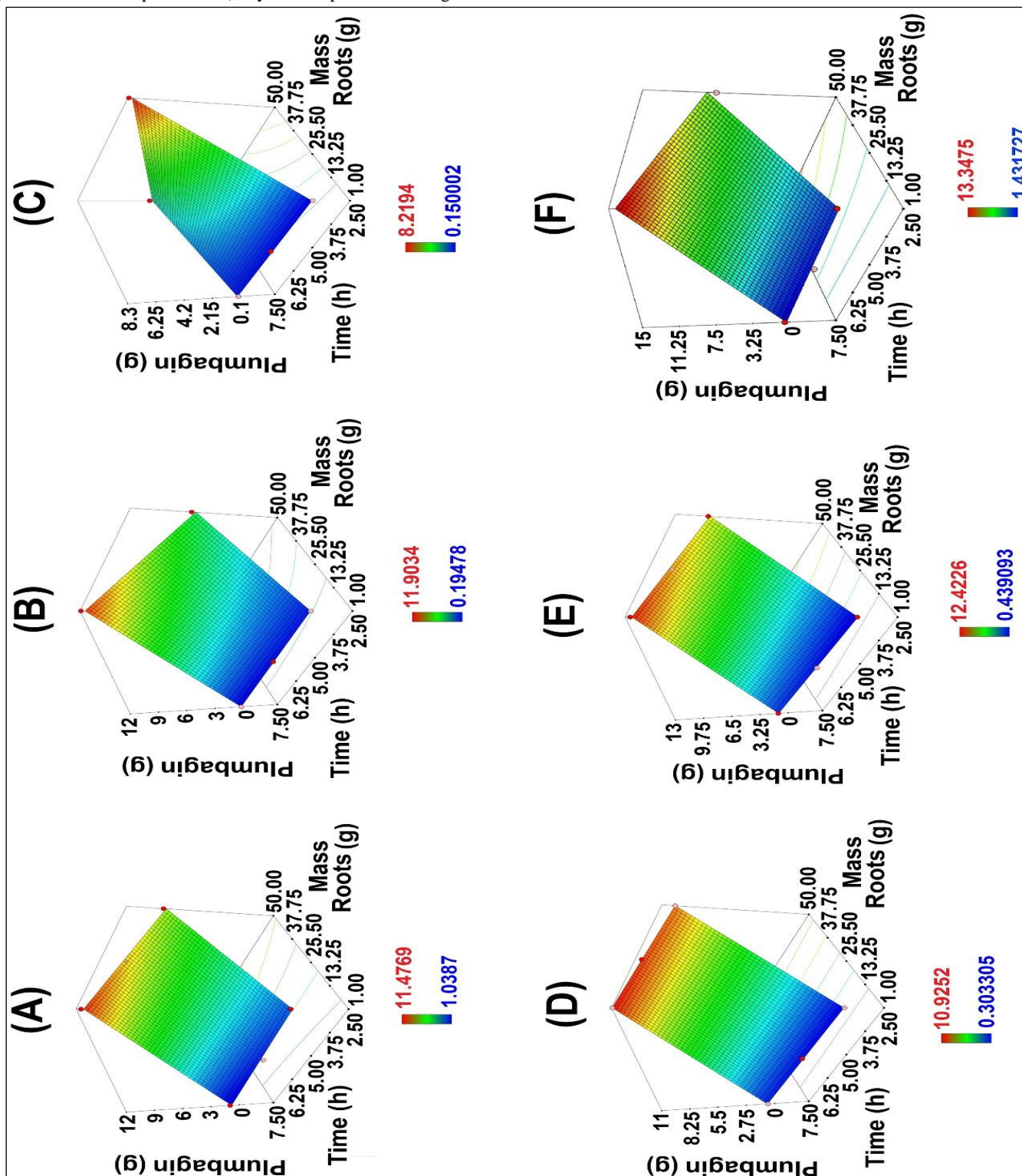
Para establecer condiciones primarias apropiadas, se consideraron los resultados de trabajos previamente reportados<sup>19-21</sup>: los disolventes utilizados fueron cloroformo,<sup>20</sup> diclorometano,<sup>19</sup> *n*-hexano, AcOEt, MeOH y agua,<sup>21</sup> además de mezclas cloroformo-MeOH y cloroformo-diclorometano<sup>19</sup>. Los métodos empleados para la extracción fueron Soxhlet (MC),<sup>20</sup> y extracción por maceración seriada (M),<sup>21</sup> los tiempos fueron 2.5, 5, y 7.5 h.<sup>19-21</sup>

En la primera etapa se evaluó el método MC considerando dos cantidades de raíz, 50 y 1 g, empleando cuatro disolventes: *n*-hexano, AcOEt, MeOH y acetona (cloroformo y diclorometano son incuestionablemente no verdes), durante tres tiempos de extracción: 2.5, 5 y 7.5 h, analizando los extractos por CG-EM (Tabla 1). Como puede verse, los disolventes *n*-hexano y AcOEt proporcionaron los mejores rendimientos de extracción (2.26 y 2.25 mg/g a las 7.5 h). Sin embargo, con el uso de acetona, considerada un disolvente verde, este rendimiento no se alcanzó. También es de destacar que *n*-hexano y MeOH recientemente se han considerado altamente tóxicos según la lista TRI<sup>22</sup>; alterando el protocolo de la química verde.<sup>37</sup> Por lo tanto, fueron descartados en este estudio.

En consecuencia, de acuerdo con la información obtenida anteriormente, el estudio verde se implementó utilizando únicamente AcOEt (el mejor disolvente verde) para la extracción de plumbagina, con 10 y 120 mL para 1 y 50 g de raíz, respectivamente, con bajos tiempos de extracción de 7.5, 5 y 2.5 h, utilizando para comparar los siguientes métodos de extracción: MC, US, TB-MQ, MO, US-MC, IRC y M, monitorizando la extracción por cuantificación de plumbagina mediante CG-EM.

Los datos obtenidos, en general, son la media de tres experimentos para todas las extracciones, se resumen en la Tabla S1 (Información complementaria), y la representación gráfica

correspondiente (que proporciona una mayor objetividad) se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Cuantificación de plumbagina empleando CG-EM para 50g de raíz. (A) MC, (B) IRC, (C) TB-MQ, (D) US, (E) US-MC, y (F) MO. Abreviaciones: MC, mantilla de calentamiento; IRC, infrarrojo cercano; TB-MQ, triboquímica-mecanoquímica; US, ultrasonido; MO, microondas.

**Tabla 2.** Niveles de variables consideradas para el diseño experimental.

Variable	Símbolo	Unidad	Codificado y niveles		
			bajo	medio	alto
Masa raíz	X1	g	1	-	50
Tiempo	X2	h	2.5	5	7.5

### Análisis estadístico ANOVA

Mediante la metodología de análisis de varianza y superficie de respuesta, se generó un diseño factorial experimental aleatorio, utilizando los datos de la Tabla 2.

Los resultados del análisis se evaluaron en función de los valores estadísticos de la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (GL), la SC media (SCM), el índice de variación de Fisher (valor F) y la probabilidad (valor P). Los resultados del análisis ANOVA se muestran en la Tabla 3, y la interacción entre las variables del proceso se ilustra mediante los gráficos de superficie de respuesta 3D (Figura 2). Los parámetros óptimos del proceso se calculan utilizando el modelo ajustado 2FI y se validan mediante experimentos.

Los valores de Prob > F fueron 0,0059, <0.0001, 0.0034, 0.0008, 0.0043 y 0.158 para las extracciones utilizando los métodos IRC, US, MC, US-MC, TB-MQ y MO, respectivamente. Estos resultados fueron inferiores a 0.050, lo que indica que este término del modelo es significativo.<sup>38</sup> Con respecto al tiempo, se encontró que los valores de Prob > F para los métodos de activación de US, US-MC y TB-MQ fueron 0.0187, 0.0311 y 0.0222, respectivamente, lo que indica que el tiempo también es significativo para estos métodos de extracción. Para los métodos de activación MO, IRC y MC, los valores de Prob > F fueron 0.2868, 0.0602 y 0.2232, respectivamente. Estos resultados fueron superiores a 0.05 y, por lo tanto, no fueron significativos para los métodos de activación MO, IRC y MC. Sin embargo, si los valores de Prob > F no son mayores que 0.100, pueden considerarse significativos. Por tanto, en todos esos casos, sólo IRC es significativa.

El análisis de la desviación estándar, R cuadrado ( $R^2$ ), R cuadrado ajustado (R cuadrado Aj), R cuadrado predicho (R cuadrado Pred) y la precisión adecuada (Precisión Ad) de los modelos concuerdan razonablemente (Tabla 4). La precisión adecuada mide la relación señal-ruido. Es deseable una proporción mayor que 4. Las proporciones de 18.31, 122.23, 21.85, 42.94, 23.63 y 10.30 para los métodos IRC, US, MC, US-MC, TB-MQ y MO, respectivamente, mostraron señales adecuadas. Estos resultados indican que este modelo se puede utilizar para navegar en el espacio de diseño (Figura 2).

Con base en el análisis ANOVA, las ecuaciones finales que representan el comportamiento del modelo para la extracción de plumbagina basado en los métodos de activación IRC, US, MC, US-MC, TB-MQ y MO esenciales las ecuaciones S1-S6 (Información complementaria).

Considerando la información, que concuerda con los datos mostrados en la Figura 2, la Tabla 5 muestra los mejores rendimientos, tanto en peso como en porcentaje, de plumbagina,

para los diferentes métodos empleados para la extracción de la molécula objetivo. Es conveniente señalar que para obtener una mayor objetividad se muestran los resultados en la Figura 3.

**Table 3.** ANOVA y superficie de respuesta del modelo 2FI sugerido para la extracción.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de SC	F	Prob > F
<b>MC</b>					
Modelo	104.35	3	34.78	103.89	0.0095
A-Masa raíz	98.38	1	98.38	293.82	0.0034
B-Tiempo	1.02	1	1.02	3.04	0.2232
AB	4.96	1	4.96	14.80	0.0614
Residuo	0.67	2	0.33		
Cor Total	105.02	5			
<b>IRC</b>					
Modelo	114.13	3	38.04	67.27	0.0147
A-Masa raíz	94.71	1	94.71	167.47	0.0059
B-Tiempo	8.55	1	8.55	15.12	0.0602
AB	10.87	1	10.87	19.23	0.0483
Residuo	1.13	2	0.57		
Cor Total	115.26	5			
<b>TB-MQ</b>					
Modelo	52.22	3	17.41	107.02	0.0093
A-Masa raíz	37.35	1	37.35	229.63	0.0043
B-Tiempo	7.09	1	7.09	43.60	0.0222
AB	7.78	1	7.78	47.84	0.0203
Residuo	0.33	2	0.16		
Cor Total	52.55	5			
<b>US</b>					
Modelo	145.11	3	48.37	4308.06	0.0002
A-Masa raíz	144.38	1	144.38	12859.12	<0.0001
B-Tiempo	0.58	1	0.58	52.04	0.0187
AB	0.15	1	0.15	13.02	0.0689
Residuo	0.022	2	0.011		
Cor Total	145.14	5			
<b>US-MC</b>					
Modelo	153.07	3	51.02	429.39	0.0023
A-Masa raíz	148.21	1	148.21	1247.22	0.0008
B-Tiempo	3.64	1	3.64	30.63	0.0311
AB	1.23	1	1.23	10.33	0.0847
Residuo	0.24	2	0.12		
Cor Total	153.31	5			
<b>MO</b>					
Modelo	186.28	3	62.09	22.62	0.0426
A-Masa raíz	169.78	1	61.86	61.68	0.158
B-Tiempo	5.68	1	5.68	2.07	0.2868
AB	10.82	1	10.82	3.94	0.1855
Residuo	5.49	2	2.74		
Cor Total	191.77	5			

### Resultados Principales

Los datos de la superficie de respuesta del modelo 2FI (Figura 2A-E) se resumen convenientemente en la Tabla 5 y la Figura 3A-B. Las condiciones óptimas para la extracción de plumbagina, empleando AcOEt, el mejor disolvente verde, y 50 g de raíz fueron: MC 7.5 h (11.48 mg/0.023%), IRC 7.5 h (11.90 mg/0.024%), TB-MQ 2.5 h (8.22 mg/0.016%), US 7.5 h (10.93 mg/0.022%), US-MC 7.5 h (12.42 mg/0.025%) y MO 7.5 h (13.35 mg/0.027%).

En este sentido, los enfoques verdes más convenientes corresponden al tiempo 7.5 h con US-MC (12.42 mg/0.025%), empleando AcOEt como disolvente. Sin embargo, se debe destacar el uso de MO (1300 Watts, 65 °C, 0.7799 bar) como método de activación para la extracción del compuesto objetivo debido a que en la primera evaluación de 50 g de raíz, tiempo 5 h y AcOEt como disolvente más verde, se lograron los mayores rendimientos (13.34 mg correspondientes al 0.027%).

**Tabla 4.** Análisis de datos de estadística descriptiva para el modelo 2FI.

Método de extracción	Desviación estándar	R-cuadrada	R cuadrada Aj	Pred R cuadrada	Precisión Ad
MC	0.58	0.9936	0.9841	0.9139	21.85
IRC	0.75	0.9902	0.9755	0.8675	18.31
TB-MQ	0.40	0.9938	0.9845	0.9164	23.63
US	0.11	0.9998	0.9996	0.9979	122.23
US-MC	0.34	0.9984	0.9961	0.9791	42.94
MO	1.66	0.9714	0.9284	0.6136	10.30

Aj, ajustado; Pred, predicho; Ad, adecuado.

Abreviaturas: MC, mantilla de calentamiento; IRC, infrarrojo cercano; TB-MQ, triboquímica-mecanoquímica; US, ultrasonido; MO, microondas.

**Table 5.** Resumen rendimientos de plumbagina.

Energía de activación	Masa de raíz (g)	Rendimiento (mg plumbagina)	Renidmineto (% plumbagina)
MC	50	11.48	0.023
IRC	50	11.90	0.024
TB-MQ	50	8.22	0.016
US	50	10.93	0.022
US-MC	50	12.42	0.025
MO	50	13.35	0.027

Abreviaturas: MC, mantilla de calentamiento; IRC, infrarrojo cercano; TB-MQ, triboquímica-mecanoquímica; US, ultrasonido; MO, microondas.

Complementariamente, es conveniente comentar que el método de maceración (M), con excelente incidencia en el Principio #6 de la Química Verde fue descartada ya que incluso después de más de 12 h (50 g/AcOEt), solo se detectaron trazas de plumbagina, evidenciado por el monitoreo de CG-EM, consulte la Información complementaria (Figuras S3-S8).

### Calentamiento Convencional con Mantilla: Condiciones Térmicas para la Extracción (Reflujo)

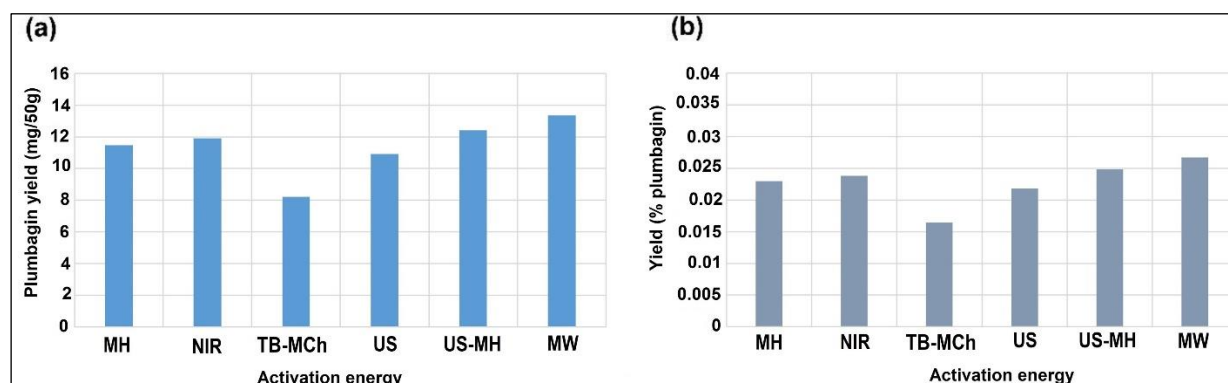
Es bien sabido que los procesos de MC se rigen por la temperatura y el reciclaje de disolventes<sup>28</sup>; en este trabajo, se obtuvo plumbagina con buen rendimiento (mg y %) (Figuras S3-S8). En este caso, el disolvente, AcOEt, tiene una constante dieléctrica conveniente de 6.0 D<sup>39</sup> para mejorar las interacciones disolventes/plumbagina, favoreciendo la solubilidad-selectividad del compuesto objetivo. De acuerdo con la superficie de respuesta del modelo 2FI que se muestra en la Figura 2(A), las condiciones óptimas para la extracción de plumbagina con MH fueron 7.5 h y 50 g de raíz.

### Extracción Asistida por IRC

El rendimiento de plumbagina obtenido por IRC fue muy cercano al del proceso MH, según los datos de CG-EM (Figuras S6-S8). Además, la irradiación infrarroja puede inducir diferentes modos de vibración en las moléculas proporcionando una alta eficiencia energética.<sup>40,41</sup> Además, la irradiación puede ser absorbida directamente por los tejidos de la raíz y el disolvente, en consecuencia, esta irradiación puede calentar directamente la mezcla de disolvente y la raíz de *Plumbago*, facilitando la extracción del metabolito de la matriz de la muestra.<sup>27,28</sup> Según la superficie de respuesta del modelo 2FI que se muestra en la Figura 2(B), las condiciones óptimas para la extracción de plumbagina con IRC fueron 7.5 h y 50 g de raíz.

### Extracción Asistida por TB-MQ

Una explicación apropiada relacionada con los bajos rendimientos de plumbagina para este procedimiento (Figuras S3-S8) es la baja producción de tribomicroplasma en las proximidades del área de contacto deslizante entre las raíces de *Plumbago* y el mortero,<sup>42</sup> además de las condiciones de poca fricción que provocan menor intensidad hacia la mezcla de extracto.<sup>43</sup> De acuerdo con la superficie de respuesta del modelo 2FI que se muestra en la Figura 2(C), las condiciones óptimas para la extracción de plumbagina con TB-MQ fueron 2.5 h y 50 g de raíz.



**Figura 3.** Rendimientos resumidos en porcentaje de plumbagina, utilizando 50 g de raíz: (A) rendimiento de plumbagina (mg) y (B) rendimiento (% de plumbagina).

### Extracción Asistida por US

La extracción asistida únicamente por ultrasonido mostró un rendimiento ligeramente inferior al de MC y IRC (Figuras S3-S5). En otras palabras, los efectos de la cavitación produjeron una buena interacción con la estructura celular en los tejidos y la alteración de las paredes celulares, liberando el metabolito de interés mediante una conveniente penetración del disolvente.<sup>27, 28</sup> De acuerdo con la superficie de respuesta del modelo 2FI que se muestra en la Figura 2(D), las condiciones óptimas para la extracción de plumbagina con US fueron de 7.5 h y 50 g de raíz.

### Extracción Asistida por Ultrasonido con Reflujo

Este procedimiento ofreció una mejor extracción de plumbagina, en comparación con los métodos informados anteriormente<sup>19-21</sup> (Figuras 3 y S3-S8); sin embargo, no fue para este estudio. En este punto, la sinergia entre el efecto de cavitación y el calentamiento directo mediante un proceso de reflujo típico aumentó el rendimiento mediante una mayor alteración de las paredes celulares de la raíz y las interacciones disolvente/soluto, facilitando la liberación de la molécula objetivo debido a una mejor transferencia de masa del metabolito de la matriz de la muestra.<sup>27, 28</sup> De acuerdo con la superficie de respuesta del modelo 2FI que se muestra en la Figura 2(E), las condiciones óptimas para la extracción de plumbagina con US-MC fueron 7.5 h y 50 g de raíz.

### Extracción Asistida por Microondas

Es conveniente resaltar que el método MO proporcionó el mejor rendimiento de extracción de 13.35 mg/50 g de raíz (Figuras 3 y S6-S8) y el mejor porcentaje de rendimiento (0.27%) de plumbagina (Tabla 5). Los hechos apropiados para explicar estos resultados son la concordancia entre el disolvente y la polaridad de plumbagina (constante dieléctrica conveniente)<sup>39</sup> requerida por el procedimiento MO para lograr interacciones adecuadas. Además, el MO genera altas presiones, favoreciendo una ruptura de la pared celular de las raíces, favoreciendo la interacción disolvente-plumbagina.<sup>28,44-46</sup> Según la superficie de respuesta del modelo 2FI que se muestra en la Figura 2(F), las condiciones óptimas para la extracción de plumbagina con MO fueron 5 h y 50 g de raíz.

### Extracción Convencional por Maceración

Este procedimiento proporcionó el valor de extracción más bajo y el tiempo de extracción más largo (días) en comparación con MC, US, US-MC, IRC, TB-MQ y MO. Esto probablemente se debió a una menor transferencia de masa del metabolito desde la matriz de la muestra y a unas interacciones deficientes entre el disolvente y soluto<sup>28</sup>; es necesario calor para obtener una buena extracción.

### Discusión sobre Química Verde

El protocolo de química verde se ofrece como un eco-estudio para la extracción de plumbagina de las raíces de *Plumbago pulchella* Boiss. En este sentido, la química verde no se diferencia de la química tradicional, sino que sólo tiene consideraciones especiales para la implementación de nuevos diseños para prevenir la contaminación.<sup>3</sup> Según Anastas y Warner,<sup>3</sup> el protocolo de la química verde se basa en *Doce Principios*. Sin embargo, en este estudio, los únicos principios discutidos son aquellos con evidente

incidencia por el Protocolo de Química Verde. (a) Relacionado con el *Principio #1* (es mejor prevenir los desechos que tratar o limpiar los desechos después de su formación).<sup>3</sup> Esto se muestra en los cromatogramas de CG-EM donde los picos distintos al de plumbagina se pueden deber a otros metabolitos (que no son de interés en este estudio). Por tanto, se evitó el empleo de metanol y se mejoró la selectividad con acetato de etilo, que disminuyó los residuos. (b) El acetato de etilo, un disolvente verde,<sup>22, 47</sup> fue la mejor opción, lo que provocó la incidencia del *Principio #5* (el uso de sustancias auxiliares [por ejemplo, disolventes, agentes de separación, etc.] debe ser innecesario siempre que sea posible e inocuo cuando sea usado).<sup>3</sup> (c) Una alta prevalencia del *Principio #6* (los requisitos energéticos deben reconocerse por sus impactos ambientales y económicos y deben minimizarse. Los métodos sintéticos deben realizarse a temperatura y presión ambiente),<sup>3</sup> disminuir el consumo energético y los impactos económicos; este hecho está inequívocamente implicado desde los métodos verdes de activación alternativos, irradiaciones electromagnéticas de microondas y IRC, también enfoques mecánicos como el ultrasonido y la triboquímica-mecanoquímica, en comparación con los métodos clásicos; mantilla de calentamiento (MC) y maceración (M). (d) *Principio #7* (la materia prima debe ser renovable en lugar de agotarse siempre que sea técnica y económicamente viable)<sup>3</sup> también está involucrado. Las raíces de *Plumbago pulchella* Boiss son renovables y la especie es perenne. (e) Incidencia significativa del *Principio #11* (es necesario desarrollar las metodologías analíticas para permitir el monitoreo y control en tiempo real del proceso antes de la formación de sustancias peligrosas)<sup>3</sup> está resaltado y mostrado ya que el monitoreo de las extracciones fue realizado por CG-EM.<sup>48</sup> (f) Finalmente, *Principio #3* (cuando sea posible, las metodologías sintéticas deben diseñarse para usar y generar sustancias que posean poca o ninguna toxicidad para la salud humana y el medio ambiente)<sup>3</sup> y #12 (las sustancias y la forma de una sustancia utilizada en un proceso químico deben elegirse de manera que se minimice el potencial de accidentes químicos, incluidos emanaciones, explosiones e incendios)<sup>3</sup> están implicados, ya que el AcOEt ha sido categorizado como un disolvente verde debido a su baja toxicidad, explosividad, inflamabilidad y buena degradabilidad.<sup>47</sup>

### Conclusiones

Se realizó un estudio verde para la extracción de plumbagina, una importante naftoquinona natural, a partir de las raíces de *Plumbago pulchella* Boiss. De acuerdo con una profunda búsqueda bibliográfica, se trata del primer aporte químico para la planta objetivo; además, es conveniente resaltar que el ejemplar evaluado es endémico de México.

El acetato de etilo, en general, fue el mejor disolvente, dando los mejores rendimientos (en peso y %) con irradiación de MO; además el procedimiento US-MC también generó buenos resultados.

La evaluación de la extracción de plumbagina fue validada mediante la aplicación de un profundo análisis estadístico.

Finalmente, de manera inequívoca se ofrece un enfoque verde ya que se ha realizado una evaluación métrica. En este sentido, los resultados obtenidos están en excelente concordancia con el



Protocolo de la Química Verde, que actualmente se considera una excelente manera de contribuir al Desarrollo Sostenible; además, los resultados cumplieron tanto con la “Convocatoria de la Década de la UNESCO (2005-2014) para una Educación Sostenible (enseñar, investigar y difundir-divulgar)” como con la Agenda 30- ONU (2015-2030).

## Aprobación ética

La aprobación ética no es aplicable a este artículo.

## Declaración de Derechos Humanos y Animales

Este artículo no contiene ningún estudio con sujetos humanos o animales.

## Declaración de Consentimiento Informado

No hay sujetos humanos en este artículo y el consentimiento informal no es aplicable.

## Material y Métodos

### General

Plumbagina, 8-hidroxiquinolina ( $\geq 99\%$ , 8-HQ) y *n*-hexano de grado HPLC se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemistry (St. Louis, MO, EE. UU.). El *n*-hexano, acetato de etilo, acetona y metanol fueron de grado técnico y se utilizaron tal como se recibieron de Materiales y Abastos Especializados SA de CV (Zapopan, Jalisco, México). Las extracciones de plumbagina se realizaron a partir de las raíces de *Plumbago pulchella* Boiss. La identificación y presencia de la molécula objetivo se controlaron mediante CG-ES (Figuras S2), además de la comparación con cromatografía en capa fina (CCF, o TLC, por sus siglas en inglés; thin-layer chromatography), utilizando *n*-hexano/acetato de etilo 85:15 como eluyente, empleando gel de sílice 60-F<sub>254</sub> en láminas de aluminio recubiertas y visualización con lámpara UV de 254 nm.

La extracción asistida por microondas de 50 g de raíz se logró utilizando un reactor Multiwave Pro Solv 60 Hz (Anton Paar, México). Sin embargo, para 1 g de material, la extracción asistida por microondas se realizó utilizando un sistema de síntesis CEM Focused Microwave™ (CEM Corporation, Matthews, NC, EE. UU.). Para las extracciones de irradiación IRC, se utilizó un dispositivo Flavor Wave disponible comercialmente (modelo AX-767MH, 1350 W/110 V/120 V-60 Hz–220 V/240 V-60 Hz) (fabricado en China). La extracción asistida por ultrasonido se realizó utilizando un baño ultrasónico Branson 1510 (80 W, 40 kHz) (Gaithersburg, MD, EE. UU.). Los experimentos de extracción asistida por mecanoquímica se realizaron utilizando un dispositivo IntelliMixer modelo RM-2M (ELMI Ltd, Letonia) para muestras de 1 g y se utilizó un mortero (rocas volcánicas) para muestras de 50 g. En los experimentos IRC y US, las temperaturas se determinaron utilizando un termómetro infrarrojo (Infrared + Type K Thermometer, Extech Instruments, Sigma-Aldrich 2509388-1, St. Louis, MO, EE. UU.), con el láser dirigido hacia el centro de la mezcla de extracción. Se llevó a cabo y ocupó el equipo de CG-EM (ver Información complementaria) utilizando un cromatograma de gases 6850 G2630A/G3170A en línea con un espectrómetro JMS

5975C (Agilent Technologies, CA, EE. UU.). La CG se realizó utilizando una columna de fenilmetilsilicio al 5% (30 m x 0,25  $\mu$ m, 0,25  $\mu$ m) Agilent 19091s-433e. La velocidad lineal del gas portador de helio fue de 0.9 mL/min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 250 y 300 °C, respectivamente, y se mantuvieron durante 6 minutos con un modo dividido de 1:50. Se empleó 8-hidroxiquinolina (8-HQ) como referencia interna para cuantificar la plumbagina. En relación con la caracterización física y espectroscópica de la plumbagina, el punto de fusión se determinó utilizando un aparato de Fisher Johns y no está corregido. El EIMS (70 eV) se determinó utilizando un espectrómetro de masas JEOL JMS-700 MStation (JEOL, Peabody, MA, EE. UU.). El HRMS-DART<sup>+</sup> cuyos datos se obtuvieron utilizando un espectrómetro de masas JEOL AccuTOF (Análisis directo en tiempo real) (JEOL, Peabody, MA, EE. UU.). Las mediciones se realizaron utilizando un experimento DART+ con polietilenglicol 400 como referencia interna a resoluciones de 6000 y helio triplete como gas portador a 350 °C.

### Material Vegetal

Las raíces de *Plumbago pulchella* Boiss fueron recolectadas en enero de 2022 en el noreste de la Sierra de Guadalupe, Ecatepec de Morelos, México, en las coordenadas: oeste 19.5917678, norte -99.0597134, altura 7767.98 pies. El ejemplar fue identificado por autoridades del Parque Ecológico Ehécatl, el jefe de zona Luis Hernández Ramírez y la bióloga Montserrat Ramírez Hernández.

### Extracción Típica por Maceración

Se realizaron experimentos independientes utilizando 0.5, 1, 5, 10, 30 y 50 g de raíz seca y molida de *Plumbago pulchella* Boiss. Estas muestras se mezclaron con 10, 15, 30, 60, 90 y 120 mL de *n*-hexano, acetato de etilo, acetona y metanol, y se maceraron durante 2.5, 5, 7.5 y 12 h a temperatura ambiente.<sup>21</sup> Cada experimento fue monitoreado sistemáticamente por CCF (*n*-hexano/acetato de etilo 85:15; en sílice) empleando una muestra comercial auténtica de plumbagina; transcurrido este tiempo, los extractos se filtraron y secaron al vacío.

### Extracción Utilizando Condiciones Térmicas Típicas de Mantilla de Calentamiento (Reflujo)

Se realizaron experimentos independientes con 1 g y 50 g de raíz seca y molida de *Plumbago pulchella* Boiss con 10 y 120 mL de acetato de etilo, *n*-hexano, MeOH y acetona, respectivamente, y se sometieron a reflujo durante 2.5, 5 y 7.5 h a 63-65°C.<sup>21</sup> Cada extracto fue monitoreado sistemáticamente por CCF (*n*-hexano/acetato de etilo 85:15; sobre gel de sílice) empleando una muestra comercial auténtica de plumbagina; transcurrido este tiempo, los extractos se filtraron y secaron al vacío.

### Extracción Típica Utilizando Fuentes Activadoras no Convencionales

Irradiación IRC: se realizaron experimentos independientes utilizando 1 y 50 g de raíz de *Plumbago pulchella* Boiss, con 10 y 120 mL de AcOEt, respectivamente, durante 2.5, 5 y 7.5 h entre 63 °C y 65 °C. En esta extracción se realizaron varias irradiaciones de 10 min cada una, con una pausa de 5 min entre cada irradiación, para

evitar la ebullición del disolvente. Cada extracto fue monitoreado sistemáticamente por CCF (*n*-hexano/acetato de etilo 85:15; sobre gel de sílice) empleando una muestra comercial auténtica de plumbagina; transcurrido este tiempo, los extractos se filtraron y secaron al vacío.

Irradiación por microondas: se realizaron experimentos independientes. Se irradiaron 1 y 50 g de raíz de *Plumbago pulchella* Boiss, junto con 10 y 120 mL de AcOEt, respectivamente, con 300 W de potencia durante 2.5, 5 y 7.5 h, o 1300 W de potencia a 60 °C durante 2.5, 5 y 7.5 h. Cada extracto se controló mediante CCF (*n*-hexano/acetato de etilo 85:15; sobre gel de sílice) empleando una muestra auténtica de plumbagina; transcurrido este tiempo, los extractos se filtraron y secaron al vacío.

Triboquímica-mecanoquímica: se molieron 1 y 50 g de raíz de *Plumbago pulchella* Boiss, junto con 10 y 120 mL de AcOEt, respectivamente, en una mezcladora intelli con el modo de agitación y balanceo UU por 80 r/min, utilizando cinco bolas de acero de 3/16 pulgadas de diámetro, y molidas mecánicamente con mortero, respectivamente, durante 2.5, 5 y 7.5 h a temperatura ambiente. Por lo tanto, es importante tener en cuenta qué debido a la evaporación del disolvente en el segundo método, fue necesario agregar 100 mL adicionales de disolvente. El extracto de cada experimento fue monitoreado sistemáticamente por CCF (*n*-hexano/acetato de etilo 85:15; en sílice) empleando una muestra comercial auténtica de plumbagina; transcurrido este tiempo, los extractos se filtraron y secaron al vacío.

Ultrasonido: se realizaron experimentos independientes utilizando 1 y 50 g de raíz de *Plumbago pulchella* Boiss con 10 y 120 mL de AcOEt, respectivamente. Estos se sonicaron durante 2.5, 5 y 7.5 h a temperatura ambiente. Todos los extractos fueron monitoreados sistemáticamente por CCF (*n*-hexano/acetato de etilo 85:15; sobre gel de sílice) empleando una muestra auténtica de plumbagina; transcurrido este tiempo, los extractos se filtraron y secaron al vacío.

Extracción por ultrasonido bajo reflujo: se realizaron experimentos independientes utilizando 1 y 50 g de raíz de *Plumbago pulchella* Boiss con 10 y 120 mL de AcOEt, respectivamente. Estos se sonicaron durante 2.5, 5 y 7.5 h entre 63°C y 65°C. El extracto de cada experimento se controló sistemáticamente mediante CCF (*n*-hexano/acetato de etilo 85:15; sobre gel de sílice) empleando una muestra auténtica de plumbagina; transcurrido este tiempo, los extractos se filtraron y secaron al vacío.

### Cuantificación de Plumbagina

**Determinaciones por CG-EM.** La cuantificación de plumbagina en el extracto se realizó mediante CG-EM utilizando 8-HQ como estándar interno. La solución de 8-HQ se preparó disolviendo 2 mg de 8-HQ en 0.5 ml de *n*-hexano grado HPLC. Luego, se agregaron 2.8 ml de *n*-hexano grado HPLC a cada extracto. El análisis de la muestra se preparó mezclando 20 µL del extracto con 20 µL de 8-HQ y disolviendo la mezcla en *n*-hexano grado HPLC. Posteriormente, se inyectaron 2 µL de la mezcla en el equipo CG-EM. La cuantificación se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Plumbagina} \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \text{mg de 8} \\ - \text{HQ en } 2 \mu\text{L} \\ \times \frac{\text{área total de pico de plumbagina}}{\text{área total de pico de 8 - HQ}} \times \frac{40 \mu\text{L}}{2 \mu\text{L}} \\ \times \frac{2.8 \text{ mL}}{0.02 \text{ mL}}$$

**Proceso de validación de CG-EM.** El proceso de validación CG-EM se llevó a cabo según la norma ICH Q2 R2 2022. La idoneidad del sistema se estableció verificando el funcionamiento del sistema de calibración interno y utilizando estándares auténticos de plumbagina con concentración conocida. Para la validación del proceso se determinó la linealidad, especificidad, exactitud, precisión, cuantificación y detección de parámetros límite. Los resultados proporcionaron R<sup>2</sup> > 0.9919 aceptación de linealidad, una precisión del 98.84% y, en relación con los criterios de precisión, un coeficiente de varianza del 1.34%. Además, el límite de detección fue de 20.66 ng/mL y el límite de cuantificación fue de 68.87 ng/mL. La especificidad del método CG-EM se validó inyectando 1 µL de plumbagina pura y metanol (100%) como control, individualmente. Se analizaron cinco concentraciones diferentes (200-1000 ng) de plumbagina por triplicado y se generó la curva de calibración respectiva. La linealidad entre las áreas de los picos y la concentración de plumbagina se calculó mediante un análisis de regresión lineal (Gráfico S1-S3). El límite de detección y el límite de cuantificación se calcularon con base en la desviación estándar de la intersección (y) y la pendiente de la curva de calibración obtenida de la regresión lineal (Gráfico S4) (ver Información complementaria).

### Control del Proceso Estadístico

El diseño experimental y el análisis estadístico de los resultados se realizaron utilizando el software Design Expert 7.0.0 (versión 2005, Stat-Ease, In. 2021, MN, EE. UU.). Se seleccionó como variable de respuesta dependiente la cantidad de plumbagina obtenida en miligramos por gramo de raíz inicial. La relación matemática entre la función de respuesta (Y) y las variables independientes (X) se puede aproximar mediante una ecuación del modelo 2FI.

### Información complementaria

Se puede ver la siguiente información complementaria (Tabla S1). La cuantificación de plumbagina en extractos de AcOEt se realizó mediante GC-MS. Figura S1. Distribución endémica y nativa de *Plumbago pulchella* Boiss en México. Endémica: Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Quintana Roo, Sonora, Sinaloa, Tabasco, Yucatán. Nativo: Aguascalientes, Colima, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, México, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas. Figura S2. (a) Cromatograma TIC, (b) espectro de masas de plumbagina y (c) cromatograma TIC de 8-hidroxiquinona (8-HQ). Figura S3. Cromatograma TIC del extracto de plumbagina con (a) mantilla de calentamiento, (b) irradiación de infrarrojo cercano, (c) triboquímica-mecanoquímica, (d) ultrasonido, (e) mantilla de calentamiento con ultrasonido y (f) microondas, usando 1 g de raíz,



con extracción de 2.5 h. Figura S4. Cromatograma TIC del extracto de plumbagina con (a) mantilla de calentamiento, (b) irradiación de infrarrojo cercano, (c) triboquímica-mecanoquímica, (d) ultrasonido, (e) calentamiento de manto por ultrasonido y (f) microondas, usando 1 g de raíz con extracción de 5 h. Figura S5. Cromatograma TIC del extracto de plumbagina con (a) mantilla de calentamiento, (b) irradiación de infrarrojo cercano, (c) triboquímica-mecanoquímica, (d) ultrasonido, (e) mantilla de calentamiento con ultrasonido y (f) microondas, usando 1 g de raíz y 7.5 h de extracción. Figura S6. Cromatograma TIC del extracto de plumbagina con (a) mantilla de calentamiento, (b) irradiación de infrarrojo cercano, (c) triboquímica-mecanoquímica, (d) ultrasonido, (e) mantilla de calentamiento con ultrasonido y (f) microondas, utilizando 50 g de raíz y 2.5 h de extracción. Figura S7. Cromatograma TIC del extracto de plumbagina con (a) mantilla de calentamiento, (b) irradiación de infrarrojo cercano, (c) triboquímica-mecanoquímica, (d) ultrasonido, (e) mantilla de calentamiento con ultrasonido y (f) microondas, utilizando 50 g de raíz y 5 h de extracción. Figura S8. Cromatograma TIC del extracto de plumbagina con (a) mantilla de calentamiento, (b) irradiación de infrarrojo cercano, (c) triboquímica-mecanoquímica, (d) ultrasonido, (e) mantilla de calentamiento con ultrasonido y (f) microondas, utilizando 50 g de raíz y 7.5 h de extracción. Ecuación S1. Modelo superficial del comportamiento de extracción por MC. Ecuación S2. Modelo superficial del comportamiento de extracción por IRC. Ecuación S3. Modelo de superficie del comportamiento de extracción por TB-MQ. Ecuación S4. Modelo de superficie del comportamiento de la extracción por US. Ecuación S5. Modelo superficial del comportamiento de extracción por US-MC. Ecuación S6. Modelo superficial del comportamiento de la extracción por MO. Validación de estudios de cromatografía de gases según las directrices de la norma ICH Q2 R2 2022.

#### Nota del autor

Este artículo está dedicado a la memoria del profesor Pedro Joseph-Nathan.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Secretaría del Medio Ambiente del Estado de México la autorización para recolectar el ejemplar de planta. También a Draucín Jimenez Celi (FES-Cuautitlán UNAM) y Anabel Ruiz Flores (UBIPRO, FES-Iztacala UNAM) por su asistencia técnica.


#### Declaración de intereses en conflicto

El(los) autor(es) declararon que no existen posibles conflictos de intereses con respecto a la investigación, autoría y/o publicación de este artículo.

#### Fondos

El autor(es) reveló haber recibido el siguiente apoyo financiero para la investigación, autoría y/o publicación de este artículo. Este trabajo fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA-PAPIIT (proyecto IN211023) y por el Programa Interno de Cátedras de Investigación Convocatoria 2022, FESC-UNAM (beca CI2218).

#### Identificación ORCID

Joel Martínez  <https://orcid.org/0000-0002-6683-6738>

#### Referencias

- Martínez J, Cortés JF, Miranda R. Green Chemistry metrics, a review. *Processes*. 2022;10:1274.
- Sustainable Development Goals. United Nations Programme. 2023. Available online: <https://www.undp.org/sustainabledevelopment-goals#responsible-consumption-and-production> (accessed on 03 February 2023)
- Anastas P, Warner J. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University: Oxford, NY, USA, 1998.
- Clark JH, Macquarrie DJ. *Handbook of Green Chemistry and Technology*; The Blackwell Science: Hoboken, NJ, USA; John Wiley & Sons: Oxford, NY, USA, 2002.
- Naciones Unidas. Resolución Aprobada por la Asamblea General el 25 de Septiembre de 2015. Septuagésimo Periodo de Sesiones. Tema 5 y 116 del Programa. A/RES/70/1. Available online: [https://unctad.org/system/files/official-document/ares70d1\\_es.pdf](https://unctad.org/system/files/official-document/ares70d1_es.pdf) (accessed on 03 February 2023).
- Roy A, Bharadvaja N. A review on multi-purpose medicinal plant *Plumbago zeylanica* and *in-vitro* production of plumbagin. *Scope of phytochemically unexplored medicinal plants*. 1<sup>st</sup> Ed., Chapter 12, Enriched Publications Pvt. Ltd: New Delhi, India, 2017.
- Kapare HS, Metkar SR, Shirolkar SV. Anticancer potential of *Plumbago zeylanica* Linn. and its isolated constituent plumbagin: a review. *Int J Pharm Sci Res*. 2020;11:4859-4865.
- Subramaniya BR, Srinivasan G, Mohammed Sadullah SS, Davis N, Reddi Subhadara LB, Halagowder D, Sivasitambaram ND. Apoptosis inducing effect of plumbagin on colonic cancer cells depends on expression of COX-2. *Plos One*. 2011;6(4):e18695.
- Li Y-L, Zhu X-M, Chen N-F, Chen S-T, Yang Y, Liang H, Chen Z-F. Anticancer activity of ruthenium(II) plumbagin complexes with polypyridyl as ancillary ligands via inhibiting energy metabolism and GADD45A-mediated cell cycle arrest. *Eur J Med Chem*. 2022;236:114312.
- Liang X, Pan Q, Liao Y, Nie L, Yang L, Liu F, Su M. *In silico* analysis and experimental validation to exhibit anti-nasopharyngeal carcinoma effects of plumbagin, an anti-cancer compound. *J Sci Food Agric*. 2022;102(12):5460-5467.
- Wei Y, Lin Y, Chen W, Liu S, Jin L, Huang D. Computational and *in vitro* analysis of plumbagin's molecular mechanism for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Front Pharmacol*. 2021;12:594833.
- Chan-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep*. 2001;18:674-688.
- Durga R, Sridhar P, Polasa H. Conjugates of plumbagin and phenyl-2-amino-1-thioglucoside inhibits MshB a deacetylase involved in the biosynthesis of mycothiol. *Bioorg Med Chem*. 2010;18:2501-2514.
- Krishnaswamy M, Purushothaman KK. Plumbagin: a study of its anticancer, antifungal activities. *Indian J Exp Biol*. 1980;18(8):876-877.

15. Premakumari P, Rathinam K, Santhakumari G. Antifertility activity of plumbagin. *Indian J Med Res.* 1977;65(6):829-838.
16. Sharma I, Gussain D, Dixit VP. Hypolipidaemic and antiatherosclerotic effect of plumbagin in rabbits. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1991;35(81):10-14.
17. Olangunju JA, Jobi AA, Oyedappo O. An investigation into biochemical basis of the observed hyperglycaemia in rats treated with ethanol extract of *P. zeylanica*. *Phytother Res.* 1999;13(4):346-348.
18. Tan M, Liu Y, Luo X, Chen Z, Liang H. Antioxidant activities of plumbagin and its Cu(II) complex. *Bioinorgan Chem Appl.* 2011;2011:1-5.
19. Bothiraja C, Joshi PP, Dama GY, Pawar AP. Rapid method for isolation of plumbagin, an alternative medicine from roots of *Plumbago zeylanica*. *Eur J Integr Med.* 2011;3(1):39-42.
20. De Paiva SR, Lima LA, Figueiredo MR, Auxiliadora M, Kaplan C. Plumbagin quantification in roots *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. *Anais Acad Brasil Ci.* 2004;76(3):499-504.
21. Muralidharan K, Jayanthi M, Surendran R, Balasubramanian M, Giriya S. Effect of simple extraction, preparation methods on HPLC quantification of plumbagin in *in vivo* and *in vitro* plants of *Plumbago zeylanica* L. *Afr J Biotechnol.* 2018;17(33):1021-1030.
22. Toxics Release Inventory (TRI) Program. 2022. Available online: <https://www.epa.gov/toxics-release-inventory-tri-program/tri-listed-chemicals>.
23. Villareal ML, Alonso D, Melesio G. Cytotoxic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Fitoterapia.* 1992;43:518-521.
24. Sakata O, Hoshino H, Tabata H, Yoshitani S, Yoshimi F. Skin care preparation and skin care composition. Patent JP2002020232A, Mitsui Chemicals Inc. Kose Corp., 2002.
25. Navarrete D, Pons M, Cuvas J, Echevarria G. Is metal hyperaccumulation occurring in ultramafic vegetation of central and southern Mexico? *Ecol Res.* 2018;33:641-649.
26. Berendsohn W, Müller A, Jiménez Rosenberg R, Hernández D. *Plumbago pulchella* Boiss. 2023. eFloraMEX. Las plantas vasculares de México. Available online: [https://efloramex.ib.unam.mx/cdm\\_dataportal/taxon/9775bf37-f5b4-4ae0-bb73-8ee4e956e203](https://efloramex.ib.unam.mx/cdm_dataportal/taxon/9775bf37-f5b4-4ae0-bb73-8ee4e956e203), and references therein.
27. Escobedo-González R, Vázquez Cabañas A, Martínez González A, Mendoza Sánchez P, Saavedra-Leos Z, Cruz-Olivares J, Nava Serrano J, Martínez J, Miranda Ruvalcaba R. Green approach extraction of perezone from the roots of *Acourtia platyphilla* (A. Grey): a comparison of four activating modes and supercritical carbon dioxide. *Molecules.* 2019;24:3035.
28. Martínez J, Rosas J, Pérez J, Saavedra Z, Carranza V, Alonso P. Green approach to the extraction of major capsaicinoids from habanero pepper using near-infrared, microwave, ultrasound and Soxhlet methods, a comparative study. *Nat Prod Res.* 2019;33(3):447-452.
29. Gomez Pliego R, Ramirez-San Juan E, Miranda R, Villalobos-Molina R, Delgado F, Osnaya R, Trujillo Ferrara J. Vasodilator effects of *bis*-dihydropyridines structurally related to nifedipine. *Med Chem.* 2006;2:527-534.
30. Martínez J, Romero-Vega S, Abeja-Cruz R, Álvarez-Toledano C, Miranda R. Green approach-multicomponent production of boron-containing Hantzsch and Biginelli esters. *Int J Mol Sci.* 2013;14:2903-2915.
31. Escobedo-González RG, Pérez Martínez H, Nicolás-Vázquez MI, Martínez J, Gómez G, Serrano JN, Carranza Téllez V, Vargas-Requena CL, Miranda Ruvalcaba R. Green production of indolylquinones derivatives of perezone, and related molecules, promising antineoplastic compounds. *J Chem.* 2016;2016:1-10.
32. Zarco Juarez M, Martínez JO, Noguez Cordova O, Nicolás Vazquez MI, Ramírez-Apan T, Pérez Flores J, Miranda Ruvalcaba R, Arroyo Razo GA. A green approach to the production of hybrid diindolylmethane-phenylboronic acids via a 3MCR: promising antineoplastic molecules. *J Chem.* 2013;2013:1-9.
33. Martínez J, Hernández Rodríguez M, Escobedo-González R, Nicolás-Vázquez MI, Saavedra-Leos Z, Miranda Ruvalcaba R. Computational characterization of perezone, isoperezone and their sulfur-derivatives: anti-inflammatory activity. *ChemistrySelect.* 2019;4:13333-13346.
34. Tezuka M, Takahashi C, Kuroyanagi M, Satake M, Yoshihira K. New naphthoquinones from *Diospyros*. *Phytochemistry.* 1973;12:175-183.
35. Gammon DW, Steenkamp DJ, Mavumengwana V, Marakalala MJ, Mudzunga TT, Hunter R, Munyololo M. Conjugates of plumbagin and phenyl 2-amino-1-thioglucoside inhibit MshB a decetylase involved in the biosynthesis of mycothiol. *Bioorg Med Chem.* 2010;18:2501-2514.
36. Khan N, Krishna Rao D. The role of NMR in structural elucidation of small molecules and proteins. In *Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Theory, Applications and Technology*, Krishna Rao D. (Ed). Chapter 1, Nova Publishers:NY, USA, pp. 1-26. 2014
37. Li H-P, Yang B-Y, Su Y, You Z-N, Yin W-T, Li C-X, Zheng G-W, Qu J, Xu J-H. Sustainable and robust closed-loop enzymatic platform for continuous/semi-continuous synthesis of ursodeoxycholic acid. *ACS Sustainable Chem Eng.* 2022;10:16916-16923.
38. Montgomery DC. Design and analysis of experiments. 10<sup>th</sup> Ed. Wiley: New York, USA, 2019.
39. Hayes BL. In *Microwave Synthesis. Chemistry at the speed of light*. CEM Publishing: NC, USA, 2002.
40. Martínez J, Miranda R. Infrared irradiation, an excellent, alternative green energy source. In *Green Chemistry Applications*. IntechOpen: London, UK, 2019.
41. Escobedo R, Miranda R, Martínez J. Infrared irradiation: toward green chemistry, a review. *Int J Mol Sci.* 2016;17:453.
42. Nakayama K, Martin J-M. Tribochemical reactions at and the vicinity of a sliding contact. *Wear.* 2006;261:235-240.
43. Friederike Burmeister C, Kwade A. Process engineering with planetary ball mills. *Chem Soc Rev.* 2013;42:7660-7667.
44. Kaufmann B, Christen P, Veuthey J-L. Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides. *Phytochem Anal.* 2001;12:327-331.

45. Kratchanova M, Pavlova E, Panchev I. The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruits tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydr Polym.* 2004;56:181-185.
46. Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S. Microwave assisted extraction – an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacogn Rev.* 2007;1:7-18.
47. Morales LM, Martínez JO, Reyes-Sánchez LB, Martín O, Arroyo GA, Obaya A, Miranda R. ¿Qué tan verde es un experimento? *Educ Quim.* 2011;22:240-248.
48. Gałuzka A, Konieczka P, Migaszewski ZM, Namieśnik J. Analytical eco-scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends Anal Chem.* 2012;37:61-72.

## CONCLUSIONES

La participación en la actividad de investigación se llevó a cabo de manera satisfactoria, dado que el estudio presenta alta incidencia en el Protocolo de la Química Verde para la extracción de plumbagina, una importante naftoquinona natural de la raíz de *Plumbago pulchella* Boiss, resaltando el hecho de que, este trabajo implica la primera contribución química para esta planta. En cuanto a los resultados, el AcOEt, reflejó ser el mejor disolvente, dado que es verde, ofrece los mejores rendimientos siendo la extracción con MO el modo de activación más recomendado. La evaluación de la extracción de la plumbagina fue validada mediante el análisis estadístico y la norma ICH Q2 R2 2022 para la determinación con CG-EM. Finalmente, es obligado de resaltar que el estudio implica un innegable acercamiento verde como lo demuestra el hecho haber aplicado convenientemente una métrica verde; es decir, los resultados obtenidos muestran una gran concordancia con el Protocolo de la Química Verde, que actualmente, es considerada como un excelente camino para contribuir al Desarrollo Sostenible; además, con este estudio se cumplieron tanto con la “Convocatoria de la Década de la *UNESCO* (2005-2014) para una Educación Sostenible (enseñar, investigar y difundir-divulgar)” así como con la Agenda 30- *ONU* (2015-2030).

## APÉNDICES

### Apéndice A.



**Figura A1.** Fotografía del profesor Pedro Joseph Nathan<sup>1</sup>.

Pedro Joseph Nathan, Investigador Emérito del Departamento de Química del CINVESTAV-IPN<sup>1</sup>, nacido en 1941, inició su carrera científica desde los 22 años, hasta su deceso el 5 de septiembre de 2022. Durante su formación académica, obtuvo los títulos de Químico (en 1963) e Ingeniero Químico (en 1964), y dos años después obtuvo el grado de Doctor en Ciencias Químicas en la Escuela Nacional de Ciencias Químicas (ENCQ), hoy Facultad de Química de la UNAM<sup>2</sup>.

Su trayectoria como investigador inició con el estudio de la química de productos naturales<sup>2</sup> y el análisis estructural de moléculas provenientes de cuerpos vegetales. En 1966, ingreso como parte del cuerpo de investigadores del Departamento de Química del Cinvestav, en el que profundizó en el estudio sobre la química de productos naturales, la aplicación de la RMN en la elucidación de estructuras orgánicas complejas y la formación de recursos humanos<sup>1</sup>.

En 1996 fue parte del Sistema Nacional de Investigadores, nivel III e Investigador Emérito del mismo<sup>1,3</sup>; además, fue miembro de las academias: Mexicana de Ciencias, Nacional de Ciencias Farmacéuticas de México, de Artes y Ciencias de Puerto Rico, Nacional de Farmacia y Bioquímica de Argentina, Peruana de Farmacia, y Colombiana de Ciencias Exactas, entre otras.

Acreedor de múltiples distinciones y premios otorgados en diversas instituciones<sup>1-3</sup>, como; Premio Nacional de Ciencias Farmacéuticas “Doctor Leopoldo Río de la Loza” otorgado por la Asociación Farmacéutica Mexicana en 1975; Premio de Ciencias otorgado por la Academia de la Investigación Científica en 1978; Premio Nacional de Química y Ciencias Farmacéuticas, otorgado por el Gobierno de México en 1980; Premio Nacional de Química “Andrés Manuel del Río” otorgado por la Sociedad Química de México en 1986; Premio “Martín de la Cruz” otorgado por el Consejo de Salubridad General en 1989; Premio Científico “Luis Elizondo” otorgado por el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores

de Monterrey en 1991; Premio Nacional de Ciencias y Artes en el área de Ciencias Físico-Matemáticas y Naturales por la Secretaría de Educación Pública en 1991; Doctor honoris causa por la Universidad Nacional de Tucumán en Argentina en 1995; Profesor Emérito por el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) desde 1996; Premio “Arturo Rosenblueth” otorgado por el Cinvestav en 1998; Investigador Nacional Emérito, desde 2001 e Investigador Nacional de Excelencia, desde 2003, por el Sistema Nacional de Investigadores del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Premio “Dr. Mario Molina” otorgado por la Unión Química del Colegio Nacional de Ingenieros Químicos y Químicos, el Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos y la Sociedad Química de México en 1999; Premio “Ing. Ernesto Ríos del Castillo” otorgado por el Colegio Nacional de Ingenieros Químicos y de Química en 2003; Doctor honoris causa por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en 2011; Doctor honoris causa por la Universidad de Magallanes de Chile en 2011.

Entre sus publicaciones, se le atribuyen más de 400 artículos científicos y varios libros acerca de RMN, colaboró en cinco patentes y formó parte del consejo editorial de varias revistas científicas internacionales relacionadas con su campo de estudio<sup>2</sup>.



Apéndice B.

CONAHCYT

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

UASLP  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

SOCIÉTAD QUÍMICA DE MÉXICO, A.C.

Sociedad Química de México, A. C.  
otorga la presente

**MENCIÓN HONORÍFICA**  
del  
**CONCURSO NACIONAL DE CARTELES ESTUDIANTILES (CNCE)**  
a  
**Fernanda Itzel Calzada González**

con el trabajo

**Estudio de la extracción verde de la plumbagina**  
presentado en el marco de las actividades académicas del  
**Congreso Internacional de la Sociedad Química de México 2023**  
*"La Química de México para el Mundo"*  
CISQM2023

2 - 6 de octubre de 2023  
San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

**Dr. David Quintanar Guerrero**  
Presidente Nacional Electo  
Sociedad Química de México, A.C.

**Dr. Alma Gabriela Palestino Escobedo**  
Directora  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

**Dr. Denisse Ateña de Loera Carrera**  
Presidente del Comité Organizador Local CISQM 2023  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

**Dr. Alfonso Ramón García Márquez**  
Coordinador del CISQM2023  
Tesorero, Comité Ejecutivo Nacional  
Sociedad Química de México, A.C.

Figura B1. Constancia de mención honorífica.

## Apéndice C.

Durante el estudio se obtuvo información que fue incluida en el artículo a modo de resumen. A continuación, se presenta la distribución endémica y nativa de *Plumbago pulchella* Boiss en México, además de múltiples cromatogramas de los métodos utilizados para la extracción de plumbagina a diferentes tiempos y cantidades de raíz, estos valores se agruparon en tablas donde se comparó la cuantificación de plumbagina, y con esta información, se realizaron modelos de superficie del comportamiento de plumbagina en los diferentes métodos de extracción aplicados. Asimismo, se incluye la validación del estudio de cromatografía de gases según la norma ICH Q2 R2 2022.

El contenido se distribuye de la siguiente manera:

**Table S1.** Quantification of plumbagin in EtOAc extracts by GC/MS.\*

**Figure S1.** Endemic and native distribution of *Plumbago pulchella* Boiss. in Mexico. Endemic: Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Quintana Roo, Sonora, Sinaloa, Tabasco, Yucatán. Native: Aguascalientes, Colima, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, México, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas.

**Figure S2.** (a) TIC chromatogram, (b) mass spectrum of pure plumbagin, and (c) TIC of pure 8-hydroxyquinone (8-HQ).

**Figure S3.** TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 1 g of root, and 2.5 h extraction.

**Figure S4.** TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 1 g of root, and 5 h extraction.

**Figure S5.** TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 1 g of root, and 7.5 h extraction.

**Figure S6.** TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 50 g of root, and 2.5 h extraction.

**Figure S7.** TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 50 g of root, and 5 h extraction.



**Figure S8.** TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 50 g of root, and 7.5 h extraction.

**Equation S1.** Surface model of the behavior of extraction by MH.

**Equation S2.** Surface model of the behavior of extraction by NIR.

**Equation S3.** Surface model of the behavior of extraction by TB-MCh.

**Equation S4.** Surface model of the behavior of extraction by US.

**Equation S5.** Surface model of the behavior of extraction by US-MH.

**Equation S6.** Surface model of the behavior of extraction by MW.

**Validation of Gas Chromatography studies by ICH Q2 R2 2022 guidelines.**

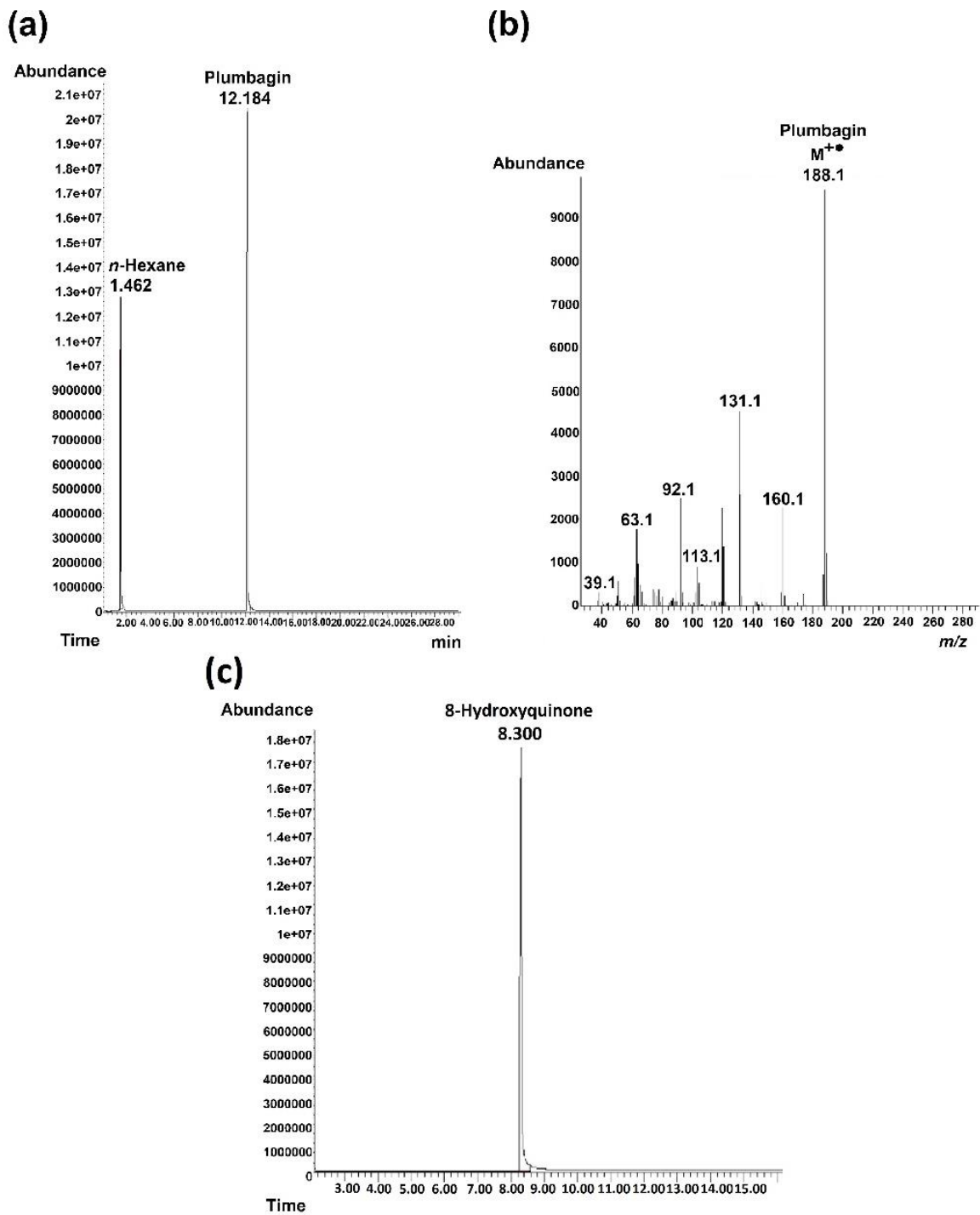
**Table S1.** Quantification of plumbagin in EtOAc extracts by GC-MS.\*

GC-MS					
	Time (h)/roots quantity (g)	Retention time (min)	Plumbagin total area	8-HQ <sup>♥</sup> total area	Plumbagin yield (mg/g)
MH	2.5/1	12.0810	10119453	55271262	1.038703
	5/1	12.0810	75054477	818826009	1.129265
	7.5/1	12.0770	9055031	107401246	2.255633
US	2.5/1	12.0766	4654455	171872606	0.303305
	5/1	12.0720	8752640	145552738	0.673499
	7.5/1	12.0720	11551995	188797845	0.685296
US-MH	2.5/1	12.0809	3538342	198556396	0.439093
	5/1	12.0937	2760490	101112412	0.672702
	7.5/1	12.0720	8903782	161015165	1.238670
NIR	2.5/1	12.0770	6968403	137431414	0.567891
	5/1	12.0730	7278139	170486034	0.478134
	7.5/1	12.0809	2826790	162542378	0.194780
TB-MCh	2.5/1	12.0852	2600232	194147589	0.150002
	5/1	12.0770	4830302	130730606	0.413823
	7.5/1	12.0811	2802503	113571769	0.276372
MW	2.5/1	12.0770	8411133	131595906	1.431727
	5/1	12.0766	7669450	177587028	0.483694
	7.5/1	12.0720	7864004	167113495	0.527048
GC-MS					
	Time (h)/roots quantity (g)	Retention time (min)	Plumbagin total area	8-HQ <sup>♥</sup> total area	Plumbagin yield (mg/50 g)
MH	2.5/50	12.2052	138532502	188268502	8.241230
	5/50	12.2052	138880524	172809251	9.001034
	7.5/50	12.2390	139896108	136520474	11.476934
US	2.5/50	12.1624	100411737	115009228	9.778445
	5/50	12.2179	170653643	183931618	10.391475
	7.5/50	12.1624	139257694	142760405	10.925201
US-MH	2.5/50	12.2523	126217040	150277703	9.406790
	5/50	12.1880	137383740	148793035	10.341196
	7.5/50	12.2052	172643954	155653405	12.422551
NIR	2.5/50	12.1066	31656613	62404289	5.681566
	5/50	12.1580	84882667	126866862	7.493571
	7.5/50	12.1753	109353269	102891616	11.903366
TB-MCh	2.5/50	12.1750	97850913	133334529	8.219403
	5/50	12.1410	56873132	132044906	4.823958
	7.5/50	12.1237	42526617	172152159	2.766727
MW	2.5/50	12.1409	77296617	112803114	7.674630
	5/50	12.1794	129526229	108768739	13.337415
	7.5/50	12.1923	129920374	109017069	13.347526

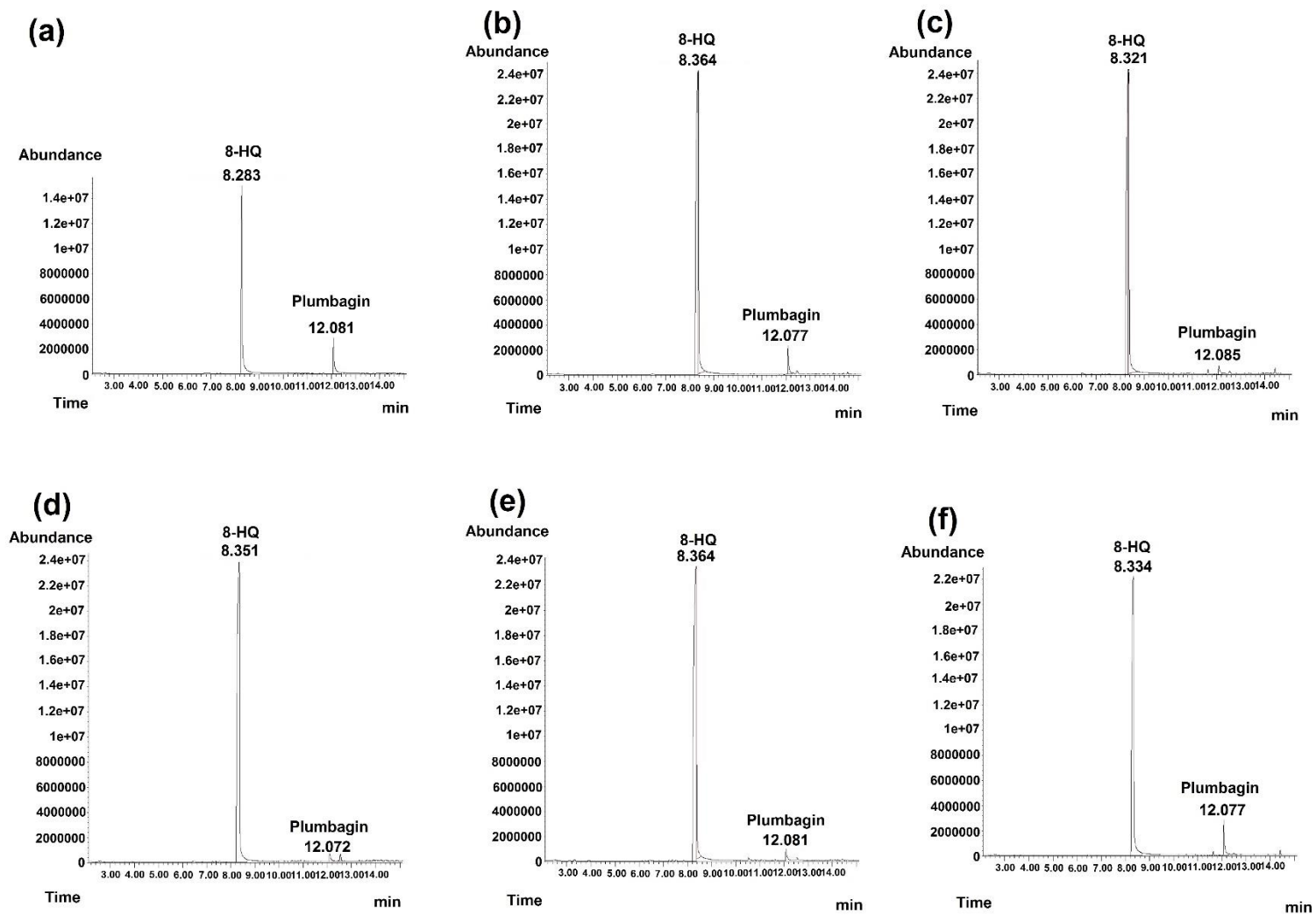
\*= three independent experiments were conducted, and the mean value is shown ♥= 8-hydroxyquinoline (8-HQ) as internal standard, MH= mantle heating, US= ultrasound, US-MH= ultrasound with mantle heating, NIR= near-infrared irradiation, TB-MCh= tribochemistry-mechanochemistry, MW= microwave.



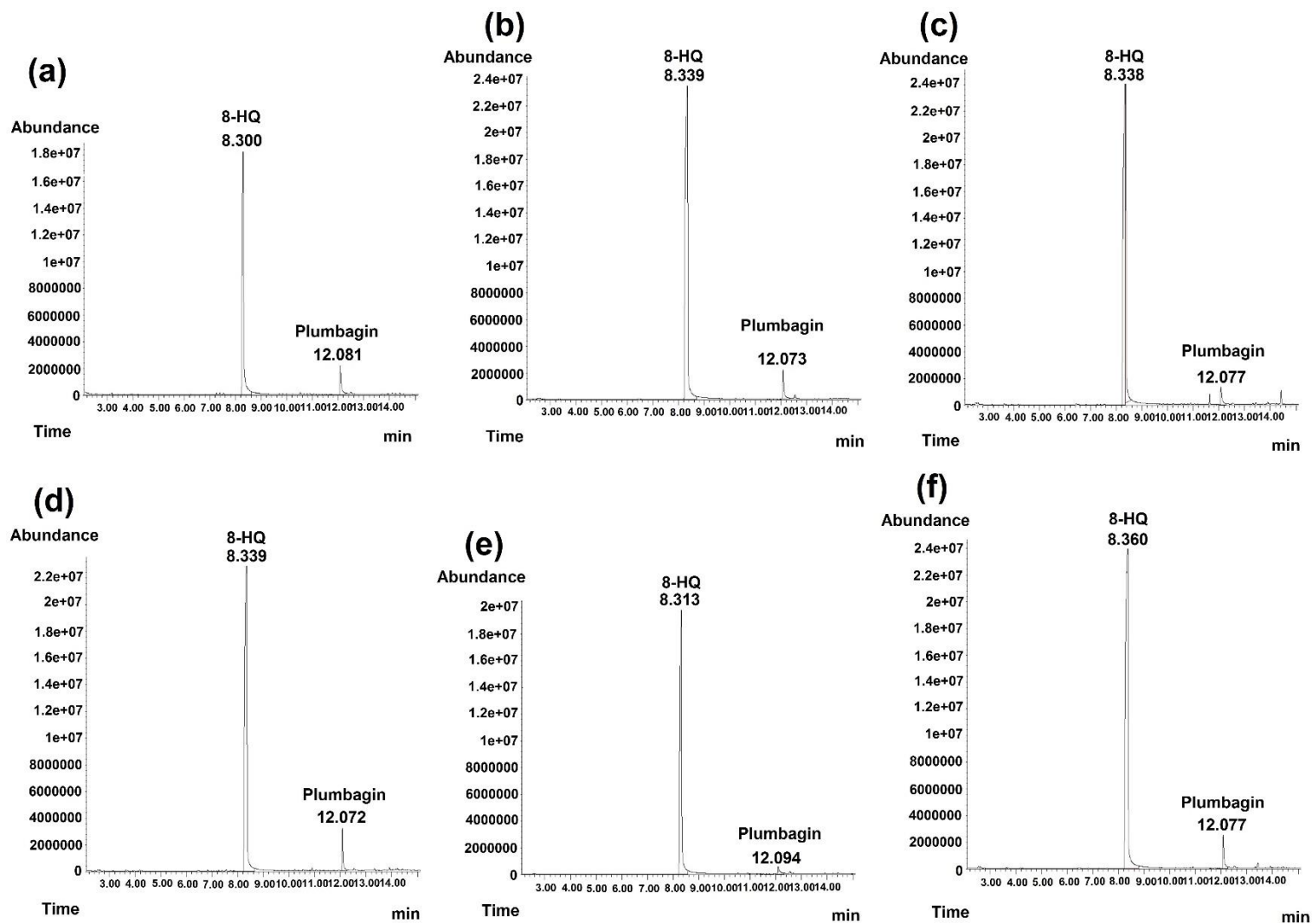
**Figure S1.** Endemic (green light) and native (green dark) distribution of *Plumbago pulchella* in Mexico. Endemic: Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Quintana Roo, Sonora, Sinaloa, Tabasco, Yucatán. Native: Aguascalientes, Colima, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, México, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas.



**Figure S2.** (a) TIC chromatogram, (b) mass spectrum of pure plumbagin, and (c) TIC of pure 8-hydroxyquinone (8-HQ).

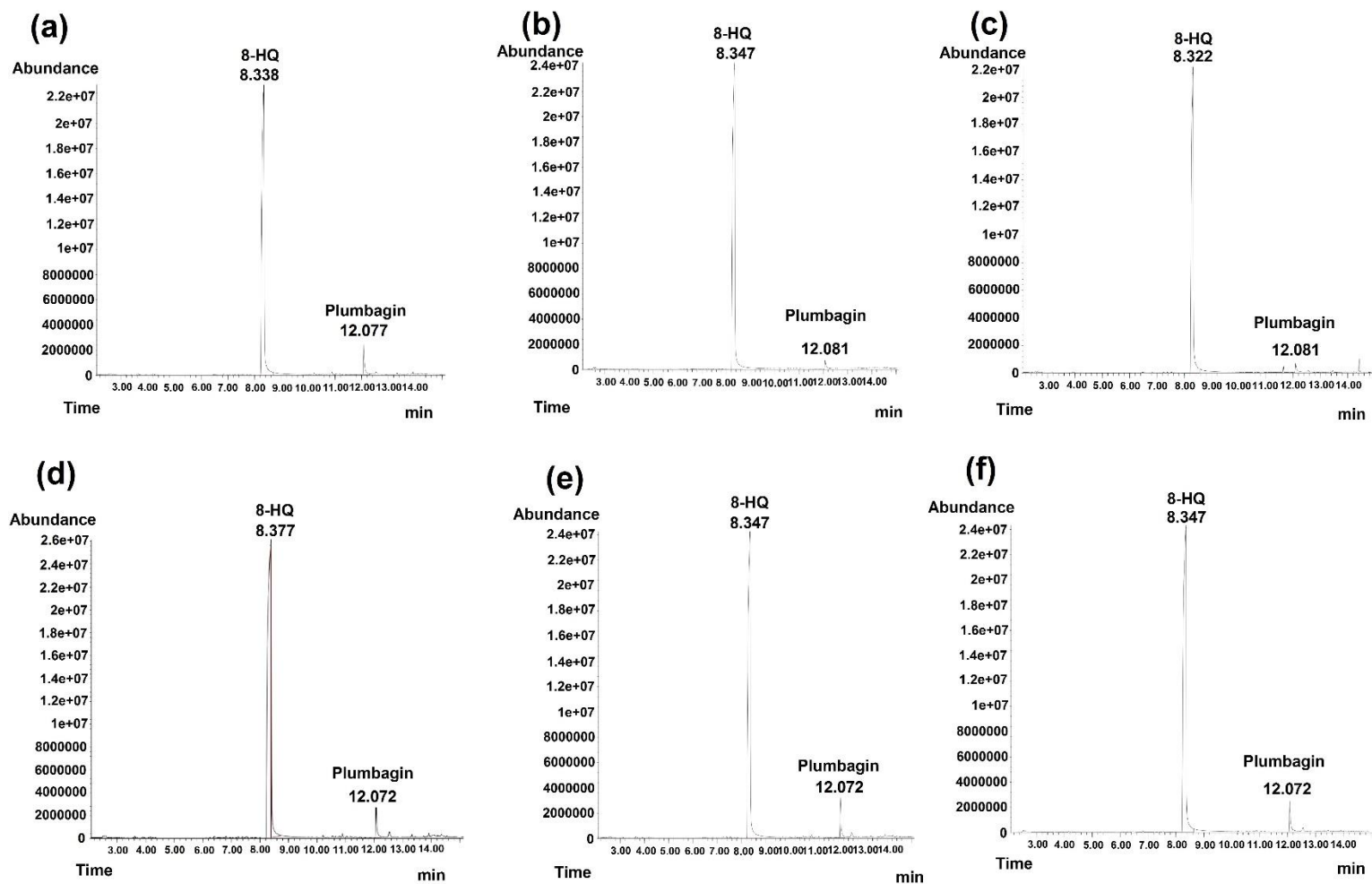


**Figure S3.** TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 1 g of root and 2.5 h extraction.

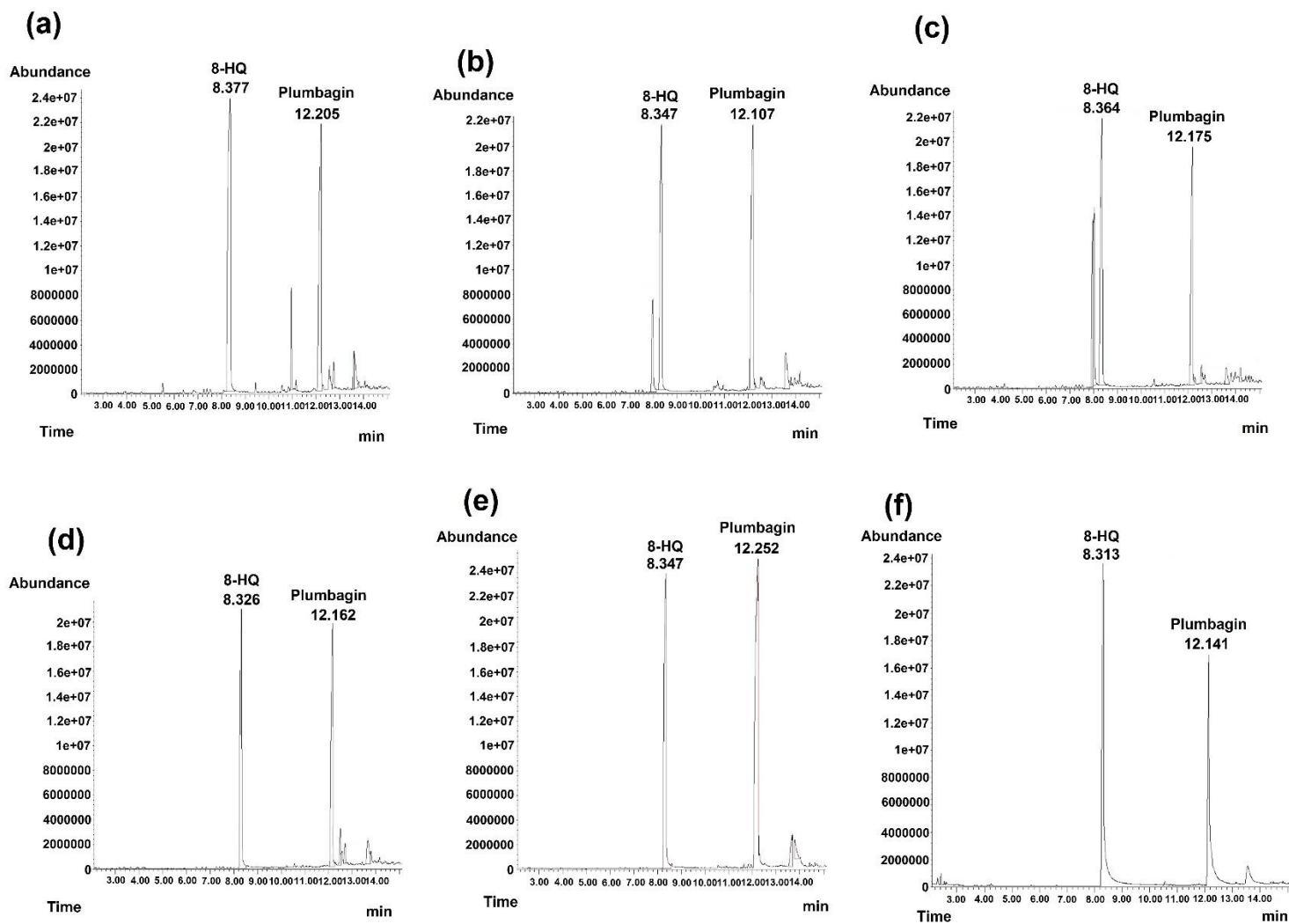


**Figure S4.** TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 1 g of root and 5 h extraction.

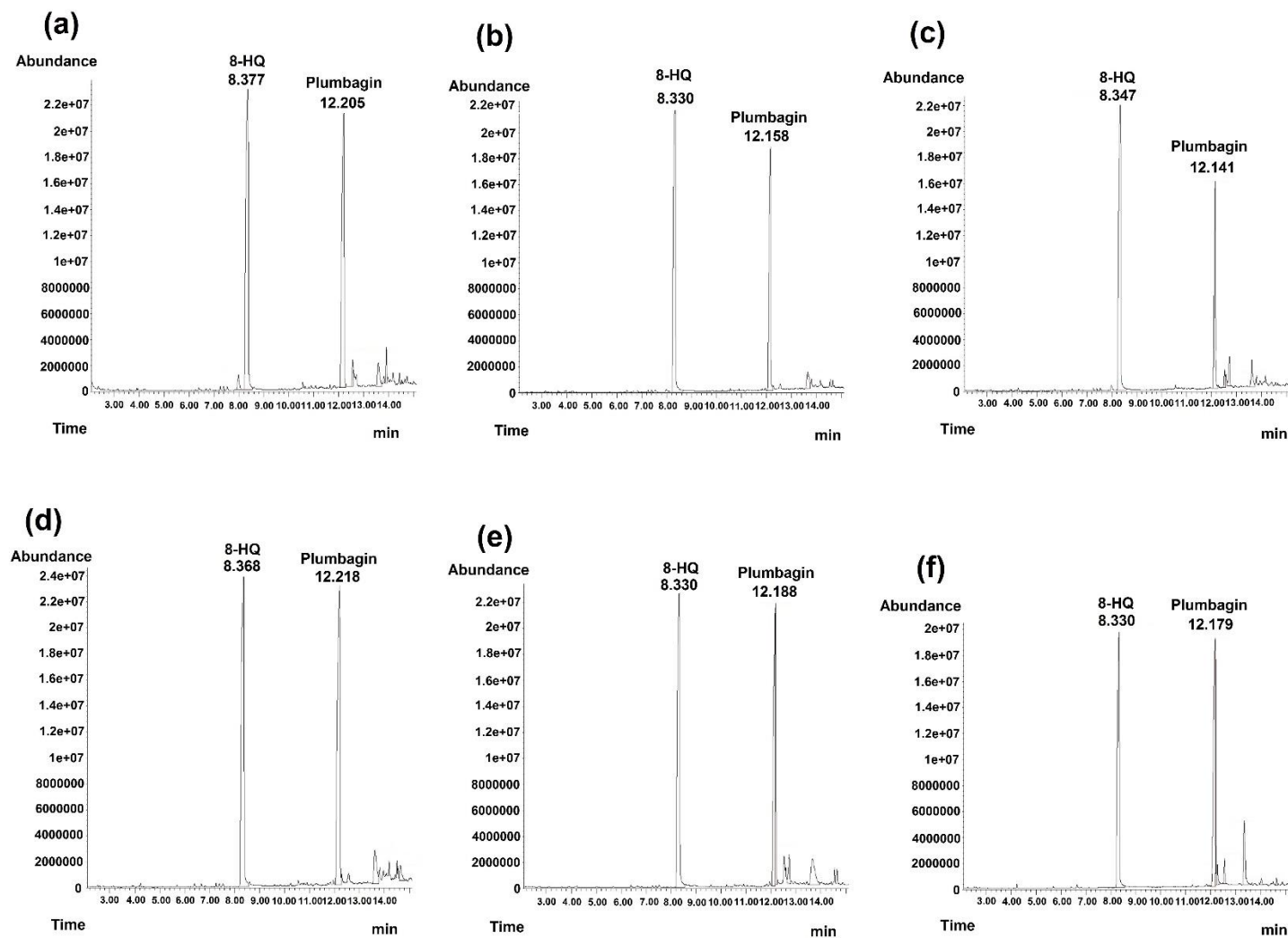




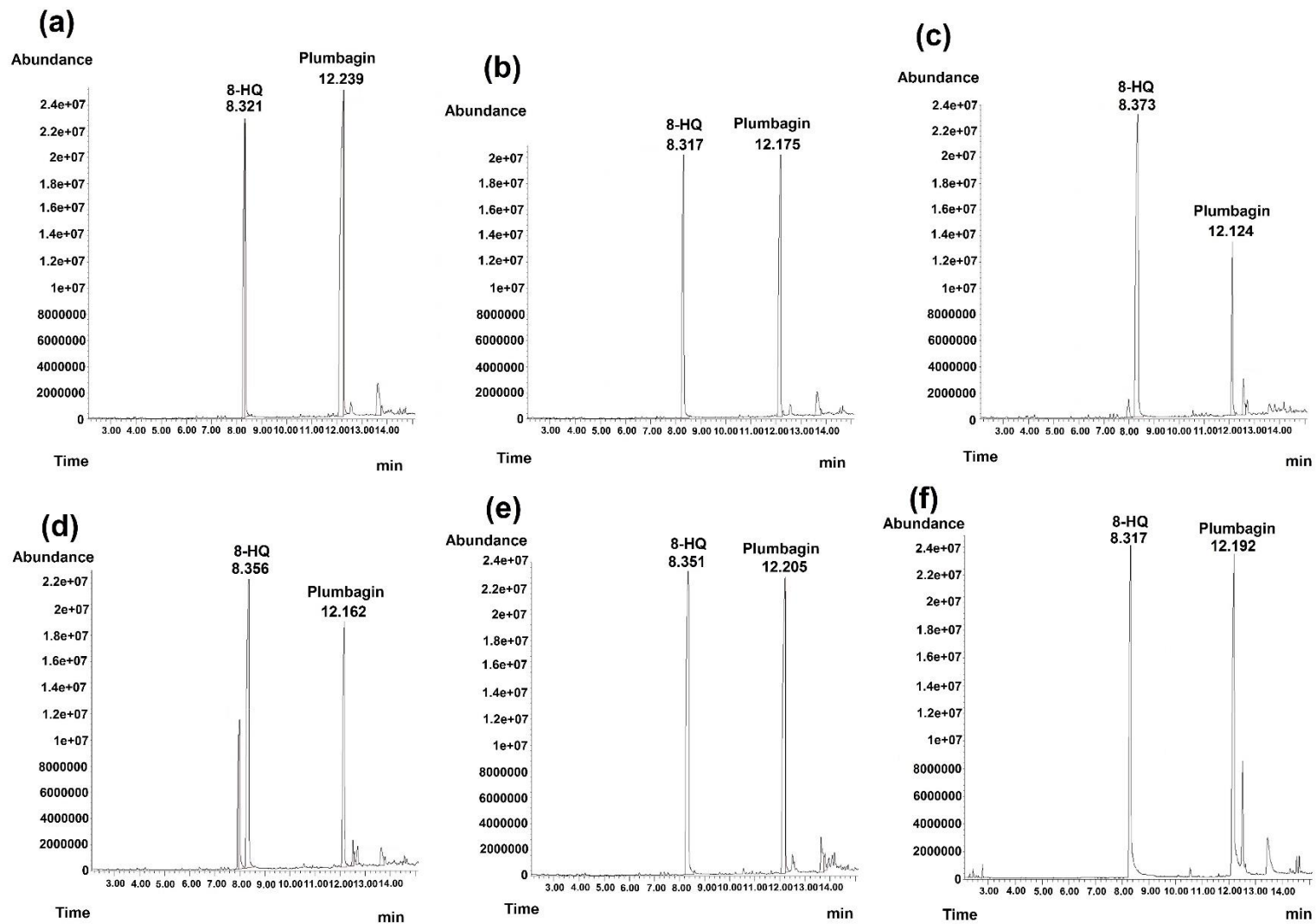
**Figure S5.** TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 1 g of root and 7.5 h extraction.



**Figure S6.** TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 50 g of root and 2.5 h extraction.



**Figure S7.** TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 50 g of root and 5 h extraction.



**Figure S8.** TIC chromatogram of plumbagin extract with (a) mantle heating, (b) near-infrared irradiation, (c) tribochemistry-mechanochemistry, (d) ultrasound, (e) ultrasound-mantle heating, and (f) microwave, using 50 g of root and 7.5 h extraction.

**Equation S1.** Surface model of the behavior of extraction by MH.

$$\text{Plumbagin (MH)} = 2.61706 + 0.074406 A - 0.26156 B + 0.018174 AB$$

**Equation S2.** Surface model of the behavior of extraction by NIR.

$$(\text{NIR}) = 0.75914 + 0.027571 A - 0.10154 B + 0.026918 AB$$

**Equation S3.** Surface model of the behavior of extraction by TB-MCh.

$$\text{Plumbagin (TB - MCh)} = -0.061998 + 0.21569 A + 0.048046 B - 0.022772 AB$$

**Equation S4.** Surface model of the behavior of extraction by US.

$$\text{Plumbagin (US)} = -0.012575 + 0.18462 A + 0.073277 B + 3.12149e^{-003} AB$$

**Equation S5.** Surface model of the behavior of extraction by US-MH.

$$\text{Plumbagin (US - MH)} = -0.17372 + 0.15763 A + 0.15087 B + 9.04565e^{-003} AB$$

**Equation S6.** Surface model of the behavior of extraction by MW.

$$\text{Plumbagin (MW)} = 1.63595 + 0.082887 A - 0.20778 B + 0.026847 AB$$

Where:

A = Mass Roots (g)

B = Time (h)

AB = Mass Roots (g) \* Time (h)

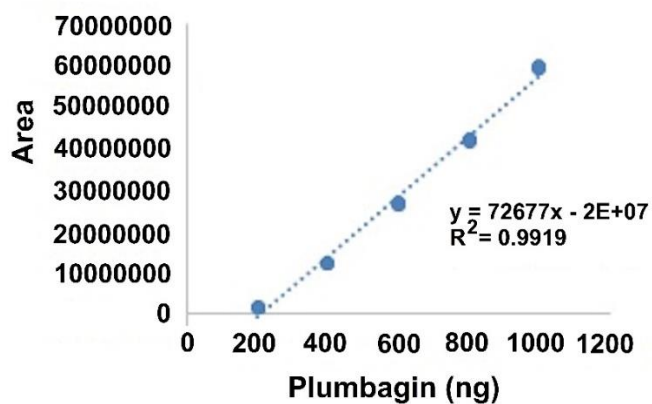


## Validation of Gas Chromatography studies by ICH Q2 R2 2022 guidelines.

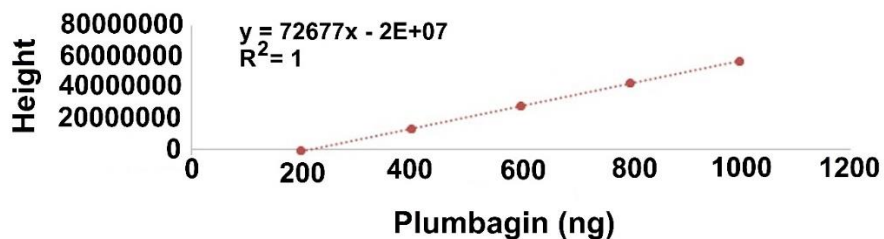
### 1. Linearity.

**Table S2.** Linearity of the plumbagin system.

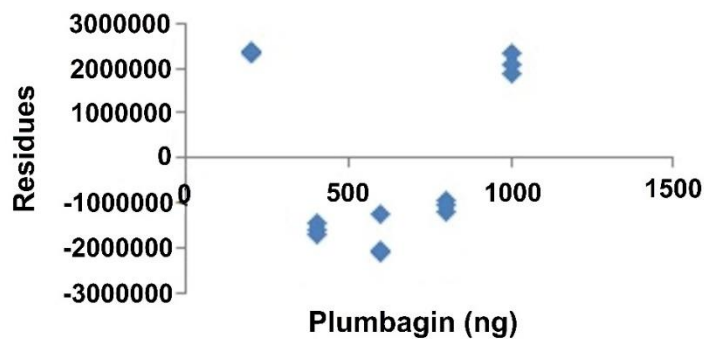
Standard	Plumbagin (ng)	Height	CV (%)	Acceptance requirements
0	0	0	-	-
1	200	271102	1.968	√
	200	277871		
	200	278590		
2	400	854152	0.845	√
	400	857036		
	400	848342		
3	600	3497342	1.766	√
	600	3593658		
	600	3580893		
4	800	5420795.3	0.308	√
	800	5372735.5		
	800	5388363.1		
5	1000	15382381	0.419	√
	1000	15216537		
	1000	15548126		



**Graphic S1.** Experimental calibration curve for plumbagin.



**Graphic S2.** Fitted regression curve for plumbagin.



**Graphic S3.** Residual plot for plumbagin.

**Table S3.** Elements of regression analysis.

		Acceptance requirements	Lower confidence interval (b)	Upper confidence interval (b)	Lower confidence interval (a)	Upper confidence interval (a)
Slope (b)	72677.0000	√	68804.67	76549.33	-17950919.44	-12813669.56
Intercept (a)	-15382294.5000	√		72677.00		-15382294.50
R <sup>2</sup>	0.9913	√			Acceptance requirements	
t (t Student, 0.5)	2.1314			√		√
Typical slope error	1816.76					
Typical error intercept	1205107.08					

**Table S4.** Summary.

<b>Regression statistics</b>	
Multiple correlation coefficient	0.9960
Determination coefficient R <sup>2</sup>	0.9920
R <sup>2</sup> adjusted	0.9913
Typical error	1990168
Observations	15

**Table S5.** Variance analysis.

	<b>Degrees of freedom</b>	<b>Sum of squares</b>	<b>Average of the squares</b>	<b>F</b>	<b>Critical value of F</b>
Regression	1	6.33827E+15	6.33827E+15	1600.2616	5.3542E-15
Residues	13	5.149E+13	3.96077E+12		
Total	14	6.38976E+15			

	<b>Coefficients</b>	<b>Typical error</b>	<b>t statistic</b>	<b>Probability</b>	<b>Lower 95%</b>	<b>Higher 95%</b>	<b>Lower 95.0%</b>	<b>Higher 95.0%</b>
Interception	-15382294.5	1205107.08	-	9.931E-09	-	-	-17985770	-12778818.9
Variable X1	72676.63117	1816.767281	40.0032695	5.354E-15	68751.744	68751.7441	68751.7441	76601.51826

**Table S6.** Residual analysis.

<b>Observation</b>	<b>Forecast for Y</b>	<b>Residues</b>	<b>Standard residues</b>
1	-846968.2667	2346615.267	1.223613643
2	-846968.2667	2348046.267	1.22435982
3	-846968.2667	2399046.267	1.250953143
4	13688357.97	-1583042.97	-0.825458267
5	13688357.97	-1476832.97	-0.77007637
6	13688357.97	-1705417.97	-0.889269204
7	28223684.2	-2113391.2	-1.102001825

8	28223684.2	-2053854.2	-1.070956989
9	28223684.2	-1277416.2	-0.666092952
10	42759010.43	-940211.433	-0.490261678
11	42759010.43	-1196418.43	-0.623857664
12	42759010.43	-1052996.43	-0.549072027
13	57294336.67	1857089.333	0.968356371
14	57294336.67	2354405.333	1.227675677
15	57294336.67	2094379.333	1.092088321

2. Repeatability.

**Table S7.** Repeatability for plumbagin.

Sample number	Added concentration µg	Height	Calculated concentration ng	Recovered %	Bias %
Repeatability 1	600	29599972	598.7920646	99.799	-0.201
Repeatability 2	600	28589444	585.3802312	97.563	-2.437
Repeatability 3	600	29738362	600.6287912	100.105	0.105
Repeatability 4	600	28449072	583.5171993	97.253	-2.747
Repeatability 5	600	29465723	597.0102978	99.502	-0.498

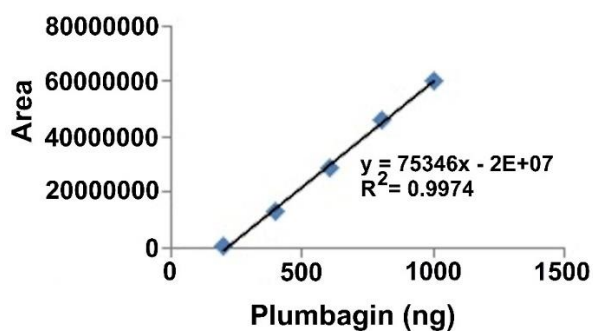
**Table S8.** Elements of regression analysis.

		Acceptance requirements	
Average Recovery	98.844	√	
Coefficient of variation	1.348	√	
t (t Student)	2.447		
Standard deviation	1.333		
n	3		
Lower confidence interval	96.961	√	98.844
Upper confidence interval	100.727	√	

3. Detection limit and quantification limit.

**Table S9.** Limits of detection and quantification for plumbagin.

Standard	Plumbagin (ng)	Area	Acceptance requirements
1	200	822422	√
2	400	13292555	√
3	600	28593435	√
4	800	45864802	√
5	1000	59882592	√



**Graphic S4.** Plumbagin calibration curve\*.

\*= White signal/noise plumbagin, coefficient of correlation= 0.9974.

**Table S10.** Limits of detection and quantification analysis.

Slope	53877	
Intercept	-3046007.1	
Correlation coefficient	0.99	
Signal/noise	28321.0000	Area
Signal/noise x 3	84963.0000	Area
Signal/noise x 10	283210.0000	Area
Equipment limits of detection	20.6617	µg
Equipment limits of quantification	68.8722	µg



## REFERENCIAS

1. CINVESTAV. (2022). *Fallece Pedro Joseph Nathan precursor del estudio de la química de productos naturales*. Recuperado el 23 de octubre de 2023, de <https://conexion.cinvestav.mx/Publicaciones/fallece-pedro-joseph-nathan-precursor-del-estudio-de-la-qu237mica-de-productos-naturales>
2. León O. (2018). Génesis de la formación científica de Pedro Joseph-Nathan. *Educación Química*, 24, 516-521.
3. Martínez T, Covián M. (2022). *Pedro Joseph-Nathan*. Recuperado el 23 de octubre de 2023, de <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/entrevista/292-numero-34/528-pedro-joseph-nathan.html>