

ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL RASTLINSKIH IZVLEČKOV, PRIDOBLENIH S SUBKRITIČNO VODO

ANTIOXIDATIVE POTENTIAL OF PLANT EXTRACTS OBTAINED WITH SUBCRITICAL WATER

AVTORJA / AUTHORS:

asist. Katja Schoss, mag. ind. farm.¹

izr. prof. dr. Janez Mravljak, mag. farm.²

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko biologijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko kemijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: katja.schoss@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Radikali so del našega vsakdana, ki se mu ne moremo izogniti, a so ob povečani tvorbi škodljivi za naše zdravje. Zato je človeško telo razvilo kompleksen sistem encimskih in neencimskih antioksidativnih zaščitnih mehanizmov za preprečevanje škodljivih učinkov radikalov. Žal tudi ta sistem lahko podleže oksidativnemu stresu, učinke le-tega pa lahko omilimo z dodatnim vnosom antioksidantov. Ti so postali nepogrešljiva skupina prehranskih dopolnil in aditivov živil, rastlinska hrana pa je njihov velik potencialni vir. Eden izmed možnih načinov pridobivanja rastlinskih antioksidantov je ekstrakcija s subkritično vodo. Subkritična voda ima v primerjavi z vodo pri normalnih razmerah posebne lastnosti, kot so manjša dielektrična konstanta, manjša gostota, nižja površinska napetost in večja ionizacijska konstanta, kar deluje v korist boljšim izplenom ekstrahiranih ter pogosto tudi večji antioksidativni aktivnosti izvlečkov. V članku predstavljamo raziskave zadnjih petih let, ki so vrednotile antioksidativno aktivnost izvlečkov, pridobljenih s subkritično vodo.

KLJUČNE BESEDE:

antioksidanti, ekstrakcija, rastlinski izvlečki, subkritična voda

ABSTRACT

Free radicals are a part of our everyday life that we cannot avoid, but are harmful to our health in cases of increased production. Thus, the human body has developed a complex system of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defence mechanisms to prevent the harmful effects of free radicals. Unfortunately, this system can also be subject to excessive oxidative stress, and its effects can be mitigated by additional *per os* intake of antioxidants. These have become a desirable group of dietary supplements and food additives. Plant foods are a rich potential source of these antioxidants. One of the possible ways of obtaining plant antioxidants is extraction with subcritical water. Subcritical water has special properties in comparison to water under normal conditions, such as lower dielectric constant, lower density, lower surface tension and higher ionization constant. All this works in favour of better extraction efficiency and in many cases higher an-

tioxidative activity of extracts. In this paper, we present studies of the last five years that evaluated the antioxidative activity of extracts obtained with subcritical water.

KEY WORDS:

antioxidants, extraction, plant extracts, subcritical water

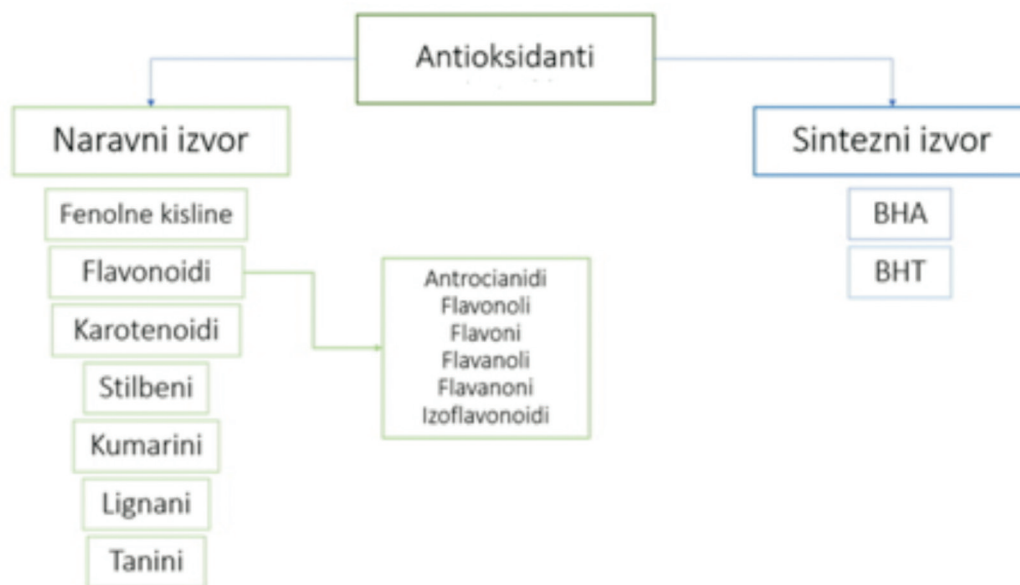
1 RADIKALI, ANTIOKSIDANTI IN ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Radikali so prisotni vsepovsod v naravi in konstantno nastajajo v naši okolici ter v našem telesu. V telesu imajo dvojno vlogo: pri določenih procesih so koristni in nena-domestljivi, hkrati pa so lahko tudi nevarni – ob preveliki količini ter če se pojavljajo tam, kjer to ni potrebno. Kemij-sko gledano so radikali atomi, ioni ali nevtralne spojine, ki imajo vsaj en nesparjen elektron v zunanji (valenčni) orbitali, zaradi katerega običajno zelo hitro reagirajo s snovmi v svoji okolici in imajo kot posamezne molekule kratko ži-vljenjsko dobo (1). Najpogostejši so kisikovi, dušikovi in žveplovi radikali. V telesu nastajajo na različnih ravneh, kot normalni del presnove v mitohondrijih, preko ksantin okxi-

daze, peroksisomov, fagocitoze, vnetnih procesov in tele-sne vadbe. Poznamo tudi zunanje dejavnike, ki spodbujajo nastajanje radikalov, kot so npr. ionizirajoče sevanje, ozon, pesticidi, toksična organska topila, zdravila, kajenje in čez-merni fizični ali psihični stres (2).

Človeško telo ima kompleksen sistem encimskih in neen-cimskih antioksidativnih zaščitnih mehanizmov za prepre-čevanje škodljivih učinkov radikalov, ki so lahko vzrok za pospešeno staranje, nastanek nekaterih bolezni (npr. se-valna bolezen) oz. so spremljevalci bolezni (malaria, srčno-žilne bolezni, sladkorna bolezen itd.) (2). Odstranjevanje predvsem reaktivnih kisikovih spojin iz človeškega telesa lahko pomaga preprečiti ali zmanjšati pojavnost teh bolezni ter tako prispeva k boljši kakovosti življenja. Zaščito pred radikali je med drugim mogoče okrepiti z vnosom prehran-skih antioksidantov (1,2).

Antioksidant je *in vivo* katera koli snov, ki upočasni, prepreči ali odstrani oksidativno poškodbo ciljne molekule (3). Al-ternativna definicija je »snov, ki reagira z oksidantom, da uravnava njegove reakcije z drugimi tarčami in tako vpliva na redoks odvisne biološke signalne poti in/ali oksidativne poškodbe«. Univerzalnega oz. najboljšega antioksidanta ni: različni antioksidanti reagirajo z različnimi radikali s spre-menljivo hitrostjo, delujejo na različnih lokacijah in ščitijo različne tarče (3). Antioksidativni učinek je določen z vrsto antioksidanta, z njegovim mehanizmom delovanja, sode-lovanjem z drugimi antioksidanti in v primeru vnosa zunanjih



Slika 1: Razdelitev antioksidantov glede na naravni in sintezni izvor.

Figure 1: Classification of antioxidants according to their natural and synthetic origin.



antioksidantov še z njihovo absorpcijo v prebavilih, odmerkom, pogostostjo vnosa v telo, presnovo in izločanjem iz telesa (1).

Antioksidanti so zelo heterogena skupina snovi in jih delimo po različnih kriterijih: glede na izvor, strukturo, fizikalno-kemijske lastnosti, mehanizem delovanja in glede na možnost obnavljanja. Glede na delovanje jih v grobem delimo na reducente oz. prave antioksidante, ki v reakcijah z radikali nudijo vodikov atom ali elektron, da se reaktivni radikal pretvori v manj reaktiven radikal ali nereaktiven produkt. Kelatorji oz. posredni antioksidanti pa reagirajo z radikali tako, da vežejo kovinske ione bakra in železa ter s tem preprečijo, da bi ti ioni katalizirali radikalske reakcije. Rastlinski antioksidanti, ki so eksogenega izvora, spadajo v prvo skupino (1). Slika 1 prikazuje razdelitev antioksidantov glede na izvor in strukturo.

V zadnjih letih se je povečalo zanimanje za raziskovanje antioksidantov naravnega izvora, zlasti v prehrani, na področju prehranskih dopolnil, in v kozmetični industriji. Poleg antioksidativne aktivnosti pa so za antioksidante kot prehranske sestavine pomembne tudi druge lastnosti, npr. nespecifičen vonj, barva in okus, topnost, stabilnost, varnost ter cena (4).

2 RASTLINSKI IZVLEČKI KOT ANTIOKSIDANTI

Rastline so pomemben vir naravnih antioksidantov, ki jih v grobem delimo v tri različne skupine, med vitamine (vitamin C, vitamin E oz. tokoferoli), karotenoide (okoli 600 spojin) in polifenole (okoli 6000 spojin), ki sodijo med fenolne spojine in so glavni viri rastlinskih antioksidantov (1).

2.1 POLIFENOLI

Polifenoli so skupina sekundarnih metabolitov v rastlinskem svetu, ki imajo zelo različne funkcije, od barvil v listih, cvetovih in plodovih do antioksidativnega, protimikrobnega in protiglavnega delovanja ter zaščite pred UV-sevanjem (3). Znanih je več kot 10.000 različnih spojin, vključno s flavonoidi, stilbeni in lignani, v to široko skupino pa po definiciji spada vsaka spojina, ki ima več hidroksilnih (-OH) skupin na benzenovem obroču (1).

Čeprav pogosto priporočajo uživanje nekaterih rastlin le na podlagi odlične antioksidativne aktivnosti njihovih izvlečkov *in vitro*, pa so si mnenja o učinkovitosti polifenolov

v telesu zaradi slabe biološke absorpcije različna. V večini primerov se polifenoli v prebavilih absorbirajo v majhni meri, absorpcija pa je odvisna tudi od posameznika ter od vrste zaužite spojine. Nekateri so mnenja, da po zaužitju polifenolov absorpcijo iz črevesja dokazuje posledično povečana antioksidativna sposobnost plazme (2), vendar pa je izmerjena koncentracija antocianina (0,03 μM) in galne kisline (4 μM) nizka (1). Obseg in hitrost absorpcije polifenolov v črevesju sta povezani z njihovo kemijsko strukturo, polifenolne oblike, ki so prisotne v človeških tkivih in krvi, pa se zaradi metaboliziranja v jetrih (-OH skupine se konjugirajo s sulfatom, glukuronsko kislino ali pa se metilirajo) razlikujejo od tistih v živilih, kar otežuje identifikacijo vseh metabolitov in oceno njihove biološke aktivnosti (1, 2). Kljub temu je splošno sprejeto, da polifenoli ugodno vplivajo na fiziološke procese v prebavilih, kjer so lokalne koncentracije antioksidantov precej višje od tistih v plazmi (10 do več 100 μM) (1). Situacija *in vivo* je verjetno drugačna, saj obstajajo raziskave, ki so potrdile povezavo med zmanjšano pojavnostjo npr. srčno-žilnih bolezni in uživanjem polifenolov, nekatere raziskave pa povezave niso potrdile. Polifenoli pa lahko sprožijo zvišanje endogenih antioksidativnih encimov *in vivo* in na ta način izkazujejo posredno antioksidativno delovanje (4).

2.2 KAROTENOIDI

V hrani prisotni karotenoidi se v naših prebavilih absorbirajo, kar se pri mnogih sesalcih ne zgodi. Absorpcija karotenoidov je sicer nepopolna in odvisna od vrste ter priprave, za boljšo absorpcijo pa je treba sočasno uživati lipide. Karotenoide, ki v molekuli vsebujejo kisik, poznamo kot ksantofile (lutein), tiste brez kisika pa kot karotene (alfa-karoten, likopen). V rastlinah so karotenoidi pomembni antioksidanti, ki odstranjujejo singletni kisik in preprečujejo njegovo nastajanje v procesu fotosinteze. V živalskih sistemih njihove antioksidativne vloge še ne poznamo dovolj, ne moremo pa je zanikati (1).

3 TESTI ZA UGOTAVLJANJE VSEBNOSTI KOMPONENT Z ANTIOKSIDATIVNIMI LASTNOSTMI

Aktivnosti antioksidantov so odvisne od strukturnih značilnosti molekule ter od dejavnikov, kot so koncentracija, temperatura, svetloba, vrsta substrata, fizikalno stanje antioksidantov v sistemu ter celotna sestava izvlečka (2).

Ugotavljanje antioksidativnih lastnosti rastlinskih izvlečkov in spojin zahteva ustrezne metode, ki obravnavajo mehanizem antioksidativnega delovanja in se osredotočajo na kinetiko reakcij. Metode, ki temeljijo na inhibiciji avtooksidacije, so najbolj primerne za antioksidante, ki pospešujejo prekinitve oksidacije (*termination-enhancing*), in za antioksidante, ki prekinjajo verigo oksidacije (*chain-breaking*), medtem ko so za preventivne antioksidante (kelatorje kovinskih ionov) potrebne specifične raziskave. Na voljo imamo široko paleto spektrofotometričnih testov za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti živil in farmacevtskih izdelkov, ni pa standardizirane metode, s katero bi ugotavljali raven antioksidantov neposredno iz rastlinskih materialov, izvlečkov hrane in bioloških vzorcev (2).

Najpogostejši testi *in vitro* za vrednotenje vsebnosti oz. antioksidativne aktivnosti komponent, so (2):

- test ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat),
- test DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil),
- test antioksidativne moči redukcije železovih ionov (Fe^{3+} – Fe^{2+}) (*ferric reducing antioxidant power* – FRAP),
- test antioksidativne kapacitete redukcije bakrovih(II) ionov (Cu^{2+} *reducing power* – CUPRAC),
- ocena celokupne antioksidativne kapacitete s fosfomolibdenskim testom (*phosphomolybdenum total antioxidant activity assay* – PM),
- test Folin–Ciocalteu (FC),
- test peroksilnega radikala ($\text{ROO}^\bullet$) (*peroxyl radical assay*),
- test superoksidnega radikala aniona ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (test ORAC, *superoxide radical anion assay*),
- test odstranjevanja vodikovega peroksida (H_2O_2) (*hydrogen peroxide scavenging assay*),
- test odstranjevanja hidroksilnih radikalov ($\text{OH}^\bullet$) (*hydroxyl radical scavenging assay*),
- test odstranjevanja singletnega kisika ($^1\text{O}_2$) (*singlet oxygen quenching assay*),
- test odstranjevanja dušikovega oksida ($\text{NO}^\bullet$) (*nitric oxide radical scavenging assay*),
- kemiluminiscenčni test (*chemiluminescence assay*),
- inhibicija lipidne peroksidacije v sistemu linolne kisline (*inhibition of lipid peroxidation in linoleic acid system*),
- celokupni antioksidativni kazalnik lovljenja radikalov (*total radical-trapping antioxidant parameter* – TRAP),
- test DMPD (*N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamin),
- test vsebnosti flavonoidov (TFC),
- test vsebnosti antocianinov.

Večina navedenih testov uporablja isti princip, in sicer redukcijo obarvanega radikala ali redoks aktivne spojine. Antioksidativno aktivnost vrednotimo preko sposobnosti bio-

loškega vzorca, da reducira radikal ali redoks aktivno spojino, kar spremljamo s spektrofotometrom z uporabo ustreznega standarda za kvantificiranje antioksidativne aktivnosti (2).

4 EKSTRAKCIJA S SUBKRITIČNO VODO

Subkritično stanje tekočine pomeni, da je spojina segreta na temperaturo, pri kateri bi snov ob normalnem atmosferskem tlaku morala preiti v plinasto stanje, vendar je tlak povečan do te mere, da je fazni prehod onemogočen in tekočina ostaja v subkritičnem – tekočem stanju (5). Čeprav je v subkritičnem stanju možno uporabljati več topil, zaradi okoljske sprejemljivosti in varnosti največkrat uporabljamo vodo (6, 7), ki se jo kot ekstrakcijsko topilo uporablja pri temperaturah med 100 °C in 374 °C. Lastnosti vode se v subkritičnem stanju izrazito spremenijo, zaradi česar postane zanimiva tudi za ekstrakcijo manj polarnih snovi (5, 8, 9). Najpomembnejša sprememba je, da se znižata njena dielektrična konstanta in s tem polarnost; podrobnosti so opisane v nedavno objavljenem preglednem članku (10). Večina raziskav o ekstrakciji s subkritično vodo (SWE) so raziskave o ekstrakciji antioksidantov, npr. polifenolnih spojin iz najrazličnejših virov in (zaradi različne stabilnosti polifenolov) pri različnih ekstrakcijskih razmerah, hkrati pa je ponavadi izdelan še primerjalni izvleček, npr. z maceracijo v različnih topilih, Soxhletovo ekstrakcijo, ekstrakcijo z vročo vodo (*hot water extraction* – HWE), ultrazvočno ekstrakcijo (*ultrasonic assisted extraction* – UAE) in ekstrakcijo s pomočjo mikrovalov (*microwave assisted extraction* – MAE) (8).

Antioksidativna aktivnost izvlečkov se z višanjem temperature ekstrakcije lahko viša (ali niža) zaradi več razlogov. Ekstrakcija lahko pri povišani temperaturi poteka bolje, hkrati pa lahko pride tudi do nastanka novih antioksidantov s pospeševanjem kemijskih reakcij, kar je lahko želeno ali neželjeno. Če je ekstrakcija namenjena pridobivanju novih antioksidativno aktivnih spojin, je pojav pozitiven, če pa želimo zgolj povečati izplen ekstrakcije izvlečka, ki bo po sestavi primerljiv klasičnemu (tj. pridobljenem pri nižji temperaturi), pa je sprememba neželena. Do tvorbe novih antioksidantov prihaja zaradi hidrolitične (pod vplivom visoke temperature in vode) razgradnje rastlinskih metabolitov in drugih možnih reakcij pri višjih temperaturah (Maillardova reakcija in karamelizacija). Ekstrakcija in razgradnja pogosto



potekata hkrati (11). Zaradi tega je natančno proučevanje hitrosti ekstrakcije in razgradnje spojin med SWE koristno za določitev najboljših ekstrakcijskih pogojev.

5 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST IZVLEČKOV, PRIDOBLENIH S SUBKRITIČNO VODO

V tem poglavju obravnavamo raziskave zadnjih petih let (2017–2022), kjer je bila glavna naloga raziskati antioksidativno aktivnost izvlečkov, pridobljenih s subkritično vodo. Pri tem se v okviru optimizacije ekstrakcijskih razmer največkrat pojavljajo variacije temperature, časa in razmerja med rastlinsko drogo ter topilom (preglednica 1).

Antioksidativno aktivnost so najbolj raziskali pri rastlinah, bogatih s polifenoli (najpogostejše fenolne kisline, flavonoidi in antocianini), pri čemer so za njeno vrednotenje najpogostejše uporabili teste DPPH, ABTS in FC. Poudariti moramo, da neposredna primerjava rezultatov med raziskavami žal ni mogoča predvsem zaradi naslednjih razlogov: testi so izvedeni na različne načine, rezultati so podani na različne načine (npr. na ekvivalente različnih antioksidantov, kot so galna kislina, kvercetin, katehin, klorogenska kislina, rutin in Trolox, na izvleček s topilom, na maso suhega izvlečka ali suhe rastlinske droge), razlikujejo pa se tudi glede na vrsto izvlečka.

Pri SWE ostankov zeli navadnega rmana (*Achillea millefolium*), pridobljenih kot odpadni produkt industrije čajev, kjer so variirali temperaturo, čas in količino HCl, so Vladić in sod. (12) ugotovili, da se je največja količina polifenolov ekstrahirala z 20-minutno ekstrakcijo pri 200 °C in brez uporabe HCl. Vsebnost flavonoidov je bila najvišja po 20-minutni ekstrakciji pri 120 °C, prav tako brez uporabe HCl, najvišja antioksidativna aktivnost (ugotovljena s testom ABTS) pa je bila v izvlečkih, ki so jih pridobili z desetminutno ekstrakcijo pri 200 °C in z uporabo HCl (0,75 %).

Benito-Román in sod. (13) so proučevali antioksidativno aktivnost izvlečkov SWE suhih luskolistov čebule (*Allium cepa*) v primerjavi z etanolno ekstrakcijo s pomočjo testov FC, TFC in FRAP. Ugotovili so, da se antioksidativna aktivnost zvišuje z daljšanjem časa ekstrakcije do 80 min pri 150 °C, nato pa ostaja enaka do 180 min. Antioksidativna aktivnost izvlečkov, pridobljenih z ekstrakcijo pri različnih temperaturah, se je večala z naraščanjem temperature od 105 do 180 °C.

Cvetanović in sod. (14) so proučevali antioksidativno aktivnost (testi FC, TFC, ABTS, DPPH in inhibicija lipidne pe-

roksidacije v sistemu linolne kisline) izvlečkov SWE iz plov, listov in stebel aronije (*Aronia melanocarpa*), pridobljenih pri 130 °C, 20 min in 35 bar, brez kontrole. Ugotovili so, da so imeli izvlečki dobre antioksidativne lastnosti, Švarc-Gajić in sod. (15) pa so proučevali zgolj antioksidativno aktivnost izvlečkov SWE stebel aronije, ki so prav tako izkazali dobre antioksidativne lastnosti.

Pinto in sod. (16) so proučevali ekstrakte SWE iz lupin navadnega kostanja z variacijo časa in temperature ekstrakcije. Pri različnih antioksidativnih testih so dobili rahlo različne rezultate: test ABTS je pokazal najvišjo aktivnost ekstrakta, pridobljenega s 30-minutno ekstrakcijo pri 220 °C, testi FRAP, FC in DPPH pa so pokazali najvišjo aktivnost ekstrakta, pridobljenega z 20-minutno ekstrakcijo pri 249 °C.

Izvrčke SWE pri temperaturah 110–230 °C in izvleček HWE vrste zelene alge *Caulerpa racemosa* in morske solate (*Ulva lactuca*) so proučevali Pangestuti in sod. (17). Poleg višjega izplena so s SWE pridobili tudi več polifenolov (ugotovljeno s testom FC), flavonoidov (ugotovljeno s testom TFC) in antioksidantov (ugotovljeno s testom ABTS). Z višanjem temperature SWE (110–190 °C) se je višala koncentracija polifenolov in flavonoidov v ekstraktu. Rezultati testa ABTS in celokupni antioksidanti so se zvišali v vseh izvlečkih SWE, tudi pri 230 °C.

Antioksidativno aktivnost manana iz semen arabskega kavovca (*Coffea arabica*) so proučevali Getachew (18) in sod. Osnovne ekstrakte so pridobili s Soxhletovo ekstrakcijo s heksanom, nato pa so jih tretirali s subkritično vodo (180–220 °C, 30–60 bar). Modificirani ekstrakti so se s testi ABTS, DPPH, FRAP in PM v vseh poskusih izkazali za bolj antioksidativno aktivne.

Učinkovitost subkritične ekstrakcije z vodo so na pravi kamilici (*Matricaria chamomilla*) v dveh raziskavah proučevali Cvetanović in sod. Menijo, da so polifenoli, natančneje flavonoidi, najbolj odgovorni za visoko antioksidativno delovanje ekstrakta kamilice. Najpogostejše metode ekstrakcije za izolacijo fenolnih spojin iz kamilice vključujejo običajne ekstrakcijske tehnike z uporabo etanola kot topila. V raziskavi (19) so variirali temperaturo ekstrakcije (30 min, 45 bar, 65–210 °C) in nato s testi inhibicije lipidne peroksidacije v sistemu linolne kisline, DPPH, ABTS in s testom odstranjevanja hidroksilnih radikalov ugotovili, da je ekstrakcija pri temperaturah nad 150 °C privedla do izboljšane antioksidativne aktivnosti ekstraktov v primerjavi z nižjimi temperaturami. V drugi raziskavi (20) so proučevali odvisnost ekstrakcije od tlaka (30 min, 100 °C, tlak: 10, 30, 45, 60 in 90 bar) in primerjali antioksidativno aktivnost pridobljenih ekstraktov s testi DPPH, ABTS, FRAP in testom odstra-

Preglednica 1: Pregled raziskav in vitro, ki so glede na antioksidativno aktivnost vrednotile izvlečke, pridobljene s subkritično vodo. Navedene so tudi uporabljene metode ekstrakcij, parametri ekstrakcij ter testi, ki so jih uporabili za vrednotenje izvlečkov.

Table 1: Overview of studies that evaluated subcritical water extracts based on their antioxidant activity, including extraction methods, extraction parameters and tests for extract evaluation.

Latinsko ime Slovensko ime Del rastline	Metode ekstrakcije	Parametri ekstrakcije*	Testi	Vir
<i>Achillea millefolium</i> Navadni rman Zel kot ostanek v čajnih vrečkah	SWE	120–200 °C, 10–30 min, HCl 0–1,5 %, konst. tlak 30 bar	FC, TFC, ABTS	(12)
<i>Allium cepa</i> Čebula Suhi luskolisti	SWE Etanolna ekstrakcija	105–180 °C, 0–180 min 37 °C, 60 min, 70- odstotni etanol	FC, TFC, FRAP	(13)
<i>Aronia melanocarpa</i> Aronija Plod, list, steblo	SWE	130 °C, 20 min, 35 bar	FC, TFC, ABTS, DPPH, inhibicija lipidne peroksidacije v sistemu linolne kisline	(14)
<i>Aronia melanocarpa</i> Aronija Steblo	SWE	130 °C, 20 min, 35 bar, 1 : 20	DPPH, FRAP	(15)
<i>Castanea sativa</i> Navadni kostanj Lupine	SWE	51–249 °C, 6–34 min, 40 bar, 1 : 10	ABTS, FRAP, DPPH, FC, test superoksidnega radikala aniona, test odstranjevanja vodikovega peroksida, test odstranjevanja hidroksilnih radikalov	(16)
<i>Caulerpa racemosa</i> Vrsta zelene alge Steljka in <i>Ulva lactuca</i> Morska solata Steljka	SWE HWE	110–230 °C, 10 min, 1 : 40 100 °C, 2 h, 1 : 40	FC, TFC, ABTS	(17)
<i>Coffea arabica</i> Arabski kavovec Seme	SWE po Soxhletovi ekstrakciji s heksanom	180–220 °C, 30–60 bar	ABTS, DPPH, FRAP, PM	(18)
<i>Matricaria chamomilla</i> Prava kamilica Cvet	SWE SWE	65–210 °C, 30 min, 45 bar 100 °C, 30 min, tlak: 10, 30–90 bar	inhibicija lipidne peroksidacije, DPPH, test odstranjevanja hidroksilnih radikalov, ABTS DPPH, ABTS, FRAP, test odstranjevanja hidroksilnih radikalov	(19) (20)
<i>Chlorella</i> sp. Alga klorela Steljka	SWE	100–250 °C, 5–20 min	FC, DPPH	(21)



<i>Citrus unshiu</i> Mandarina unshiu Lupina plodu	SWE	145–175 °C, 15 min, 0,75–2,25 mL/min, 5 mPa	DPPH, FRAP, ORAC	(22)
	Metanolna ekstrakcija	sobna temperatura, 30 min, 1 : 30		
<i>Fagopyrum esculentum</i> Navadna ajda List	SWE	100–220 °C, 10–50 min	FC, TFC, DPPH, FRAP	(23)
<i>Fagopyrum tataricum</i> Tatarska ajda Lupina plodu (24), seme (25)	SWE	220 °C, 60 min, 1 : 60	FC, ABTS, FRAP, TEAC	(24) (25)
	UAE	50 °C, 20 min, 1 : 60		
	HWE	80 °C, 60 min, 1 : 60		
	UAE-SWE	UAE (50 °C)-SWE (220 °C), UAE (20 min)-SWE (60 min), 1 : 60		
<i>Lavatera thuringiaca</i> Turingijski oslez Zel	Etanolna ekstrakcija (Soxhlet)	22 °C, 8 h, 1 : 8, 96- odstotni etanol	FC, TFC, test vsebnosti antocianinov, PM, test peroksilnega radikala, test odstranjevanja hidroksilnih radikalov, DPPH	(26)
	Etanolna ekstrakcija (maceracija)	22 °C, 7 dni, 1 : 30, 96- odstotni etanol		
	Etanolna UAE	22 °C, 30 min, 1 : 20		
	Etanolna MAE	30 min, 1 : 20, 600 W		
	SWE	140 °C, 40 bar, 1 : 20		
<i>Lycium ruthenicum</i> Črna goji jagoda Plod	SWE	110–170 °C, 30–90 min, 1–3 min/L	Test vsebnosti antocianinov, DPPH, ABTS	(27)
	HWE	70 °C, 90 min, 1 : 15, 150 W		
	Metanolna ekstrakcija	70 °C, 90 min, 1 : 15, 150 W, 50-odstotni metanol		
<i>Orostachys japonicus</i> Japonski orostahis Zel	SWE	110–260 °C, 5–20 min	FC, DPPH, ABTS, FRAP	(28)
<i>Pistacia vera</i> Pistacija Seme	SWE	110–190 °C, 1 : 60, 5–50 min	FC, ABTS, DPPH, FRAP	(29)
	UAE	metanol/voda/mravljinčna kislina (80/19/1), 1 : 60	DPPH, FC	(30)
	SWE	140–220 °C, 6,5–15,5 MPa, 0–95-odstotni etanol		

<i>Pseuderanthemum palatiferum</i> / List	Metanolna ekstrakcija	25 °C, 19 h, 1 : 100	FC, TFC, DPPH, FRAP, ABTS	(31)
	Soxhletova ekstrakcija	7 h, 1 : 70, 70-odstotni etanol		
	HWE	80 °C, 30 min, 1 : 25		
	SWE	110–270 °C, 15 min, 1 : 70, 80 bar		
<i>Quercus suber</i> Hrast plutovec Pluta	SWE	120–200 °C, do 30 min, 10 mL/min, 100 bar,	FC, DPPH	(32)
<i>Sagittaria sagittifolia</i> Navadna streluša Zel	HWE	100 °C, 120 min	DPPH, ABTS, FRAP	(33)
	SWE	150–190 °C, 12–20 min, 1 : 20 do 1 : 40, pH 7–9		
<i>Sesamum indicum</i> Sezam Predhodno stisnjena semena	SWE	140–220 °C, 8–14 MPa, 0–95-odstotni	FC, DPPH, TFC, ABTS	(34)
<i>Sorghum bicolor</i> Navadni sirek Žitno zrno	HWE	95 °C, 5–40 min, 1 : 10 do 1 : 50	FC, ABTS, DPPH,	(35)
	SWE	110–190 °C, 5–40 min, 1 : 10 do 1 : 50		
<i>Symphytum officinale</i> Navadni gabez Korenina	SWE	120–200 °C, 10–30 min, 0–1,5-odstotna HCl, 30 bar	FC, DPPH, TFC	(36)
	Metanolna maceracija	25 °C, 48 h, 1 : 10, 50-odstotni metanol		
	Etanolna maceracija	25 °C, 48 h, 1 : 10, 50-odstotni etanol		
	Metanolna UAE	30 °C, 40 min, 1 : 10, 40 kHz, 50-odstotni metanol		
	Etanolna UAE	30 °C, 40 min, 1 : 10, 40 kHz, 50-odstotni etanol		
<i>Theobroma cacao</i> Kakavovec Lupine kakavovih semen	SWE	120–220 °C, 15–75 min, 1 : 10 do 1 : 30	DPPH, FC	(37)
<i>Vitis vinifera</i> Vinska trta Rozga	SWE	125 °C in 250 °C, 50 min, 1 : 10	FC, FRAP, DPPH, TFC	(38)
<i>Withania somnifera</i> Vitanija Zel	SWE	100–200 °C, 10–30 min, 10 MPa	FC, DPPH, FRAP, ABTS	(39)
	Topilo	40 °C, 12 h, 1 : 10		
	SE (Soxhlet)	60 °C, 7 h, 1 : 10, 80- odstotni etanol		
	MAE	60 °C, 20 min, 1 : 10, 80- odstotni metanol, 150 W		

/ Slovensko ime rastline ne obstaja.

* Razmerja 1 : X so podana kot razmerja med maso droge in topila.

njevanja hidroksilnih radikalov. Ugotovili so, da je ekstrakt, pridobljen pri 45 bar, izkazoval najvišjo antioksidativno aktivnost pri testih ABTS in DPPH, najvišji rezultat za test odstranjevanja hidroksilnih radikalov pa je dal ekstrakt, pridobljen pri 30 bar. Pri vseh testih so najnižje aktivnosti izkazovali ekstrakti, ki so jih ekstrahirali pri najnižjem tlaku 10 bar.

Zakaria in sod. (21) so antioksidativno aktivnost ugotavljali v izvlečkih SWE (100–250 °C, čas 5–20 min) alge klorele (*Chlorella* sp.). Najboljšo antioksidativno aktivnost (ugotovljeno s testoma FC in DPPH) je imel izvleček, pridobljen s petminutno ekstrakcijo pri 163 °C.

Kim in sod. (22) so proučevali možnost ekstrakcije flavonoidov in antioksidativno aktivnost v izvlečkih SWE iz lupin plodov citrusa unshiu (*Citrus unshiu*). Variirali so temperaturo ekstrakcije (145–175 °C) in pretok topila (0,75–2,25 mL/min), za primerjavo pa so naredili še metanolni izvleček. Optimalne ekstrakcijske pogoje, ki so rezultirali v ekstraktih z največjo antioksidativno aktivnostjo, so dosegli pri temperaturi 160 °C in pretoku 2,25 mL/min ter pri 175 °C in 1,5 mL/min.

Antioksidativno aktivnost izvlečkov SWE (100–220 °C, 10–50 min) navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) so proučevali Kim in sod. (23), ki so primerjali vsebnosti flavonoidov in izvedli teste FC, DPPH ter FRAP. Količina flavonoidov in polifenolov v ekstraktih je s temperaturo ekstrakcije naraščala do 180 °C ter nato začela padati (180–220 °C), pri daljšanju časa ekstrakcije od 10 do 50 min pa je padala.

Antioksidativno aktivnost izvlečkov SWE tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) v primerjavi z drugimi izvlečki (preglednica 1) so Dzah in sod. (24, 25) proučevali v dveh raziskavah s testi FC, ABTS, FRAP in TEAC. V prvi raziskavi je bila glede antioksidativne aktivnosti vodilna ekstrakcija UAE-SWE, sledila je SWE in nato UAE ter HWE, v drugi raziskavi pa se je kot najboljši izkazal ekstrakt, pridobljen s SWE.

Mašković in sod. (26) so glede na antioksidativno aktivnost (testirano s FC, TFC, z vsebnostjo antocianinov, PM, inhibicijo lipidne peroksidacije v sistemu linolne kisline, testom odstranjevanja hidroksilnih radikalov ter z DPPH) primerjali različne ekstrakte (preglednica 1) turingijskega osleza (*Lavatera thuringiaca*). Pri testu PM je po antioksidativni aktivnosti izstopal ekstrakt, pridobljen s SWE, z drugimi testi pa niso potrdili superiornosti SWE.

Wang in sod. (27) so proučevali izvlečke, pridobljene iz plodov črne goji jagode (*Lycium ruthenicum*), kjer so primerjali SWE, HWE in metanolno ekstrakcijo glede na vsebnost antocianinov ter antioksidativno aktivnost ekstraktov s testoma DPPH in ABTS. Z optimizirano SWE (55 °C,

55 min, pretok topila 3 mL/min) so ekstrahirali največ antocianinov in pridobili ekstrakt z največjo antioksidativno aktivnostjo.

Ko in sod. (28) so proučevali izvlečke SWE kaktusa *Orostachys japonicus*, pridobljene pri različnih časih (5–20 min) in temperaturah ekstrakcije (110–260 °C). Količina fenolov in odziv pri testu ABTS sta s časom in temperaturo ekstrakcije naraščala in dosegla maksimum v ekstraktih, pridobljenih z 20-minutno ekstrakcijo pri 200 °C. Pri testu DPPH se je kot najboljša izkazala 15-minutna ekstrakcija pri 190 °C.

Erşan in sod. (29) ter Bodoira in sod. (30) so proučevali izvlečke pistacije (*Pistacia vera*). Prvi (29) so proučevali izvlečke SWE iz semen (110–190 °C), ki so jih primerjali z ekstraktom, pridobljenim z ultrazvočno metanolno ekstrakcijo. Za vrednotenje so uporabili teste ABTS, DPPH, FRAP in FC. Vsi izvlečki SWE so imeli boljšo antioksidativno aktivnost. Bodoira in sod. (30) so proučevali izvlečke iz plodov, pri čemer so variirali temperaturo (140–220 °C) in tlak (6,5–15,5 MPa) ekstrakcije ter količino etanola kot sotopila (0–95 %). Optimalni pogoji ekstrakcije, v katerih so pridobili ekstrakt z največjo antioksidativno aktivnostjo glede na rezultate testov FC in DPPH, so bili: 220 °C, 6,5 MPa in 50-odstotni etanol kot sotopilo.

Ho in sod. (31) so primerjali različne vrste izvlečkov (preglednica 1) iz listov *Pseuderanthemum palatiferum*. Izvlečki SWE so imeli pri vseh temperaturah ekstrakcije (razen 270 °C) višjo antioksidativno aktivnost in vsebnost flavonoidov. S SWE so v ekstraktih dosegli tudi največjo vsebnost polifenolov (pri 190 °C) in flavonoidov (pri 130 °C). Cunha in sod. (32) so s testoma FC in DPPH proučevali antioksidativno aktivnost izvlečkov plute iz hrasta *Quercus suber*, ki se je višala z višanjem temperature (120–200 °C) in daljšanjem časa (do 30 min) ekstrakcije.

Zhang in sod. (33) so proučevali antioksidativno aktivnost izvlečkov SWE in HWE navadne streliške (*Sagittaria sagittifolia*). Izplen SWE se je višal s temperaturo ekstrakcije od 120 do 170 °C, nato se je začel nižati. Izplen HWE je bil dvakrat manjši, prav tako pa je bila nižja tudi antioksidativna aktivnost teh ekstraktov. Optimalni pogoji SWE so bili pri pH 7, temperaturi 170 °C, času ekstrakcije 16 min in razmerju med topilom in rastlinsko drogo 30 : 1 (mL topila/g droge).

Bodoira in sod. (34) so s testi DPPH, FC, TFC in ABTS proučevali antioksidativno aktivnost izvlečkov SWE iz ostan- kov sezamovih (*Sesamum indicum*) semen po pridobivanju olja. Variirali so temperaturo (140–220 °C), tlak (8–14 MPa) in vsebnost etanola kot sotopila (0–95 %). Najvišjo antioksidativno aktivnost so ugotovili v ekstraktih, pridobljenih

pri najvišji temperaturi in srednji vsebnosti etanola. Vsebnost polifenolov v ekstraktih se je večala z naraščanjem temperature ekstrakcije, a pod pogojem, da niso hkrati večali tudi tlaka ekstrakcije. Največ flavonoidov so izmerili pri uporabi 50-odstotnega etanola. Pri vseh testih se je najbolje izkazal izvleček, pridobljen pri 220 °C, 8 MPa in 63-odstotnem etanolu.

Luo in sod. (35) so s testi FC, DPPH in ABTS proučevali izvlečke SWE in HWE iz navadnega sirka (*Sorghum bicolor*). Pri obeh ekstrahiranjih so varirali čas (5–40 min) in razmerje med rastlinsko drogo in topilom (1 : 10 do 1 : 50 g/mL), pri SWE še temperaturo (110–190 °C), pri HWE pa je bila temperatura konstantna (95 °C). Optimalni pogoji ekstrakcije so bili 144,5 °C, 21 min in 35 mL/g. Ob primerjavi HW in SWE je imela SWE višje izplene polifenolov in antioksidativno aktivnost ekstraktov.

Vladić in sod. (36) so proučevali antioksidativno aktivnost izvlečkov iz korenin navadnega gabeza (*Symphytum officinale*). Pri SWE so varirali temperaturo (120–200 °C), čas ekstrakcije (10–30 min) in koncentracijo HCl kot sotopila (0–1,5 %) in ugotovili, da so optimalni pogoji 200 °C, 25,6 min in 0,0075 % HCl ob vrednotenju s testi FC, TFC in DPPH. Optimalna SWE je bila veliko bolj učinkovita kot ostale metode ekstrakcije z vidika antioksidativne aktivnosti in vsebnosti flavonoidov.

Jokić in sod. (37) so proučevali izvlečke SWE iz lupin kavovih semen (*Theobroma cacao*). Antioksidativno aktivnost so vrednotili s testoma DPPH in FC ter določili optimalne pogoje za ekstrakcijo pri 170 °C, 70 min in razmerju med topilom in drogo 20 : 1.

Dorosh in sod. (38) so primerjali antioksidativno aktivnost različnih ekstraktov SWE (50 min, 125 in 250 °C, razmerje med drogo in topilom 1 : 10) iz novih poganjkov vej (rozg) vinske trte (*Vitis vinifera*). Za vrednotenje so uporabili testa TFC in DPPH, test superoksidnega radikala aniona, test odstranjevanja vodikovega peroksida in test odstranjevanja hidroksilnih radikalov. Pri vseh antioksidativnih testih so opazili značilno razliko med ekstrakti, pridobljenimi pri temperaturah 125 °C in 250 °C, v korist višji temperaturi.

Nile in sod. (39) so proučevali ekstrakte vitanije (*Withania somnifera*). Antioksidativno aktivnost so vrednotili s testi FC, DPPH, FRAP in ABTS. SWE je pri vseh ekstrakcijskih parametrih (100–200 °C, 10–30 min) pokazala boljše izplene ekstrakcije in večjo antioksidativno aktivnost pridobljenih ekstraktov kot primerjalne metode (preglednica 1). Z metodo SWE so največji izplen ekstrakcije dosegli pri najvišji temperaturi (200 °C), antioksidativna aktivnost dobljenih ekstraktov pa je dosegla vrh pri 160 °C in nato začela padati.

6 SKLEP

Ekstrakcija s subkritično vodo je zagotovo ena izmed obetavnejših novih metod za pridobivanje rastlinskih antioksidantov. Poleg njene prednosti kot zelene tehnike k spodbujanju uporabe prispevajo tudi zanimive lastnosti vode v subkritičnem stanju, ki prispevajo k boljši ekstrakciji antioksidantov, hkrati pa višje temperature lahko povzročijo tako tvorbo novih produktov kot tudi razgradnjo že prisotnih produktov. Z vidika antioksidativne aktivnosti se moramo zavedati pomanjkljivosti antioksidativnih testov *in vitro*. Ti so sicer dobra začetna osnova za raziskovanje, ne moremo pa neposredno iz teh rezultatov sklepati na učinkovitost *in vivo*.

7 LITERATURA

1. Pečar S, Mravljak J. Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Slovensko farmacevtsko društvo; 2015. 176–183 p.
2. Gulcin I. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Vol. 94, Archives of Toxicology. Springer; 2020. p. 651–715.
3. Murphy MP, Bayir H, Belousov V, Chang CJ, Davies KJA, Davies MJ, et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. Nat Metab. 2022 Jun 27;4(6):651–62.
4. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press; 2015.
5. Chakraborty S, Shaik L, Gokhale JS. Subcritical Water: An Innovative Processing Technology. In: Innovative Food Processing Technologies. Elsevier; 2021. p. 552–66.
6. Knez Ž, Pantić M, Cör D, Novak Z, Knez Hrnčič M. Are supercritical fluids solvents for the future? Vol. 141, Chemical Engineering and Processing - Process Intensification. Elsevier B.V.; 2019. p. 107532.
7. Maroun RG, Rajha HN, El Darra N, El Kantar S, Chacar S, Debs E, et al. Emerging technologies for the extraction of polyphenols from natural sources. In: Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. Elsevier; 2018. p. 265–93.
8. Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. Vol. 109, Food and Bioprocess Technology. Institution of Chemical Engineers; 2018. p. 52–73.
9. Essien SO, Young B, Baroutian S. Recent advances in subcritical water and supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from plant materials. Vol. 97, Trends in Food Science and Technology. Elsevier Ltd; 2020. p. 156–69.



10. Schoss K, Kočevar Glavač N. Ekstrakcija s subkritično vodo za pridobivanje rastlinskih ekstraktov = Subcritical water extraction for the production of plant extracts. *Farm Vestn.* 2021;72(3):167–72.
11. Gilbert-López B, Plaza M, Mendiola JA, Ibáñez E, Herrero M. Subcritical Water Extraction and Neof ormation of Antioxidants. *Water Extr Bioact Compd From Plants to Drug Dev.* 2017;109–30.
12. Vlačić J, Jakovljević M, Molnar M, Vidović S, Tomić M, Drinić Z, et al. Valorization of yarrow (*Achillea millefolium* L.) by-product through application of subcritical water extraction. *Molecules.* 2020 Apr 1;25(8).
13. Benito-román Ó, Blanco B, Sanz MT, Beltrán S. Subcritical water extraction of phenolic compounds from onion skin wastes (*Allium cepa* cv. horcal): Effect of temperature and solvent properties. *Antioxidants.* 2020 Dec 1;9(12):1–20.
14. Cvetanović A, Zengin G, Zeković Z, Švarc-Gajić J, Ražić S, Damjanović A, et al. Comparative in vitro studies of the biological potential and chemical composition of stems, leaves and berries *Aronia melanocarpa*'s extracts obtained by subcritical water extraction. *Food Chem Toxicol.* 2018 Nov 1;121:458–66.
15. Švarc-Gajić J, Cerdà V, Clavijo S, Suárez R, Zengin G, Cvetanović A. Chemical and bioactivity screening of subcritical water extracts of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) stems. *J Pharm Biomed Anal.* 2019 Feb 5;164:353–9.
16. Pinto D, Vieira EF, Peixoto AF, Freire C, Freitas V, Costa P, et al. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology. *Food Chem.* 2021 Jan 1;334.
17. Pangestuti R, Haq M, Rahmadi P, Chun BS. Nutritional value and biofunctionalities of two edible green seaweeds (*Ulva lactuca* and *caulerpa racemosa*) from indonesia by subcritical water hydrolysis. *Mar Drugs.* 2021 Oct 1;19(10).
18. Getachew AT, Chun BS. Molecular modification of native coffee polysaccharide using subcritical water treatment: Structural characterization, antioxidant, and DNA protecting activities. *Int J Biol Macromol.* 2017 Jun 1;99:555–62.
19. Cvetanović A, Švarc-Gajić J, Zeković Z, Jerković J, Zengin G, Gašić U, et al. The influence of the extraction temperature on polyphenolic profiles and bioactivity of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) subcritical water extracts. *Food Chem.* 2019 Jan 15;271:328–37.
20. Cvetanović A, Švarc-Gajić J, Zeković Z, Gašić U, Tešić Ž, Zengin G, et al. Subcritical water extraction as a cutting edge technology for the extraction of bioactive compounds from chamomile: Influence of pressure on chemical composition and bioactivity of extracts. *Food Chem.* 2018 Nov 15;266:389–96.
21. Zakaria SM, Kamal SMM, Harun MR, Omar R, Siajam SI. Subcritical water technology for extraction of phenolic compounds from *Chlorella* sp. microalgae and assessment on its antioxidant activity. *Molecules.* 2017 Jul 1;22(7).
22. Kim DS, Lim S Bin. Semi-continuous subcritical water extraction of flavonoids from citrus unshiu peel: Their antioxidant and enzyme inhibitory activities. *Antioxidants.* 2020 Apr 1;9(5).
23. Kim DS, Kim MB, Lim S Bin. Enhancement of Phenolic Production and Antioxidant Activity from Buckwheat Leaves by Subcritical Water Extraction. *Prev Nutr Food Sci.* 2017 Dec 1;22(4):345–52.
24. Dzah CS, Duan Y, Zhang H, Ma H. Effects of pretreatment and type of hydrolysis on the composition, antioxidant potential and HepG2 cytotoxicity of bound polyphenols from Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* L. Gaerth) hulls. *Food Res Int.* 2021 Apr 1;142.
25. Dzah CS, Duan Y, Zhang H, Authur DA, Ma H. Ultrasound-, subcritical water- and ultrasound assisted subcritical water-derived Tartary buckwheat polyphenols show superior antioxidant activity and cytotoxicity in human liver carcinoma cells. *Food Res Int.* 2020 Nov 1;137.
26. Mašković PZ, Veličković V, Đurović S, Zeković Z, Radojković M, Cvetanović A, et al. Biological activity and chemical profile of *Lavatera thuringiaca* L. extracts obtained by different extraction approaches. *Phytomedicine.* 2018 Jan 15;38:118–24.
27. Wang Y, Luan G, Zhou W, Meng J, Wang H, Hu N, et al. Subcritical water extraction, UPLC-Triple-TOF/MS analysis and antioxidant activity of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. *Food Chem.* 2018 May 30;249:119–26.
28. Ko MJ, Nam HH, Chung MS. Subcritical water extraction of bioactive compounds from *Orostachys japonicus* A. Berger (*Crassulaceae*). *Sci Rep.* 2020 Dec 1;10(1).
29. Erşan S, Güçlü Üstündağ Ö, Carle R, Schweiggert RM. Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls. *Food Chem.* 2018 Jul 1;253:46–54.
30. Bodoira R, Velez A, Rovetto L, Ribotta P, Maestri D, Martínez M. Subcritical Fluid Extraction of Antioxidant Phenolic Compounds from Pistachio (*Pistacia vera* L.) Nuts: Experiments, Modeling, and Optimization. *J Food Sci.* 2019 May 1;84(5):963–70.
31. Ho TC, Chun BS. Extraction of Bioactive Compounds from *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. Using Subcritical Water and Conventional Solvents: A Comparison Study. *J Food Sci.* 2019 May 1;84(5):1201–7.
32. Cunha M, Lourenço A, Barreiros S, Paiva A, Simões P. Valorization of cork using subcritical water. *Molecules.* 2020 Oct 1;25(20).
33. Zhang J, Wen C, Chen M, Gu J, Zhou J, Duan Y, et al. Antioxidant activities of *Sagittaria sagittifolia* L. polysaccharides with subcritical water extraction. *Int J Biol Macromol.* 2019 Aug 1;134:172–9.
34. Bodoira R, Velez A, Andreatta AE, Martínez M, Maestri D. Extraction of bioactive compounds from sesame (*Sesamum indicum* L.) defatted seeds using water and ethanol under subcritical conditions. *Food Chem.* 2017 Dec 15;237:114–20.
35. Luo X, Cui J, Zhang H, Duan Y. Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from sorghum (*Sorghum bicolor* L.) bran and their biological activities. *Food Chem.* 2018 Oct 1;262:14–20.
36. Vlačić J, Nastic N, Stanojkovic T, Zizak Z, Cakarevic J, Popovic L, et al. Subcritical water for recovery of polyphenols from comfrey root and biological activities of extracts. *Acta Chim Slov.* 2019;66(2):473–83.
37. Jokić S, Gagić T, Knez E, Ubarić D, Kerget M. Separation of active compounds from food by-product (Cocoa Shell) using subcritical water extraction. *Molecules.* 2018;23(6).
38. Dorosh O, Moreira MM, Pinto D, Peixoto AF, Freire C, Costa P, et al. Polyphenolic Profiles of Vine-Canes (*Vitis vinifera*) SubcriticalWater Extracts. *Foods.* 2020 Jul 1;9(7).
39. Nile SH, Nile A, Gansukh E, Baskar V, Kai G. Subcritical water extraction of withanosides and withanolides from ashwagandha (*Withania somnifera* L.) and their biological activities. *Food Chem Toxicol.* 2019 Oct 1;132.