

## **Determinazione della capacità antiossidante integrale (IAC<sup>®</sup>) di formulazioni cosmetiche mediante fotochemiluminescenza (PCL)**

Ziosi, P.\*, Besco, E.\*\*\*, Vertuani S.\* Bortolotti, F.\*, Baratto, G.\*\*\*, Manfredini, S.\*  
\*Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Ferrara, Via Fossato di Mortara 17/19 44100 Ferrara; \*\*AmbrosiaLab s.r.l., Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Ferrara, Via Fossato di Mortara 17/19 44100 Ferrara; \*\*\*Uni.Far.Co s.r.l., San Gregorio nelle Alpi, Belluno.

Summary: Continuing our studies addressed to set-up new protocols for the evaluation of efficacy of antioxidant cosmeceuticals, we have developed a new methodology for the in vitro evaluation of antioxidants cosmetics preparations. To the best of our knowledge, the radical scavenging activity of antiaging formulations is usually evaluated and claimed only on the base of the analytical quantification of antioxidant ingredients by traditional methods. The limits of these determinations is the incapability to evaluate the real antioxidant potency of the whole formulation, that can change consistently in relation to the other ingredients and excipients. In this work we conducted a systematic study on different ascorbic acid containing formulations in order to determine the Integral Antioxidant Capacity (IAC<sup>®</sup>) and thus the eventual effect of bases ingredients on final potency of the formulation. Moreover, the variation of the antioxidant capacity in function of time and of ascorbic acid concentration was evaluated. These data were compared by measuring, in parallel, the degradation of vitamin C by HPLC. The results obtained show that the antioxidant capacity of the formulations tested change in function of the excipients and that the cosmetic base influence the entity of ascorbic acid degradation.

Key word: ascorbic acid, antioxidants, cosmetic formulations, in vitro evaluations, chemiluminescence

Riassunto: Nell'ambito delle nostre ricerche, volte a mettere a punto nuovi protocolli per la valutazione dell'efficacia funzionale di cosmeceutici antiossidanti, abbiamo sviluppato una nuova metodica per misurare in vitro la capacità antiossidante di formulazioni cosmetiche. Allo stato attuale delle nostre conoscenze, l'efficacia antiradicalica di una formulazione antiageing, viene generalmente vantata e valutata solo sulla base della determinazione analitica della concentrazione degli antiossidanti aggiunti mediante metodologie tradizionali. Il limite di questa determinazione è l'incapacità di valutare l'effettiva potenza antiossidante dell'intera formula, che può variare in modo consistente in funzione degli altri ingredienti ed eccipienti presenti. In questo lavoro è stato effettuato uno studio sistematico su diverse formulazioni contenenti acido ascorbico, al fine di valutare la IAC<sup>®</sup> (Capacità Antiossidante Integrale) e quindi l'eventuale effetto degli ingredienti di base sulla potenza finale della formulazione. Inoltre, è stata determinata la variazione della capacità antiossidante nel tempo ed al variare della concentrazione di acido ascorbico. Questi dati sono stati confrontati con quelli ottenuti misurando in parallelo la degradazione nel tempo della vitamina C, contenuta nelle corrispondenti emulsioni, mediante HPLC. I risultati ottenuti mostrano che la capacità antiossidante delle formulazioni considerate varia in funzione degli eccipienti cosmetici prescelti, e che la base cosmetica utilizzata può influenzare l'entità della degradazione dell'acido ascorbico.

### **INTRODUZIONE**

In ambito dermo-cosmetologico, l'applicazione di un composto dotato di proprietà antiossidanti, è solitamente destinata alla prevenzione ed al trattamento dei segni dell'invecchiamento cutaneo sia naturale che precoce. E' noto infatti che i radicali liberi svolgono un ruolo importante nel processo generale di invecchiamento cutaneo, poiché colpiscono e danneggiano vari tipi di biomolecole importanti per il funzionamento e la vita cellulare<sup>1</sup>.

Ad oggi, la potenzialità antiossidante di una formulazione antiageing, viene vantata mediante la determinazione della concentrazione degli antiossidanti presenti, utilizzando metodi analitici tradizionali, quali ad es. l'HPLC. Questo metodo di valutazione non tiene conto di una serie di variabili, ad es. di possibili interazioni tra gli ingredienti funzionali, e dalla presenza dei cosiddetti "ingredienti minori" (rispetto ai principi attivi) che compongono la formulazione. Poiché tutti gli ingredienti presenti in un prodotto cosmetico finito determinano l'efficacia antiossidante/antiageing, abbiamo sviluppato un nuovo protocollo per la valutazione strumentale della capacità antiossidante del prodotto cosmetico nel suo insieme, principi attivi ed eccipienti. Allo scopo, è stato effettuato uno studio sistematico di formulazioni contenenti acido ascorbico a concentrazioni crescenti. Tra i molteplici 'radical scavengers' utilizzati in campo cosmetico, abbiamo selezionato la vitamina C, poiché è considerata il più importante agente antiossidante presente nei fluidi intra ed extracellulari, ed è largamente impiegata per contrastare gli effetti dell'invecchiamento cutaneo, sia intrinseco che estrinseco. Al fine di valutare l'importanza degli ingredienti di base, sono state sviluppate due diverse emulsioni. Mentre nella prima, gli ingredienti sono stati scelti per il loro potenziale potere antiossidante, la seconda è stata formulata con componenti che non vantano questa capacità. Lo studio della capacità antiossidante è stato condotto utilizzando la tecnica della fotochemiluminescenza (PCL)<sup>2</sup>, metodologia che si basa sull'autossidazione fotoindotta del luminol. Per lo studio in oggetto è stata scelta la tecnica PCL non solo perché molto rapida (3 minuti) e sensibile (ordine delle nanomoli)<sup>3</sup>, ma soprattutto perché valuta il potere dei prodotti in esame di contrastare il radicale anione superossido ( $O_2^{\bullet-}$ )<sup>4</sup>, una delle specie ossigeno reattive (ROS) più dannose per l'uomo. Essa può inoltre essere condotta secondo due protocolli diversi, ACW (Antioxidant Capacity Watersoluble) ed ACL (Antioxidant Capacity Lipid-soluble), consentendo così di mettere in evidenza, per uno stesso prodotto, sia la capacità antiossidante della componente idrosolubile che di quella liposolubile. Per questo, abbiamo introdotto il concetto di Capacità Antiossidante Integrale (IAC<sup>®</sup>), intesa come la somma della capacità antiossidante degli ingredienti idrofili e liofili, presenti nelle diverse emulsioni, alle varie concentrazioni di ascorbico, espressa come nanomoli (nmol) di Trolox<sup>®</sup>, un potente analogo della vitamina E, utilizzato come standard di riferimento. Inoltre, al fine di determinare la shelf-life delle formulazioni considerate, è stata valutata la variazione della IAC<sup>®</sup> nel tempo ed al variare della concentrazione di acido ascorbico. Per completare lo studio, è stata condotta in parallelo un'analisi cromatografica mediante HPLC, per valutare la degradazione nel tempo della vitamina C presente nelle formulazioni in esame.

## MATERIALI E METODI

Lo studio è stato effettuato su due basi cosmetiche, A e B, ciascuna in tre diverse formulazioni a concentrazioni crescenti di acido ascorbico, che saranno di seguito indicate come A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> contenenti rispettivamente 0,5%, 1%, 1,5% dell'attivo (INCI: Ascorbic acid).

Le basi delle formulazioni cosmetiche testate sono:

Base A (formulata con emollienti, emulsionanti ed altri eccipienti che possono vantare proprietà antiossidanti)

INCI: Aqua, Glyceril Stearate, Glycerin, Cetearyl Alcohol, Buxus chinensis, Cyclomethicone, Persea gratissima oil, Limnanthes Alba, Decyl Olive Esters and Squalane, Rice wax, Potassium Palmitoyl Hydrolyzed Wheat Protein, PEG/PPG-20/6 Dimethicone, Xanthan Gum, Phenoxyethanol, Methylparaben, Butylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Parfum, Tocopherol, Phytic acid.

Base B (formulata con emollienti, emulsionanti ed altri eccipienti che non vantano proprietà antiossidante)

INCI: Aqua, Glyceril stearate, Hydrogenated Polyisobutene, Glycerin, Hydrogenated polydecene, Cyclopentasiloxane, Cetearyl Alcohol, Decyl oleate, Cetyl palmitate, Cetareth-20, Cetareth-12, Dimethicone, Phenoxyethanol, Methylparaben, Butylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Parfum, Disodium Edta, BHT.

*Studio di stabilità con HPLC:* In questo studio, le diverse formulazioni cosmetiche e le basi corrispondenti, sono state analizzate mediante cromatografia liquida, al fine di valutare la stabilità dell'acido ascorbico al tempo 0 (subito dopo la preparazione delle formulazioni), T1, T2 e T3, rispettivamente dopo 4, 8, 11 giorni di invecchiamento accelerato in stufa a 50°C.

Lo strumento è della JASCO, ed è costituito da una pompa reciprocante modello 880-PU. L'eluizione del campione è stata effettuata in condizioni isocratiche su una colonna a fase inversa, PINNACLE ODS NH<sub>2</sub>, RESTEK CORPORATION, USA. L'eluente è un tampone a pH 4,7 costituito da una miscela di acetato sodico 0,2 Mmol, EDTA 0,2 Mmol e Tetrabutylammoniofosfato 5 Mmol. A questa miscela è stato aggiunto il 5% di acetonitrile. Il flusso è stato ottenuto a 0,8 ml/minuto. Il detector è della Jasco modello 875-UV. Il dato è stato acquisito mediante il software CHEMSTATION della AGILENT.

*Determinazione della capacità antiossidante mediante fotochemiluminescenza (PCL):* In questo studio, è stata misurata la capacità antiossidante delle diverse emulsioni agli stessi tempi considerati nell'analisi HPLC, sempre dopo invecchiamento accelerato in stufa. Le due misurazioni sono state condotte in parallelo. La metodologia utilizzata è basata sulla fotochemiluminescenza (PCL), metodica che permette di valutare la capacità antiossidante sia di sostanze pure che di miscele complesse, mediante la costruzione di una retta di taratura con un antiossidante di riferimento. Nel nostro caso abbiamo utilizzato come riferimento il Trolox<sup>®</sup>, un potente analogo della vitamina E, esprimendo le potenze ottenute come nanomoli equivalenti, in attività antiossidante di Trolox<sup>®</sup>, per grammo di prodotto in esame.

Con il metodo PCL vengono accelerate le reazioni ossidative in vitro di circa 1000 volte rispetto alle condizioni normali, grazie alla presenza di un opportuno fotosensibilizzatore, consentendo misure in tempi molto rapidi.

Come precedentemente accennato, la PCL può essere condotta secondo due protocolli diversi, ACW ed ACL, che permettono di mettere in evidenza la capacità antiossidante della componente idrosolubile e liposolubile, rispettivamente. Infatti, nella componente idrosolubile, rientrano normalmente antiossidanti appartenenti alle famiglie dei flavonoidi, vitamina C, amminoacidi ecc. mentre nei liposolubili rientrano composti come tocoferoli, tocotrienoli, carotenoidi ecc.

In questo studio dovendo verificare il valore della capacità antiossidante di emulsioni cosmetiche, si è reso necessario introdurre un valore che consentisse di descrivere il contributo alla capacità antiossidante di entrambe le fasi, idrosolubile e liposolubile. Per questo, abbiamo proposto il concetto di Capacità Antiossidante Integrale (IAC<sup>®</sup>), intesa come la somma della capacità antiossidante della componente idrofila e lipofila, espresse come nanomoli di Trolox<sup>®</sup>/mg di crema, provviste di una attività equivalente a quella di un grammo del campione in oggetto.

Procedura generale per la preparazione dei campioni: Una quantità esattamente pesata di prodotto viene sospesa in 1 mL di metanolo, HPLC grade, in caso di antiossidanti liposolubili, o 1 mL di acqua, HPLC grade, per antiossidanti idrosolubili, e mescolata per 1 minuto in vortex a temperatura ambiente.

La soluzione così ottenuta viene filtrata con filtri per (Chemtek Analitica, Bologna) e diluita con Reagente 1 del kit ACL o ACW (AnalytikJena, Jena, Germany). Diverse diluizioni dei diversi campioni da 1:100 a 1:4 vengono valutate al fine di ricavare una curva di calibrazione. I risultati vengono espressi in nanomoli di Trolox, che forniscono una capacità antiossidante equivalente a un grammo del prodotto in esame.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Ad una prima valutazione, possiamo affermare che la capacità antiossidante delle formulazioni in esame, determinata mediante la metodica PCL, può variare in funzione della scelta degli eccipienti. Infatti, come mostrato in fig.1, il valore della capacità antiossidante della fase lipofila (ACL) della base A al T0, è di 11,4 nmoli di Trolox<sup>®</sup>, circa 10 volte maggiore rispetto al valore ACL del prodotto B. In considerazione del fatto che la capacità antiossidante dell'acido ascorbico può essere misurata sia con il protocollo ACL che ACW, abbiamo scelto, per valutare il comportamento nel tempo delle formulazioni in esame, di utilizzare come indice il solo valore ACL. Come si può osservare dai grafici, la riduzione del potere antiossidante per entrambe le basi A e B, è inizialmente minima (da T0 a T1), ma aumenta notevolmente nei tempi successivi. Questo dato è particolarmente significativo per la base B, il cui valore di ACL passa da 10,72 nmol di Trolox<sup>®</sup>/mg di crema (T1) a 0,144 (T3) (tab.1). E' stata effettuata anche la valutazione della capacità antiossidante del compartimento idrofilo (ACW) e A mostra un valore di ACW pari a 0.196 nmol Trolox/mg, mentre B presenta una capacità prossima allo zero. Il valore riscontrato per A è attribuibile alla presenza dell'acido fitico, inserito per le proprietà chelanti e antiossidanti.

I risultati relativi alla capacità antiossidante dei prodotti A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>, in funzione del tempo, e confrontati con la rispettiva base A, sono riportati in fig.2. Si può osservare che, come ci si poteva attendere, la capacità antiossidante aumenta proporzionalmente alla concentrazione di acido ascorbico (p<0,0001) e diminuisce in funzione del tempo. Analizzando i dati relativi ai valori di ACL (tab.1), si può notare inoltre, che la capacità antiossidante di A<sub>1</sub>, subisce un riduzione maggiore nel tempo rispetto all'ACL di A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>. Infatti, per es. da T0 a T1, il valore di ACL del prodotto A<sub>1</sub> da 26,28 nmol di Trolox<sup>®</sup>/mg di crema diminuisce a 10,91 (che corrisponde ad una riduzione di ACL del 58,48%, rispetto al 7,42% di A<sub>3</sub>).

Analogamente, al T3, la perdita della capacità antiossidante è sempre maggiore per A<sub>1</sub>, la cui ACL residua al T3 è 4,43 nmol, rispetto alle 62,68 nmol di A<sub>3</sub>, contenente vitamina C all'1,5%. In generale, si può affermare che la riduzione nel tempo della capacità antiossidante relativa al prodotto A, è inferiore nelle formulazioni a maggior contenuto di ascorbico. Questo risultato è paragonabile a quello riscontrato nei valori relativi alle basi A e B, in cui risulta evidente che la formulazione a maggior contenuto di ingredienti antiossidanti, presenta una riduzione di ACL molto inferiore. L'andamento del grafico relativo ai risultati dell'analisi PCL (sempre in riferimento al prodotto A, fig.2) è in linea con quelli ottenuti dall'analisi cromatografica. Infatti, con entrambe le metodiche si osserva una riduzione dell'ACL proporzionale alla riduzione della concentrazione di ascorbico (fig 4). I valori percentuali di acido ascorbico residui, ai vari tempi, evidenziano però che per il prodotto A<sub>1</sub> alla concentrazione più bassa (0,5%) la degradazione è rapida e totale (al T3 il recupero è nullo), mentre a quella più elevata (1,5%), la riduzione dell'attivo è molto più lenta, ed al T3 il recupero percentuale di vitamina C presente è ancora del 45,2% (tab.2). Alla luce di questo dato, possiamo ipotizzare che si verifichi un effetto protettivo nei confronti dell'attivo da parte degli eccipienti, a attività antiossidante presenti nella formulazione, e che tale effetto sia tanto più marcato quanto maggiore è la quantità di ascorbico introdotta nelle formulazioni<sup>5</sup>.

Per quanto riguarda i prodotti B, il grafico relativo ai dati ottenuti con la PCL (fig.5) evidenzia che, analogamente ad A, il valore di ACL aumenta all'aumentare della concentrazione di acido ascorbico ( $p < 0,0001$ ) e diminuisce nel tempo ma, a differenza di quanto si verifica per A, la riduzione non è correlabile al contenuto di attivo (tab1).

Generalizzando, da questo risultato possiamo desumere che in una formulazione priva di eccipienti a potenziale capacità antiradicalica, la stabilità della formulazione riferita alla capacità antiossidante, non è in relazione alla concentrazione di ascorbico. Ai fini di poter determinare la IAC<sup>®</sup>, per le formulazioni in esame, sono state parallelamente effettuate le misure in ACW al T0 per A e B (fig. 3 e 6). Analogamente a quanto precedentemente discusso per A, l'andamento dei valori ottenuti con la tecnica dell'HPLC, è confrontabile con quello ottenuto con la metodologia della fotochemiluminescenza (fig.7). Infatti, con entrambe le metodiche si osserva rispettivamente una riduzione della concentrazione di ascorbico e di ACL in funzione del tempo. Tuttavia, contrariamente a quanto osservato per A, nel caso delle formulazioni B, la degradazione della vitamina C è più lenta e il recupero percentuale maggiore nel prodotto B<sub>1</sub> (a concentrazione inferiore). Infatti, a T1 e T3, la quantità di attivo presente è ancora rispettivamente 83,4% e 43,8% (tab.2). A giustificazione di ciò, possiamo formulare un'ipotesi che necessita però di ulteriori conferme, e cioè che in questo tipo di formulazione, non potendo contare sull'effetto stabilizzante degli eccipienti antiossidanti, la degradazione dell'attivo aumenta laddove la concentrazione dell'ascorbico è maggiore.

## CONCLUSIONI

Lo scopo di questo lavoro era dimostrare che è l'approccio utilizzato dai metodi analitici tradizionali, ovvero valutare l'efficacia antiageing e la shelf-life di una formulazione cosmetica, sulla base della determinazione analitica della concentrazione dei soli funzionali antiossidanti aggiunti, non è sufficiente per garantire la qualità del prodotto finito e quindi la tutela del consumatore.

Tali metodi infatti, non tengono in considerazione gli eventuali effetti sinergici o probabili interazioni tra gli ingredienti che si verificano all'interno del prodotto finito, e che possono influire significativamente sulla capacità antiossidante dell'intera formulazione. Questo studio ha permesso di dimostrare quindi che:

- le proprietà antiossidanti del prodotto finito non dipendono esclusivamente dai soli ingredienti funzionali propriamente detti;
- la scelta degli ingredienti che compongono la base del prodotto cosmetico può influire significativamente sulla capacità antiradicalica della formulazione;
- non solo il tipo di formulazione (A/O, O/A, W/O/W etc.), il PH finale o le condizioni di stoccaggio<sup>6</sup>, ma anche la base cosmetica utilizzata può interferire con l'esplicazione della attività antiossidante dell'acido ascorbico;
- la valutazione della IAC<sup>®</sup>, da noi per primi introdotta, rappresenta un nuovo approccio alla misurazione della effettiva capacità antiossidante di prodotti cosmetici finiti, con importanti applicazioni nelle fasi di progettazione, sviluppo e caratterizzazione di una formulazione anti-età.

Ulteriori ricerche sono attualmente in corso per verificare il potere antiradicalico di agenti funzionali a claim anti-età (coenzima Q10, vitamina E, flavonoidi, ecc.), e per valutarne il comportamento nel cosmetico in condizioni d'uso. Inoltre, gli studi futuri sono orientati a confermare la validità predittiva di questo metodo nei confronti della oggettiva efficacia antiossidante in vivo.

## BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> Linton S, Davies MJ, Dean RT. Protein oxidation and ageing. *Exp Gerontol.* 36 (9): 1503-18, 2001
- <sup>2</sup> Popov, I.; Lewin, G. "Oxidants and Antioxidants Part B – Antioxidative homeostasis: characterization by means of chemiluminescent technique", *Methods in Enzymology*, , 300, 437-456, 1999.
- <sup>3</sup> Schlesier K, Harwat M, Bohm V, Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res* 36(2), 177-87, 2002
- <sup>4</sup> Popov I, Lewin G, Baehr R. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase, *Biomed Biochim Acta*, , 46, 775-779, 1987
- <sup>5</sup> P. Spiclin, M. Gasperlin \*, V. Kmetec. Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions *International Journal of Pharmaceutics* 222 271–279, 2001
- <sup>6</sup> Sheldon R Pinnell, Huanshu Yang, Mostafa Omar, Nancy Monteiro Riviere, Holly V. Debuys, Linda C Walker, Yaohui Wang, and Mark Levine. Topical L-Ascorbic acid: percutaneous Absorption Studies. *Dermatol Surg* 27:137-142, 2001

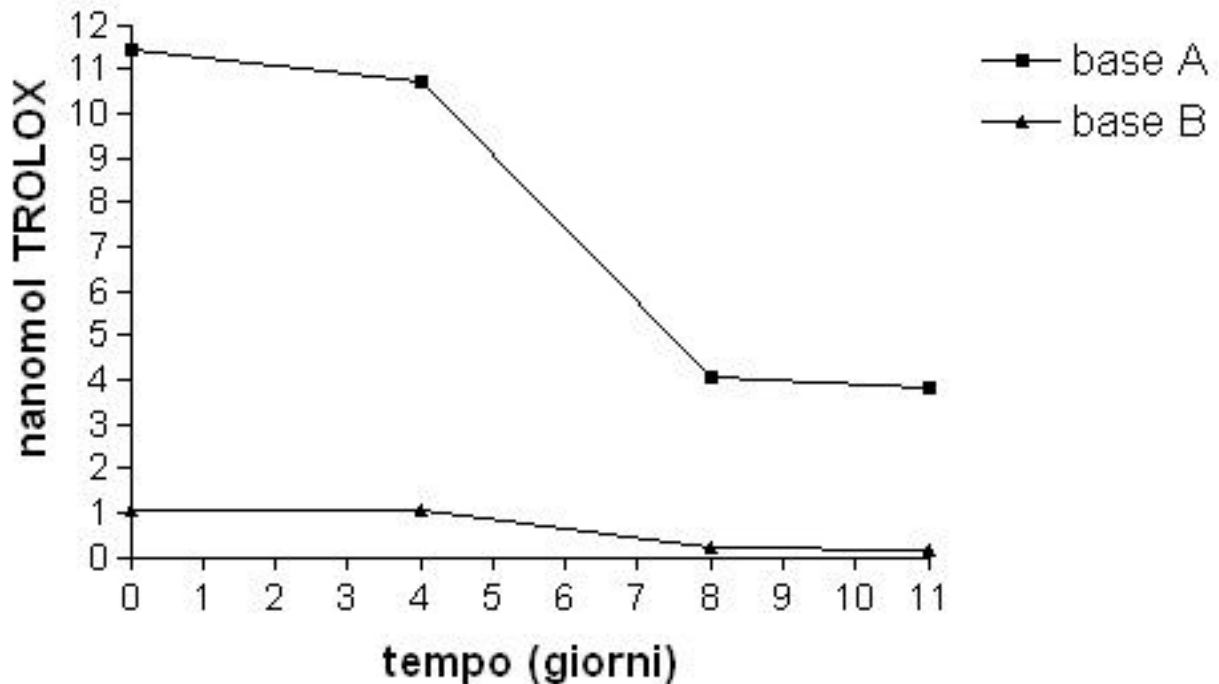


Fig.1. Valori della capacità antiossidante della fase lipofila (ACL) relativi alle basi A e B espressi in nanomoli di Trolox<sup>a</sup>/mg di crema

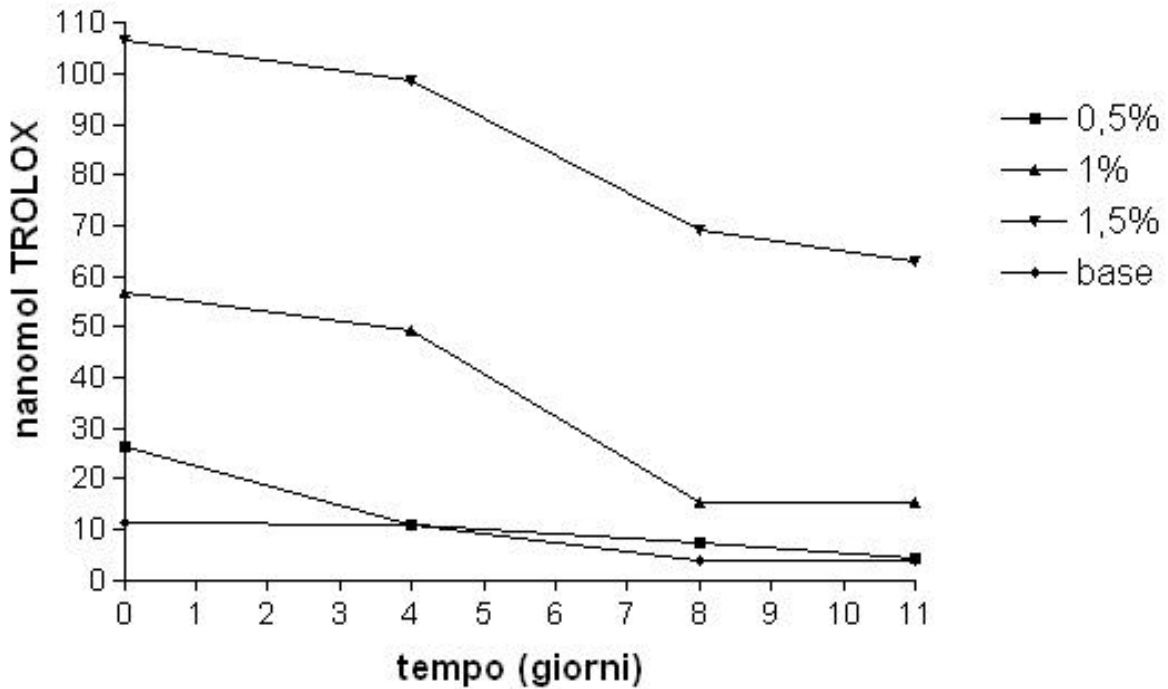


Fig.2. Valori della capacità antiossidante della fase lipofila (ACL) relativi alle formulazioni A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, confrontati con la rispettiva base, espressi in nanomoli di Trolox<sup>a</sup>/mg di crema

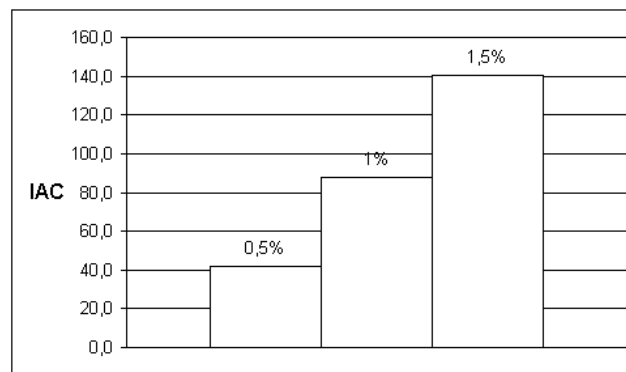


Fig.3. Valori relativi alla capacità antiossidante integrale (IAC®) relativi alle formulazioni A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, espressi in nanomoli di Trolox<sup>a</sup>/mg di crema

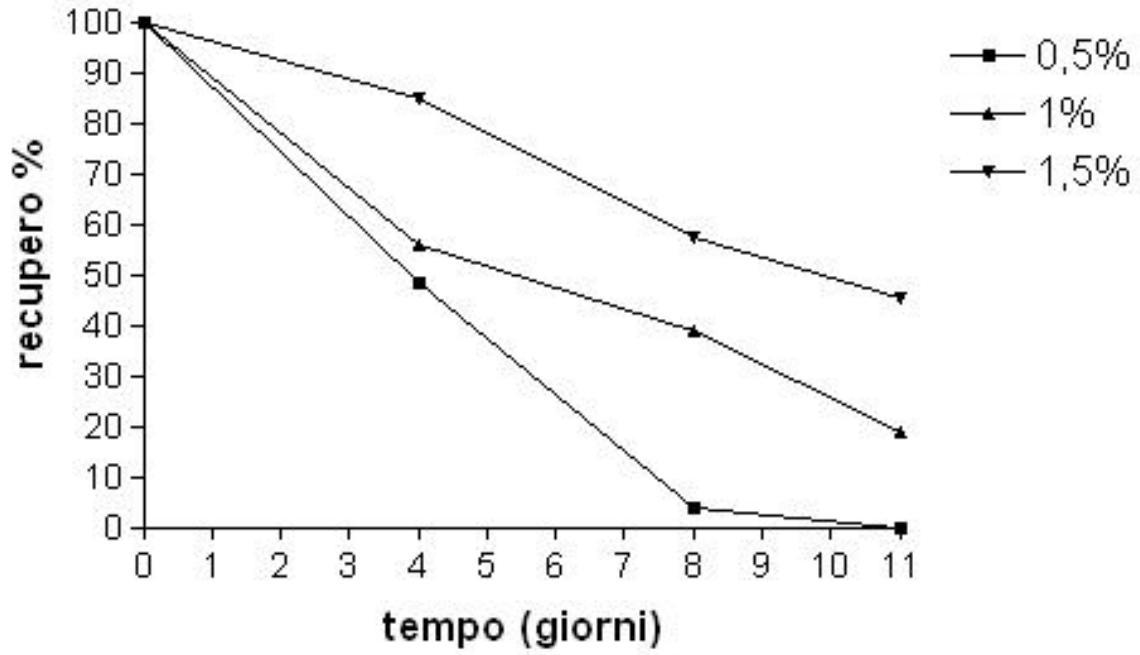


Fig.4 Valori relativi alla riduzione percentuale della concentrazione di acido ascorbico riferiti alle formulazioni A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>.

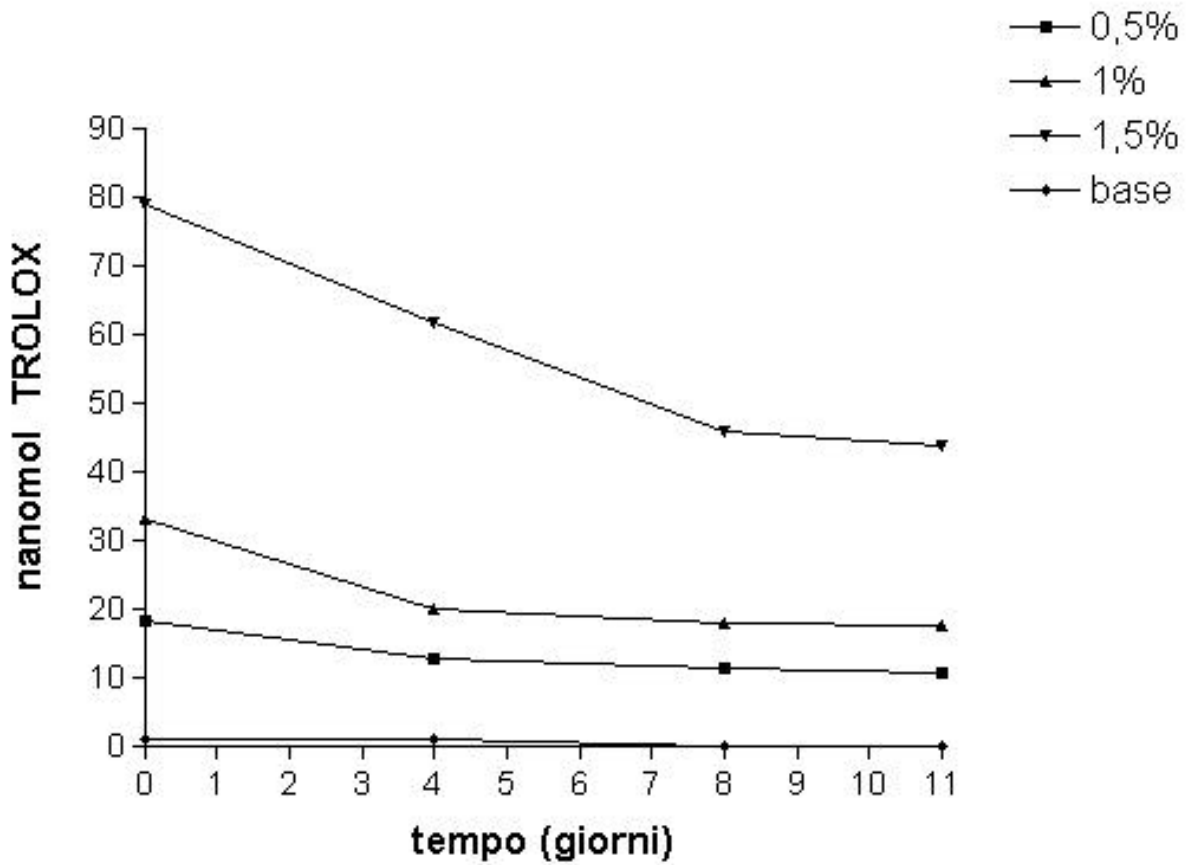


Fig.5. Valori della capacità antiossidante della fase lipofila (ACL) relativi alle formulazioni B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, confrontati con la rispettiva base, espressi in nanomoli di Trolox<sup>a</sup>/mg di crema

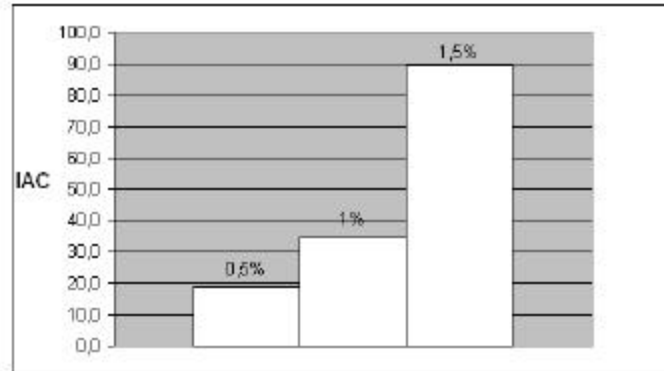


Fig.6. Valori relativi alla capacità antiossidante integrale(IAC®)relativi alle formulazioni B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> espressi in nanomoli di Trolox<sup>a</sup>/mg di crema

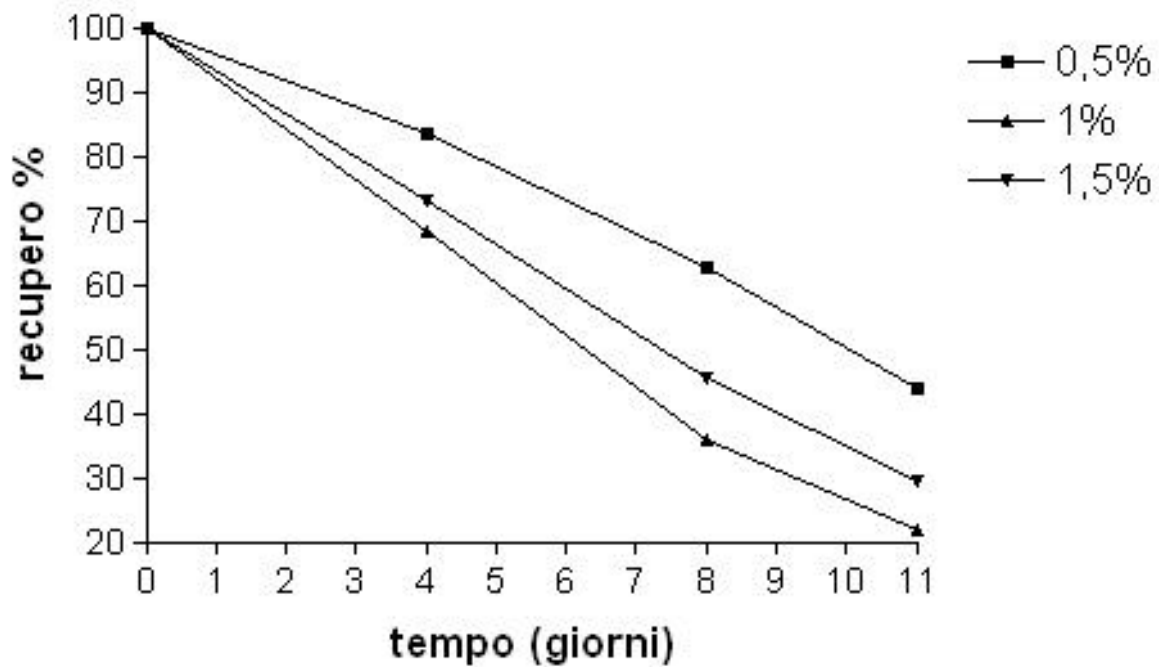


Fig.7 Valori relativi alla riduzione percentuale della concentrazione di acido ascorbico riferiti alle formulazioni B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>

<b>Tempo</b>	<b>Base A</b>	<b>Base B</b>	<b>Prodotto A</b>			<b>Prodotto B</b>		
			<b>A<sub>1</sub></b>	<b>A<sub>2</sub></b>	<b>A<sub>3</sub></b>	<b>B<sub>1</sub></b>	<b>B<sub>2</sub></b>	<b>B<sub>3</sub></b>
<b>T0</b>	11,44	1,067	26,28	56,82	106,64	18,17	33,31	79,13
<b>T1</b>	10,72	1,03	10,91	49,22	98,72	12,91	20,14	61,82
<b>T2</b>	4,03	0,20	7,38	30,08	69,23	11,56	18,1	45,99
<b>T3</b>	3,85	0,144	4,43	25,41	62,68	10,61	17,53	44,03

Tab.1. Dati relativi ai valori di ACL al tempo iniziale (T0) e dopo 4, 8, 11 giorni (T1,T2,T3) di ogni formulazione esaminata

<b>Tempo</b>	<b>Prodotto A % recuperi</b>			<b>Prodotto B % recuperi</b>		
	<b>A<sub>1</sub></b>	<b>A<sub>2</sub></b>	<b>A<sub>3</sub></b>	<b>B<sub>1</sub></b>	<b>B<sub>2</sub></b>	<b>B<sub>3</sub></b>
<b>T0</b>	100	100	100	100	100	100
<b>T1</b>	48,1	56,9	84,8	83,4	73	68,3
<b>T2</b>	3,7	39	57,4	62,5	45,5	35,9
<b>T3</b>	0	19,3	45,2	43,8	29,3	21,7

Tab.2. Dati relativi ai valori percentuali di acido ascorbico residui ai vari tempi e di tutte le formulazioni esaminate