(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 621 288**

(51) Int. CI.:

A61Q 17/04 (2006.01)
A61K 8/34 (2006.01)
A61K 8/37 (2006.01)
A61K 8/41 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01)
A61K 8/92 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2012 PCT/IB2012/053694**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO2013014584**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2012 E 12759212 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2736482**

(54) Título: **Composiciones de protección solar eco-compatibles**

(30) Prioridad:

27.07.2011 IT RM20110400

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2017

(73) Titular/es:

AETHIC LTD. (100.0%)
413-419 Harrow Road
LondonW9 3QJ, GB

(72) Inventor/es:

DANOVARO, ROBERTO;
DAMIANI, ELISABETTA y
CORINALDESI, CINZIA

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de protección solar eco-compatibles

La presente invención se refiere a composiciones de protección solar eco-compatibles, en particular a protecciones solares compatibles con el medio marino y la vida que habita en él, con referencia específica a los arrecifes de coral.

Estado de la técnica anterior

Los arrecifes de coral se encuentran entre los ecosistemas más biológicamente productivos y diversos del mundo, representando puntos calientes de biodiversidad marina, y manteniendo directamente a quinientos millones de personas (Moberg y Folke, 1999; Wilkinson, 2004). Aproximadamente el 60 % de los arrecifes de coral están actualmente amenazados por diversos impactos naturales y antropogénicos (Hughes y col., 2003; Pandolfi y col., 2003). Durante los últimos 20 años, el blanqueo de corales (pérdida de zooxantela simbiótica ubicada en corales escleractinios) ha aumentado de forma significativa, tanto en frecuencia como en extensión espacial (Hoegh-Guldberg, 1999; Hughes y col., 2003; Knowlton, 2001). Este fenómeno se ha asociado con anomalías de temperatura, exceso de radiación ultravioleta (UV) o disponibilidad alterada de radiación fotosintética, y presencia de agentes patógenos bacterianos y agentes contaminantes (Brown y col., 2000; Bruno y col., 2007; Douglas, 2003; Glynn, 1996; Jones, 2004).

La producción y el consumo de productos solares de cuidado personal y cosmética están aumentando en todo el mundo, con consecuencias potencialmente importantes relacionadas con la contaminación medioambiental. La liberación de estos productos también está unida a la rápida expansión del turismo en áreas de costa marina (Wilkinson, 2004). Los compuestos químicos contenidos en protectores solares y otros productos de cuidado personal pueden alcanzar niveles detectables en agua de mar (Daughton y Ternes, 1999; Giokas y col., 2007). Estos compuestos pueden ser potencialmente perjudiciales para el medioambiente; de ahí que el uso de productos de protección solar esté actualmente prohibido en algunos de los destinos turísticos más populares, como, por ejemplo, en parques ecológicos marinos de México (Xcaret, 2007; Xel-ha, 2007). Debido a que los protectores solares son lipófilos, sus filtros UV se pueden acumular en animales acuáticos (Giokas y col., 2007) y causar efectos similares a los indicados por otros compuestos xenobióticos (Balmer y col., 2005; Daughton y Ternes, 1999).

Los conservantes de parabeno y algunos absorbentes UV contenidos en protectores solares tienen actividad estrógena (Daughton y Ternes, 1999; Schumpf y col., 2004). Además, se ha demostrado que ingredientes de protección solar pueden experimentar varias fotodegradaciones, con la transformación implícita de esos agentes en subproductos tóxicos (Giokas y col., 2007, y bibliografía del mismo). También se ha demostrado que los protectores solares tienen un impacto en bacterias marinas (Danovaro y Corinaldesi, 2003). Recientemente se observó una estrecha relación entre protectores solares y blanqueo de corales duros a través de ensayos específicos en todo el mundo (Danovaro y col., 2008). En particular, en este estudio se han analizado los efectos perjudiciales sobre corales de algunos filtros UV usados en protectores solares y algunas composiciones de protección solar comercialmente disponibles.

Un producto fabricado por la empresa MyChelle es una composición de protección solar no tóxica segura para los arrecifes que comprende óxido de cinc como bloqueador solar.

El objeto de la presente invención es resolver los inconvenientes mencionados anteriormente proporcionando una composición de protección solar que sea eco-compatible con el ecosistema marino de los arrecifes de coral.

Sumario de la invención

Los protectores solares comercialmente disponibles comprenden una variedad de compuestos químicos, sintéticos y naturales, que son todos potencialmente perjudiciales para el medio marino de los arrecifes de coral. Los inventores han seleccionado sorprendentemente algunas sustancias que, tanto por sí solas como en combinación entre ellas, no causan perjuicio en este tipo de medio marino, pero de manera concomitante son altamente eficaces para proteger la piel frente a las radiaciones solares.

Por esto, el objeto de la presente invención es una composición de protección solar eco-compatible de acuerdo con la reivindicación 1.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: factores de enriquecimiento viral en agua que rodea *nubbins* de coral (“pequeñas ramificaciones con pólipos vivos”) en sistemas tratados y en sistemas de control (controles). Se muestran las diversas clases de tratamientos diferentes ensayados en: a) fragancias; b) cremas; c) antioxidantes; d) filtros UV; e) controles.

Figura 2: factores de enriquecimiento procariótico en agua que rodea *nubbins* de coral en sistemas tratados y de control. Se muestran las diversas clases de tratamientos diferentes ensayados en: a) fragancias; b) cremas; c) antioxidantes; d) filtros UV; e) controles.

Figura 3: zooxantela total liberada en agua que rodea *nubbins* durante el ensayo de incubación. Se muestran las diversas clases de tratamientos diferentes ensayados en: a) fragancias; b) cremas; c) antioxidantes; d) filtros UV; e) controles.

Figura 4: nivel de daño de zooxantela liberada después de adición de cremas de protección solar; c) antioxidantes; d) filtros UV; e) controles.

Figura 5: *nubbins* de coral en diferentes tiempos de incubación. Los paneles a y b muestran sistemas de control en tiempo 0 y después de 72 horas de incubación. Los paneles c y d muestran *nubbins* de corales tratados en tiempo 0 y después de 72 horas de incubación.

Figura 6: fotoestabilidad de filtros ensayados por rayos UV.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones de protección solar eco-compatibles con el ecosistema marino de arrecifes de coral.

En la presente descripción, con la definición “eco-compatible con el ecosistema marino” de los arrecifes de coral se indica un producto que no cause perjuicio o alteración a los organismos marinos o a las comunidades o hábitats en su totalidad. Un producto eco-compatible es, por lo tanto, útil sin restricciones, ya que protege la salud del medioambiente y la biodiversidad. En los ensayos indicados anteriormente, se verificaron las condiciones de salud de organismos marinos expuestos a los diversos componentes químicos para seleccionar los componentes absolutamente inocuos. Se ha de tener en cuenta que un producto biodegradable (declaración asociada a algunos productos comercializados) puede ser perjudicial para el medioambiente y por eso puede no ser eco-compatible, ya que el concepto de biodegradación se refiere únicamente a los tiempos de descomposición del compuesto.

Las composiciones de la presente invención comprenden:

- uno o más filtros UV seleccionados de MBBT, DHHB y EHT;
- uno o más antioxidantes seleccionados de acetato de tocoferilo, tocoferol, retinol, compuestos polifenólicos extraídos de té verde, y que no tienen conservantes que pertenecen a la familia de los parabenos.

En la presente descripción, “parabenos” significan los ésteres de ácido 4-hidroxibenzoico usados como conservantes en la industria de los cosméticos. Los parabenos más comunes son metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno.

Un ejemplo de polifenoles extraídos de té verde es polyphenone-60 (n.º de CAS 138988-88-2), comercialmente disponible de Sigma.

En una realización, las composiciones de la presente invención pueden comprender una o más fragancias eco-compatibles con el medio marino, seleccionadas del grupo que consiste en fragancias de naranja, lavanda, pomelo, guayaba y coco.

Ejemplos de fragancias adecuadas para la presente invención son las fragancias comercialmente disponibles de la empresa FAROTTI SRL, tales como guayaba y coco, lavanda natural, pomelo natural, preferiblemente en concentraciones iguales o inferiores al 0,3 % del producto.

Para incrementar los períodos de validez, en una realización las composiciones comprenden como conservante ácido sórbico, que, de acuerdo con el ensayo indicado en el presente documento, no demostró ser perjudicial para arrecifes de coral en conjunción con los otros compuestos.

Las composiciones se podían preparar en diferentes formas de cosméticos, tales como, por ejemplo, crema, loción, pomada, pulverización, barra de labios. Los filtros UV, antioxidantes, fragancias y conservantes seleccionados se podían mezclar con diferentes portadores adecuados (de acuerdo con los resultados de ensayos) para la forma de cosmético determinada que se quisiera fabricar.

Preferiblemente, se usarán portadores que tienen una función emoliente, seleccionados del grupo que consistente en dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, aceite de oliva, cera de abejas.

El dicaprilato/dicaprato de propilenglicol (número de CAS: 68583-51-7) es un derivado de propilenglicol, y es un diéster de propilenglicol y ácidos grasos. En particular, es una mezcla de dicaprilato de propilenglicol y dicaprato de propilenglicol. Este producto está comercialmente disponible con el nombre de Labrafac.

La cera de abejas (número de CAS 8012-89-3) adecuada para la presente invención está, por ejemplo, comercialmente disponible con el nombre de Apifil.

Los datos indicados en la sección experimental demuestran que los filtros MBBT, DHHB, los antioxidantes acetato de tocoferilo y tocoferol y la fragancia de guayaba y coco son los compuestos que tienen una mayor compatibilidad

con corales. Preferiblemente, las composiciones de la presente invención comprenderán, de ese modo, MBBT, DHHB, acetato de tocoferilo o tocoferol y opcionalmente la fragancia de guayaba y coco.

La presente invención se basa en la selección de compuestos adecuados para ser usados en composiciones para su uso como protectores solares compatibles con el medio marino y la vida que habita en él, con referencia particular a arrecifes de coral.

La mayoría de compuestos usados de manera común en protectores solares han demostrado ser perjudiciales para esos medios, compuestos tales como, por ejemplo:

- conservantes que pertenecen a la familia de los parabenos;
- derivados de ácido ascórbico;
- filtros UV seleccionados de bis etilhexiloxifenol metoxifenil triazina (BEMT), cinamatos, benzofenonas, derivados de alcanfor, óxido de titanio;
- fragancias seleccionadas de aceite esencial de melaleuca, extractos de flor ylang ylang, extractos de Bambousa Arundinacea, Karité;
- portadores seleccionados de grasas derivadas de animales;
- aceite de Argán.

En una realización, las composiciones de protección solar comprenden:

- uno o más filtros UV de 2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol, benzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]hexilo, etilhexil triazona;
- uno o más antioxidantes seleccionados de acetato de tocoferilo, tocoferol, retinol, compuestos polifenólicos extraídos de té verde;
- uno o más portadores seleccionados de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, aceite de oliva, cera de abejas

y están libres de:

- conservantes que pertenecen a la familia de los parabenos o derivados de ácido ascórbico;
- filtros UV seleccionados de bis etilhexiloxifenol metoxifenil triazina, cinamatos, benzofenonas, derivados de alcanfor, óxido de titanio;
- fragancias seleccionadas de aceite esencial de melaleuca, extractos de flor ylang ylang, extractos de Bambousa Arundinacea, Karité;
- portadores seleccionados de grasas derivadas de animales y aceite de Argán.

En una realización con una eco-compatibilidad muy alta, además comprenderán ácido sórbico y/o una o más fragancias seleccionadas de naranja, lavanda, pomelo, guayaba y coco.

En una realización con una eco-compatibilidad aún más alta, las composiciones consisten básicamente en:

- uno o más filtros UV de 2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol, benzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]hexilo, etilhexil triazona;
- uno o más antioxidantes seleccionados de acetato de tocoferilo, tocoferol, retinol, compuestos polifenólicos extraídos de té verde;
- uno o más portadores seleccionados de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, aceite de oliva, cera de abejas;
- agua.

En una realización con una eco-compatibilidad aún más alta, las composiciones consisten básicamente en:

- uno o más filtros UV de 2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol, benzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]hexilo, etilhexil triazona;
- uno o más antioxidantes seleccionados de acetato de tocoferilo, tocoferol, retinol, compuestos polifenólicos extraídos de té verde;
- ácido sórbico;
- uno o más portadores seleccionados de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, aceite de oliva, cera de abejas;
- agua.

En una realización adicional, las composiciones consisten básicamente en:

- 2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol y/o benzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]hexilo;
- acetato de tocoferilo y/o tocoferol;
- ácido sórbico;
- uno o más portadores seleccionados de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, aceite de oliva, cera de abejas;
- agua;

- una o más fragancias seleccionadas de naranja, lavanda, pomelo, guayaba y coco.

En una realización adicional, las composiciones consisten básicamente en:

- 2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol y/o benzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]hexilo;
- acetato de tocoferilo y/o tocoferol;
- ácido sórbico;
- uno o más portadores seleccionados de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, aceite de oliva, cera de abejas;
- agua;
- una o más fragancias seleccionadas de naranja, lavanda, pomelo, guayaba y coco;
- hidroxietilcelulosa y/o EDTA y/o hidróxido de sodio.

En una realización adicional, las composiciones consisten básicamente en:

- 2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol, benzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]hexilo y etilhexil triazona;
- acetato de tocoferilo;
- ácido sórbico;
- dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, aceite de oliva, cera de abejas;
- agua;
- hidroxietilcelulosa;
- EDTA;
- hidróxido de sodio.

Todas las realizaciones enunciadas anteriormente consisten exclusivamente en compuestos ensayados individualmente como una unidad para tener una eco-compatibilidad completa con el arrecife de coral y (sin necesidad de añadir otros compuestos potencialmente perjudiciales para el ecosistema marino) tienen una fotoestabilidad alta y un almacenaje prolongado en una formulación cosmética adecuada.

En las composiciones de la presente invención, el MBBT, DHHB y EHT podían aparecer en un porcentaje comprendido entre el 3 y el 6 % en peso de la composición.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos y no limitan la invención (por ejemplo, los pesos y las concentraciones son meramente indicativos, en cuanto a que los FPS y las proporciones de absorbancia UVA/UVB se deben formular específicamente para ajustarse a los FPS nominales del producto). Las cantidades de los compuestos individuales se expresan en porcentaje en peso.

Ejemplo 1: En una realización específica, la invención tiene la siguiente formulación en forma de crema:

Ingredientes	p/p
MBBT	4 %
DHHB	4 %
EHT	1 % 1%
APIFIL	12 %
LABRAFAC	15,5 %
Aceite de oliva	7 %
Acetato de tocoferilo	0,5 %
Hidroxietilcelulosa	0,2 %
EDTA	0,05 %
Hidróxido de sodio	0,4 %
Ácido sórbico	1 %
Guayaba y coco	0,3 %
H_2O	resto %

Ejemplo 2: En una realización específica, la invención tiene la siguiente formulación en forma de crema:

Ingredientes	p/p
MBBT	6 %
DHHB	6 %
EHT	2 %
APIFIL	12 %
LABRAFAC	14,5 %
Aceite de oliva	6 %
Acetato de tocoferilo	0,5 %
Hidroxietilcelulosa	0,2 %
EDTA	0,05 %
Hidróxido de sodio	0,4 %
Ácido sórbico	1 %
Lavanda	0,3 %
H_2O	resto %

Ejemplo 3: En una realización específica, la invención tiene la siguiente formulación en forma de crema:

Ingredientes	p/p
MBBT	8 %
DHHB	8 %
EHT	3 %
APIFIL	10 %
LABRAFAC	13,5 %
Aceite de oliva	5 %
Acetato de tocoferilo	0,5 %
Hidroxietilcelulosa	0,2 %
EDTA	0,05 %
Hidróxido de sodio	0,4 %
Ácido sórbico	1 %
Naranja	0,3 %
H_2O	resto %

Ejemplo 4: Preparación de las composiciones

Las composiciones se preparan mediante el procedimiento descrito a continuación:

Las fases 1 y 3, indicadas en la tabla 1 se disuelven juntas a 65 ºC usando un agitador.
La fase 2 se disuelve por separado a la misma temperatura, siempre bajo continua agitación. Tras alcanzar la misma temperatura, la fase 2 se añade a las fases 1+3 y se mezcla el conjunto durante unos minutos a 65 ºC. Para obtener un producto que tenga consistencia homogénea, se mezcla a temperatura ambiente y solo al final se añade la fase 4. Se realizó un ensayo de las tres composiciones preparadas de ese modo como se describe en la sección experimental de la presente descripción.

Tabla 1. Composición de las 3 preparaciones de los ejemplos 1, 2 y 3 que tienen un FPS diferente.

	Bajo	1 – FPS bajo	2 – FPS medio	3 – FPS alto
Fase 1	Apifil 13 %	Apifil 12 %	Apifil 11 %	Apifil 10 %
	Labrafac 18,5 %	Labrafac 15,5 %	Labrafac 14,5 %	Labrafac 13,5 %
	Aceite de oliva 8 %	Aceite de oliva 7 %	Aceite de oliva 6 %	Aceite de oliva 5 %
	Acetato de tocoferilo 0,5 %	Acetato de tocoferilo 0,5 %	Acetato de tocoferilo 0,5 %	Acetato de tocoferilo 0,5 %
		DHHB 4 %	DHHB 6 %	DHHB 8 %
		EHT 1 %	EHT 2 %	EHT 3 %
		MBBT 4 %	MBBT 6 %	MBBT 8 %
Fase 2	Agua 57,22	Agua 53,05 %	Agua 51,05 %	Agua 49,05 %
	Hidroxietilcelulosa 0,2 %	Hidroxietilcelulosa 0,2 %	Hidroxietilcelulosa 0,2 %	Hidroxietilcelulosa 0,2 %
	EDTA 0,05 %	EDTA 0,05 %	EDTA 0,05 %	EDTA 0,05 %
	Ácido sórbico 1 %	Ácido sórbico 1 %	Ácido sórbico 1 %	Ácido sórbico 1 %
Fase 3	Labrafac 1 %	Labrafac 1 %	Labrafac 1 %	Labrafac 1 %
	Hidróxido de sodio 0,4 %	Hidróxido de sodio 0,4 %	Hidróxido de sodio 0,4 %	Hidróxido de sodio 0,4 %
Fase 4	Fragancia 0,3 %	Fragancia 0,3 %	Fragancia 0,3 %	Fragancia 0,3 %

Metodología y datos experimentales

3.1. Área de estudio

Las actividades de campo se realizaron en el Laboratorio de biología marina de Onong Resort, Isla de Siladen, (Indonesia). El área de estudio se ubica en el Parque nacional de Bunaken, considerado una de las Áreas Marinas Protegidas más importantes del mundo. El Parque Nacional de Bunaken se ubica en el centro de un triángulo de biodiversidad de coral de construcción de arrecife, que abarca aproximadamente las Filipinas, Indonesia y la Gran Barrera de Coral. En total, se han registrado aproximadamente 605 especies de coral con zooxantela en el Triángulo de Coral (Veron y col., 2009), de las que el 66 % son comunes a todas las ecoregiones del área. Esta diversidad equivale al 76 % de las especies totales del mundo. Aproximadamente 450 especies de coral se han descrito hasta ahora en el archipiélago indonesio. El Parque Nacional de Bunaken y aguas adyacentes mantienen diversas comunidades de coral hermatípico (de construcción de arrecife), compuestas de más de 390 especies, 63 géneros y 15 familias de corales duros, incluyendo también algunas especies aún no descritas. Los corales forman diferentes tipos de comunidad, ampliamente distribuidas en relación a la profundidad, el ángulo de inclinación, y otros factores medioambientales. El área mantiene varias poblaciones regionalmente importantes de un amplio despliegue de especies de coral, incluyendo unas 20 especies consideradas raras en el mundo. El Parque Nacional de Bunaken exhibe niveles excepcionales de diversidad local. Las ubicaciones más ricas albergan más de 25 – 30 % de las especies de coral de construcción de arrecife de la región indo-pacífica total. En particular, en el área de estudio, exámenes recientes han indicado que los corales de construcción de arrecife representan aproximadamente el 90 % de las especies de coral totales, con una diversidad de coral más alta en aguas poco profundas, probablemente relacionado con la relativamente alta heterogeneidad del hábitat producida por cambios en el ángulo de inclinación, exposición e iluminación entre otros factores, desde la inclinación el arrecife de la parte poco profunda hasta la cresta del arrecife. En el área de estudio, se ha indicado recientemente la presencia de muchas especies endémicas del género *Acropora* (Wallace y col., 2001). *Acropora* representa uno de los mayores grupos taxonómicos de los arrecifes que rodean la Isla Siladen. *Acropora* es el género de coral hermatípico más diverso, con 114 especies reconocidas en el mundo y 91 especies identificadas en el archipiélago indonesio (Wallace, 1999). Las “especies estructurales” tales como *Acropora* con un componente vital para el ecosistema, y variaciones en su abundancia son críticas para la dinámica de todas las comunidades de arrecifes (Connell y col., 1997). *Acropora spp.* representa un papel fundamental en la composición y abundancia de las especies de muchos arrecifes indonesios actuales (Suharsono, 1992).

3.2. Diseño experimental

Los ensayos *in situ* se llevaron a cabo sobre *nubbins* (por ejemplo, pequeñas ramificaciones de aproximadamente 3-6 cm) del coral pedregoso *Acropora sp.* Los *nubbins* se incubaron en microcosmos en presencia de concentraciones

conocidas de varios ingredientes que probablemente se incluirían en la composición de la crema de protección solar eco-compatible. En particular, unos submarinistas recogieron *nubbins* de coral (incluyendo más de 3000 pólipos cada uno) de la misma colonia, ubicada a unos 3 m de profundidad en el borde de la inclinación del arrecife. El muestreo de los *nubbins* se llevó a cabo a través de fórceps. Los *nubbins* se lavaron con agua de mar filtrada en filtros de 0,02 µm para eliminar virus y organismos procarióticos. Cada microcosmo se preparó con un conjunto repetido de *nubbins* (n=3) sumergido en bolsas de polietileno estériles (Whirl-pack, Nasco, Fort Atkinson, WI, EE. UU.) rellenas con 2 L de agua de mar filtrada. Se prepararon un total de 27 microcosmos, para ensayar 20 ingredientes con los respectivos controles positivos y negativos. La lista de tratamientos, las concentraciones de compuestos usadas y los sistemas de control se indican en la tabla 2. Los microcosmos se incubaron a temperatura y condiciones de luz *in situ* durante 72 horas.

Tabla 2. Lista de microcosmos, tipos de tratamiento, concentraciones de composiciones usadas y tiempos de incubación.

Código	Compuesto	Concentración	Tipo
D-01	Fragancia natural de pomelo	0,3 %	Esencias/ Fragancias
D-02	Fragancia de aceite de árbol del té (*Melaleuca)*	0,3 %	
D-03	Fragancia ylang-ylang I	0,3 %	
D-04	Fragancia de naranja natural	0,3 %	
D-05	Fragancia de lavanda natural	0,3 %	
D-06	Aceite de argán	0,3 %	
D-07	Guayaba y coco 22661	0,3 %	
D-08	Bambú 21842	0,3 %	
D-09	Karité 20471	0,3 %	
D-10	*Mare d'inverno* 4/381 MC	0,3 %	
D-11	*Joyful* 60029MC	0,3 %	
D13	Crema base tipo 1	50 µL-1	Crema base
D14	Crema base tipo 2	50 µL-1	
D15	Crema base tipo 3	50 µL-1	
D-16	Alfa-tocoferol (código SIGMA T3251-5G)	3 %	Antioxidante
D-17	DL-tocoferol-acetato (código SIGMA T3376-5G)	3 %	
D-18	sal de trisodio de ácido 2-fosfo-ascórbico (código SIGMA 49752-10G)	3 %	
D-19	Palmitato de retinilo (código SIGMA R3375-1G)	3 %	
D-20	Retinol (código SIGMA R7632-250MG)	3 %	
D-21	Polifenol 60 de té verde (código SIGMA P1204-25G)	3 %	
D-22	MBBT (filtro)	7 %	Filtros
D-23	BEMT (filtro)	7 %	
D-24	EHT (filtro)	3 %	
D-25	DHHB (filtro)	7 %	
Mito	Mitomicina C (agente que induce el ciclo lítico en infecciones virales).	1 mg mL^{-1}	Sistemas de control
BLK	-		
BLK PG	PG		

Se usaron sistemas de control (controles) tanto positivos como negativos. Los negativos son sistemas en los que se ha usado una sustancia, el antibiótico mitomicina C, que desencadena infecciones virales, como ocurre con el uso de todas las cremas actualmente en el mercado. De ahí que sirva para indicar los niveles de respuesta indeseada de un compuesto. Los positivos, indicados por BLK PG y BLK, son simplemente microcosmos sin adición de ningún compuesto.

Tabla 3. Concentraciones de filtros ensayados

FILTROS	Concentración máx.	FPS bajo	FPS medio	FPS alto
MBBT	10 %	4	6	8
DHHB	10 %	4	6	8
EHT	5 %	1	2	3

3.3. Determinación de abundancias virales y procarióticas

Se recogieron submuestras (15 mL) de agua de mar que rodea *nubbins* de coral al principio del experimento (TO) y después de 3 y 6 horas de incubación. Después del submuestreo, el agua de mar se transfirió a tubos de ensayo estériles sin usar fijadores y se almacenó a -20 ºC hasta el análisis de laboratorio para cuantificación de abundancia viral y procariótica. Una vez en el laboratorio, las muestras de agua se procesaron inmediatamente. Brevemente,

200 µL de agua de mar se diluyeron 1:10 con agua MilliQ prefiltrada, por medio de filtros de poros de 0,02 µm (filtro Anodisc; 25-mm de diámetro, Al_2O_3; Whatman) y se tiñeron con 20 µL de SYBR Green (solución madre diluida 1:20; Invitrogen; Carlsbad, CA, (EE. UU.)). Los filtros se incubaron en la oscuridad durante 15 minutos y se montaron en placas de cristal con una gota de *antifade* consistente en un 50 % de solución reguladora de fosfato (6,7 mM, pH 7,8) y un 50 % de glicerol que contiene un 0,25 % de ácido ascórbico (Shibata y col., 2006; Helton y col., 2006; Wen y col., 2004). Las placas se almacenaron a -20 ºC hasta análisis de microscopía. Se obtuvieron conteos de virus y organismos procarióticos con microscopía epifluorescente (aumento x1000; Zeiss Axioplan) examinando al menos 10 campos ópticos, es decir, al menos 200 células o virus por repetición. El enriquecimiento viral (y procariótico) se calculó como proporción entre abundancias de virus (y procarióticas) y abundancia de virus (y procarióticas) al final del experimento.

3.4. Conteo de zooxantela

Se recogieron submuestras (50 mL) de agua de mar que rodea *nubbins* de coral al principio del experimento (TO) y después de 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas de incubación. Las submuestras se fijaron en un 3 % de glutaraldehído y después aproximadamente 6,0 ml de cada repetición se filtró a través de filtros de 2,0 µm de policarbonato. Los filtros se montaron en placas de cristal y la zooxantela se calculó en microscopía epifluorescente (Zeiss Axioplan, Carl Zeiss Inc., Jena, (Alemania); x 400 y x1000) usando luz estándar y UV. Según el color, autofluorescencia y estructura de ancho de célula, la zooxantela liberada o extraída de *nubbins* se clasificó como a) saludable (H, zooxantela de color marrón/amarillo brillante, intacta/en buenas condiciones); b) pálida (P, zooxantela de color amarillo claro, con vacuolas, parcialmente degradada; transparente (T, zooxantela sin pigmentación, vacía; Mise y Hidaka, 2003).

3.5. Cuantificación de blanqueo de coral

Para cuantificar los niveles de blanqueo de corales (Siebeck y col., 2006) se llevó a cabo un análisis colorimétrico con fotografías digitales de corales, tomadas al principio del experimento y después de 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas de incubación. Las fotografías se tomaron con un nivel de iluminación idéntico con una cámara digital Canon PowerShot A620 (Canon Inc., Tokio, Japón) con un medidor de escala en la superficie. Las fotos se analizaron satisfactoriamente con un software de edición de fotos (Adobe Photoshop CS2) para composición de color [cian, magenta, amarillo, negro (CMYK, por sus siglas en inglés)]. Los niveles de blanqueo se midieron como la diferencia entre el color de los corales al principio del experimento y después de tratamientos. Se analizaron variaciones en el porcentaje de diferentes componentes de los colores (CMYK) con un análisis de varianza (ANOVA). Para categorizar el efecto de blanqueo debido a los compuestos ensayados, se preparó una matriz de similaridad Bray-Curtis y se llevó a cabo un análisis de escala multidimensional de los cambios en la composición de color CMYK de corales tratados usando un software Primer 5.0 (Primer-E Ltd., Plymouth, (RU)). Se midieron los índices de blanqueo como el porcentaje de disimilaridad en la composición de colores CMYK entre corales tratados y corales de control usando la herramienta SIMPER del software Primer 5.0 (Primer-E Ltd.).

4. Resultados

4.1. Abundancia viral y procariótica

Las abundancias virales incrementaron significativamente alrededor de 1 orden de magnitud durante los experimentos de incubación. El enriquecimiento viral varió de 1,9 a 37,4 en los sistemas BLK PG y D08 (figura 1). Las abundancias virales al final del experimento variaron de 0,44 a 31,2 x 10^5 virus ml^{-1} en sistemas BLK PG y D15, respectivamente. Las abundancias procarióticas incrementaron de 1-2 órdenes de magnitud durante el experimento de incubación. Los factores de enriquecimiento procariótico fluctuaron en un amplio intervalo (figura 2). El factor de enriquecimiento más bajo (1,88) se observó en el sistema BLK PG, mientras que, en el sistema D11, el factor de enriquecimiento era 78,16. Se observó una leve reducción de proporciones entre abundancia viral y procariótica (VPR) después de incubaciones en todos los sistemas, con la excepción de los sistemas D07 y BLK, en los que el VPR permaneció estable en el tiempo. El VPR disminuyó hasta 10 veces en el sistema D22.

4.2. Abundancia de zooxantela

Al principio de las incubaciones, en los microcosmos no se encontró zooxantela liberada. El número de zooxantela aumentó con el tiempo en todos los microcosmos considerados. La abundancia final de zooxantela encontrada en agua que rodea los *nubbins* de coral varió de 0,85 a 4,45 x 10^4 células ml^{-1}, respectivamente en sistemas D11 (inoculado con *Joyful* 60029MC) y D18 (inoculado con sal de trisodio de ácido 2-fosfo-L-ascórbico), (figuras 3a, b, c, d, e).

En algunos casos, la abundancia de zooxantela liberada era menor en sistemas tratados que en controles. Análisis estadísticos revelaron que solo en el caso de los sistemas D15, D16, D17 y D18 la abundancia de células liberadas era significativamente mayor que en el sistema BLK ($P<0,01$). Para todos los demás compuestos, no se encontraron diferencias significativas entre sistemas de control y tratados, sugiriendo que la presencia de compuestos ensayados en los sistemas experimentales (con la excepción de D15, D16, D17 y D18) no causa un incremento en el índice de

zooxantela liberada de corales.

Durante análisis con microscopio, la zooxantela observada se separó en tres grupos principales (saludable, pálido y transparente) como se describe en la sección de materiales y procedimientos. Al final de las incubaciones, cada grupo exhibió diferentes abundancias en el agua que rodeaba los *nubbins* de coral (figura 4). Los grupos de zooxantela pálida y transparente eran, en todos los sistemas experimentales, los grupos dominantes, representando de media un 44 % y un 50 % de zooxantela liberada total. La zooxantela saludable siempre representaba la fracción menor, variando del 0 al 21 %.

La baja abundancia de células saludables sugiere que el tiempo de incubación de los experimentos causa un nivel alto de daño a la zooxantela en todos los sistemas considerados, incluidos controles negativos (BLK).

4.3. Blanqueo de coral

En todas las repeticiones de cada microcosmo (incluidos sistemas de control), la liberación de mucosa de coral (compuesta por zooxantela y tejido de coral) se observó en las primeras 48 h de incubación. Esta observación está en línea con los resultados de zooxantela indicados en la sección 4.2. La liberación de mucosa por fragmentos de coral se puede relacionar con la presión mecánica ejercida durante el muestreo y la preparación de microcosmos. En todos los microcosmos (incluidos sistemas BLK) después de 72 horas de incubación se observó un leve cambio de color en *nubbins* de coral, probablemente ocurrido como consecuencia de la presión inducida por las incubaciones. Los cambios más evidentes se observaron en sistemas D18 y MITO, en los que los 4 canales de color se alteraron significativamente al final de las incubaciones. En sistemas D05, D08 y BLK PG, 3 de 4 canales de color mostraron alteraciones. En los demás sistemas, 2 o 1 canales de color mostraron cambios significativos. Los sistemas D03, D09, D10, D11, D21, D21 mostraron cambios en 2 canales de color, mientras que los sistemas D01, D04, D05, D13, D14, D19, D20 y BLK mostraron cambios solo en 1 canal de color. En los demás sistemas experimentales, no se detectaron cabios de color en *nubbins* en los que se llevaron a cambio ensayo.

4.4. Fotoestabilidad de crema de protección solar expuesta a rayos UVA (~ 275 kJ/m^2)

Se distribuyeron 2 mg cm^{-2} de crema en placas de cristal (5 x 5 cm) y se expusieron a rayos UVA.

- Absorbancia UVA, 320-400 nm (pico correspondiente al filtro DHHB) es demasiado alta con respecto a la de UVB, 290-320 nm (pico correspondiente al filtro EHT). La absorbancia UVA debería ser de aproximadamente 1/3 de la de UVB.
- El espectro del filtro de amplio espectro, MBBT, no es visible, ya que tiene un coeficiente de extinción inferior a DHHB y EHT, de ahí que se cubra con la absorbancia del último. MBBT debería aparecer como un amplio espectro sin picos máximos y mínimos.
- En este momento, la absorbancia obtenida cae dentro del intervalo de una crema de protección solar con FPS ato y bajo.
- De acuerdo con los resultados, se puede concluir que los filtros son altamente fotoestables.

4.5. Resumen de criterios usados para probar la eco-compatibilidad de productos ensayados con arrecifes de coral

Para seleccionar los productos más eco-compatibles para cada grupo de compuestos (por ejemplo, crema base, fragancia, antioxidantes y filtros), se seleccionaron los siguientes criterios:

1. nivel de blanqueo de coral;
2. grado de liberación de zooxantela simbiótica;
3. condiciones de salud de zooxantela;
4. enriquecimiento viral en el medio de incubación con respecto a los controles.

Tabla 4. Resumen de compuestos eco-compatibles agrupados por categoría.

Grupo de compuestos	Ingredientes	Eco-compatibilidad
Crema base	Tipo 1	Altamente compatible
	Tipo 2	Compatible
	Tipo 3	Compatible
Fragancias	Guayaba & Coco	Altamente compatible
	Naranja	Compatible
	Lavanda	Compatible
	Pomelo	Compatible
Antioxidantes	Acetato de tocoferilo	Altamente compatible
	Tocoferol	Altamente compatible

Grupo de compuestos	Ingredientes	Eco-compatibilidad
	Retinol	Compatible
	Polifenone-60	Compatible
	Palmitato de retinilo	Compatible
Filtros UV	MBBT	Altamente compatible
	DHHB	Altamente compatible
	EHT	Compatible

Tabla 5. Abundancia y enriquecimiento viral durante las incubaciones. Tiempos de incubación (Incub.), abundancias virales totales (TVN) y el factor de enriquecimiento viral (VEF) también se indican. Se indican los valores de desviación estándar (STD) y coeficientes de variación para todos los datos.

Sistema	Incub.	TVN	STD	CV	VEF	STD
D01	0	9,50E+04	2,69E+04	2,83E+01	19,62	2,00
	12 h	1,83E+06	3,39E+05	1,85E+01		
D02	0	8,13E+04	2,11E+04	2,60E+01	19,87	4,43
	12 h	1,57E+06	3,34E+05	2,12E+01		
D03	0	9,82E+04	2,19E+04	2,23E+01	15,48	0,81
	12 h	1,51E+06	2,99E+05	1,98E+01		
D04	0	1,71E+05	3,08E+04	1,80E+01	11,01	0,80
	12 h	1,87E+06	2,18E+05	1,17E+01		
D05	0	9,74E+04	1,94E+04	1,99E+01	12,44	2,28
	12 h	1,20E+06	2,29E+05	1,92E+01		
D06	0	1,14E+05	2,67E+04	2,34E+01	9,37	4,06
	12 h	1,02E+06	3,88E+05	3,79E+01		
D07	0	2,81E+05	2,48E+04	8,82E+00	8,50	1,08
	12 h	2,38E+06	3,09E+05	1,30E+01		
D08	0	7,49E+04	2,30E+04	3,08E+01	37,39	13,49
	12 h	2,60E+06	1,45E+05	5,58E+00		
D09	0	3,56E+05	6,28E+04	1,77E+01	5,55	0,93
	12 h	1,94E+06	1,96E+05	1,01E+01		
D10	0	2,20E+05	5,34E+04	2,43E+01	7,18	1,80
	12 h	1,52E+06	1,31E+05	8,58E+00		
D11	0	1,14E+05	5,77E+04	5,08E+01	30,89	14,56
	12 h	2,95E+06	5,30E+05	1,80E+01		
D13	0	1,34E+05	3,42E+04	2,56E+01	14,29	2,60
	12 h	1,87E+06	4,29E+05	2,29E+01		
D14	0	2,35E+05	5,20E+04	2,21E+01	11,03	6,65
	12 h	2,36E+06	1,03E+06	4,35E+01		
D15	0	3,79E+05	8,90E+04	2,35E+01	8,21	0,28
	12 h	3,12E+06	7,64E+05	2,45E+01		
D16	0	3,24E+05	7,97E+04	2,46E+01	4,54	0,48
	12 h	1,46E+06	2,87E+05	1,97E+01		
D17	0	3,49E+05	6,79E+04	1,94E+01	8,36	2,46

Sistema	Incub.	TVN	STD	CV	VEF	STD
	12 h	2,83E+06	6,23E+05	2,20E+01		
D18	0	3,70E+05	5,71E+04	1,55E+01	7,09	3,00
	12 h	2,51E+06	6,73E+05	2,69E+01		
D19	0	1,03E+05	1,37E+04	1,33E+01	18,92	4,43
	12 h	1,98E+06	6,60E+05	3,33E+01		
D20	0	2,47E+05	7,76E+04	3,14E+01	8,09	1,18
	12 h	1,97E+06	4,92E+05	2,50E+01		
D21	0	3,23E+05	9,01E+04	2,79E+01	8,56	3,32
	12 h	2,57E+06	1,94E+05	7,54E+00		
D22	0	5,06E+05	1,12E+05	2,21E+01	6,16	1,77
	12 h	2,99E+06	3,50E+05	1,17E+01		
D23	0	1,87E+05	3,30E+04	1,77E+01	4,80	2,60
	12 h	8,65E+05	3,77E+05	4,36E+01		
D24	0	9,58E+04	3,38E+04	3,53E+01	12,58	5,97
	12 h	1,08E+06	1,96E+05	1,81E+01		
D25	0	3,67E+05	8,46E+04	2,30E+01	7,44	1,79
	12 h	2,63E+06	8,45E+04	3,21E+00		
MITO	0	1,11E+05	2,20E+04	1,98E+01	14,33	4,09
	12 h	1,53E+06	1,45E+05	9,46E+00		
BLK	0	2,03E+04	3,61E+03	1,78E+01	3,68	1,62
	12 h	4,45E+04	4,01E+04	9,00E+01		
BLK PG	0	2,42E+04	4,26E+03	1,76E+01	1,88	0,64
	12 h	4,37E+04	8,06E+03	1,84E+01		

Tabla 6. Abundancia de bacterias (número de bacterias total, TBN) durante incubaciones, y desviaciones estándar y coeficiente de variación relacionados.

Sistema	Incubación	TBN	STD	CV
D01	0	1,93E+04	3,42E+03	1,77E+01
	12 h	1,21E+06	1,66E+05	1,37E+01
D02	0	2,17E+04	6,39E+03	2,94E+01
	12 h	8,48E+05	1,42E+05	1,67E+01
D03	0	3,14E+04	4,83E+03	1,54E+01
	12 h	9,20E+05	1,04E+05	1,13E+01
D04	0	3,54E+04	1,09E+04	3,07E+01
	12 h	8,43E+05	9,84E+04	1,17E+01
D05	0	7,25E+03	2,42E+03	3,33E+01
	12 h	3,19E+05	2,59E+04	8,10E+00
D06	0	3,94E+04	5,03E+03	1,27E+01
	12 h	4,99E+05	5,03E+04	1,01E+01
D07	0	2,74E+04	7,76E+03	2,84E+01

Sistema	Incubación	TBN	STD	CV
	12 h	1,11E+06	2,42E+05	2,18E+01
D08	0	4,75E+04	2,79E+03	5,87E+00
	12 h	1,22E+06	2,74E+05	2,25E+01
D09	0	2,58E+04	1,39E+03	5,41E+00
	12 h	1,18E+06	1,87E+05	1,58E+01
D10	0	1,69E+04	2,42E+03	1,43E+01
	12 h	9,74E+05	1,12E+05	1,15E+01
D11	0	2,50E+04	6,08E+03	2,44E+01
	12 h	1,88E+06	2,83E+05	1,50E+01
D13	0	2,82E+04	6,08E+03	2,16E+01
	12 h	1,35E+06	1,73E+05	1,28E+01
D14	0	4,67E+04	3,69E+03	7,90E+00
	12 h	1,92E+06	3,52E+05	1,83E+01
D15	0	2,01E+04	5,03E+03	2,50E+01
	12 h	1,05E+06	2,11E+05	2,02E+01
D16	0	3,78E+04	1,01E+04	2,66E+01
	12 h	1,18E+06	2,51E+04	2,13E+00
D17	0	5,80E+04	1,05E+04	1,82E+01
	12 h	1,42E+06	3,82E+05	2,70E+01
D18	0	3,86E+04	6,39E+03	1,65E+01
	12 h	1,39E+06	1,22E+05	8,73E+00
D19	0	3,62E+04	1,45E+04	4,00E+01
	12 h	1,54E+06	1,58E+05	1,02E+01
D20	0	3,62E+04	9,66E+03	2,67E+01
	12 h	1,71E+06	4,32E+05	2,53E+01
D21	0	3,06E+04	6,08E+03	1,99E+01
	12 h	1,57E+06	1,99E+05	1,27E+01
D22	0	5,47E+04	9,14E+03	1,67E+01
	12 h	9,18E+05	2,90E+05	3,16E+01
D23	0	4,67E+04	3,69E+03	7,90E+00
	12 h	2,03E+06	3,31E+05	1,63E+01
D24	0	2,09E+04	3,69E+03	1,76E+01
	12 h	7,41E+05	2,13E+05	2,87E+01
D25	0	3,67E+05	8,46E+04	2,30E+01
	12 h	2,63E+06	8,45E+04	3,21E+00
MITO	0	1,11E+05	2,20E+04	1,98E+01
	12 h	1,53E+06	1,45E+05	9,46E+00
BLK	0	2,03E+04	3,61E+03	1,78E+01
	12 h	4,45E+04	4,01E+04	9,00E+01

Sistema	Incubación	TBN	STD	CV
BLK PG	0	2,42E+04	4,26E+03	1,76E+01
	12 h	4,37E+04	8,06E+03	1,84E+01

Tabla 7. Número de zooxantela (en células ml^{-1}) saludable, pálida y transparente (es decir, muerta) liberada en cada microcosmo.

Sistemas	Total	STD	CV	Saludable	STD	CV	Pálida	STD	CV	Transparente	STD	CV
D01	1,16E+04	2,93E+03	25,3	1,41E+03	9,22E+02	65,5	6,78E+03	9,51E+02	14,0	3,42E+03	1,07E+03	31,1
D02	1,81E+04	2,51E+03	13,9	3,35E+02	1,16E+02	34,6	6,11E+03	4,19E+02	6,9	1,17E+04	2,82E+03	24,1
D03	1,56E+04	2,92E+03	18,7	7,04E+02	1,42E+02	20,2	9,73E+03	2,62 E+03	26,9	5,43E+03	2,01E+02	3,7
D04	1,28E+04	5,81 E+02	4,5	2,68E+03	9,08E+02	33,8	5,90E+03	1,11E+03	18,8	4,23E+03	1,22E+03	29,0
D05	1,03E+04	1,45 E+03	14,1	2,01E+02	0,00E+00	0,0	2,62E+03	7,26E+02	27,7	7,51E+03	8,13E+02	10,8
D06	1,81E+04	3,12E+03	17,2	6,04E+02	4,03E+02	66,7	8,45E+03	1,84E+03	21,8	9,06E+03	1,22E+03	13,5
D07	1,15E+04	7,26E+02	6,3	8,72E+02	2,32E+02	26,6	4,63E+03	1,01E+03	21,7	5,97E+03	3,07E+02	5,1
D08	1,44E+04	2,13E+03	14,8	9,39E+02	2,32E+02	24,7	4,90E+03	7,07E+02	14,4	8,59E+03	1,21E+03	14,1
D09	1,31E+04	6,97E+02	5,3	1,34E+03	3,07E+02	22,9	1,18E+04	1,80E+03	15,3	4,03E+02	O,OOE+00	0,0
D10	1,38E+04	4,65E+02	3,4	1,74E+03	3,07E+02	17,6	5,43 E+03	1,01E+03	18,5	6,57E+03	8,13E+02	12,4
D11	8,45E+03	1,98E+03	23,4	2,01E+02	0,00E+00	0,0	2,88E+03	1,23E+03	42,6	5,43E+03	7,26E+02	13,4
D12	1,18E+04	6,47E+02	5,5	6,71E+01	1,16E+02	173,2	5,64E+03	7,26E+02	12,9	6,11E+03	6,47E+02	10,6
D13	1,71E+04	2,82E+03	16,5	6,71E+02	3,07E+02	45,8	6,31E+03	1,83E+03	29,0	1,01E+04	1,37E+03	13,5
D14	2,22E+04	1,82E+03	8,2	2,42E+03	6,04E+02	25,0	6,84E+03	1,07E+03	15,6	1,29E+04	1,31E+03	10,1
D15	2,48E+04	3,39E+03	13,7	1,07E+03	3,07E+02	28,6	9,33E+03	1,86E+03	19,9	1,44E+04	2,62E+03	18,2
D16	2,67E+04	1,74E+03	6,5	4,09E+03	6,47E+02	15,8	1,25E+04	1,91E+03	15,2	1,01E+04	4,03E+02	4,0
D17	4,45E+04	8,77E+02	2,0	1,48E+03	4,19E+02	28,4	1,88E+04	1,56E+03	8,3	2,42E+04	1,98E+03	8,2
D18	2,11E+04	1,34E+03	6,4	1,14E+03	4,19E+02	36,7	1,09E+04	1,60E+03	14,7	9,06E+03	1,94E+03	21,4
D19	1,23E+04	2,40E+03	19,5	1,07E+03	1,16E+02	10,8	5,30E+03	1,14E+03	21,6	5,97E+03	1,23E+03	20,6
D20	1,46E+04	6,47E+02	4,4	6,04E+02	2,01E+02	33,3	7,18E+03	1,23E+03	17,1	6,84E+03	9,22E+02	13,5
D21	1,83E+04	2,29E+03	12,5	1,07E+03	3,07E+02	28,6	8,59E+03	1,48E+03	17,3	8,65E+03	5,33E+02	6,2
D22	1,80E+04	6,15E+02	3,4	4,70E+02	1,16E+02	24,7	6,91E+03	5,81E+02	8,4	1,06E+04	1,14E+03	10,8
D23	2,00E+04	2,03E+03	10,1	7,38E+02	1,16E+02	15,7	7,58E+03	6,15E+02	8,1	1,17E+04	2,62E+03	22,4
D24	1,89E+04	1,69E+03	9,0	2,68E+02	1,16E+02	43,3	8,39E+03	6,15 E+02	7,3	1,02E+04	1,23E+03	12,1
D25	1,64E+04	1,31E+03	8,0	3,35E+02	1,16E+02	34,6	8,86E+03	1,57E+03	17,8	7,25E+03	7,26E+02	10,0

Sistemas	Total	STD	CV	Saludable	STD	CV	Pálida	STD	CV	Transparente	STD	CV
MITO	2,20E+04	4,22E+03	19,2	0,00E+00	0,00E+00	0,0	5,25E+03	4,33E+02	8,2	1,68E+04	3,88E+03	23,2
BLK	1,64E+04	1,31E+03	8,0	3,35E+02	1,16E+02	34,6	8,86E+03	1,57E+03	17,8	7,25E+03	7,26E+02	10,0
BLK PG	2,66E+04	1,54E+03	5,8	8,05E+02	2,01E+02	25,0	1,03E+04	8,13E+02	7,9	1,55E+04	8,77E+02	5,7

Tabla 8. Porcentaje de zooxantela saludable, pálida y transparente liberada en los microcosmos.

Sistemas	Total	Saludable	Pálida	Trasparente
D01	100	12	58	29
D02	100	2	34	64
D03	100	5	62	35
D04	100	21	46	33
D05	100	2	25	73
D06	100	3	47	50
D07	100	8	40	52
D08	100	7	34	60
D09	100	10	90	3
D10	100	13	40	48
D11	100	2	34	64
D13	100	4	37	59
D14	100	11	31	58
D15	100	4	38	58
D16	100	15	47	38
D17	100	3	42	54
D18	100	5	52	43
D19	100	9	43	48
D20	100	4	49	47
D21	100	6	47	47
D22	100	3	38	59
D23	100	4	38	58
D24	100	1	44	54
D25	100	2	54	44
MITO	100	0	24	76
BLK	100	2	54	44
BLKPG	100	3	39	58

Tabla 9. Resultado del análisis de ANOVA de una vía para los componentes de diferente color de corales. Se indica nivel de probabilidad (**=P<0,01; *=P<0,05; NS = no significativo).

Código de muestra	Cian (C)	Magenta (M)	Amarillo (Y)	Negro (K)
D01	NS	NS	NS	*
D02	NS	*	NS	NS
D03	NS	*	NS	*
D04	NS	**	NS	NS
D05	*	NS	NS	NS
D06	*	**	NS	**
D07	NS	NS	NS	NS
D08	*	**	NS	**
D09	*	NS	NS	*
D10	NS	**	NS	**
D11	NS	NS	*	*
D13	**	NS	NS	NS
D14	NS	NS	NS	*
D15	NS	NS	NS	NS

Código de muestra	Cian (C)	Magenta (M)	Amarillo (Y)	Negro (K)
D16	NS	NS	NS	NS
D17	NS	NS	NS	NS
D18	**	**	*	**
D19	NS	*	NS	NS
D20	*	NS	NS	NS
D21	NS	NS	NS	**
D22	NS	NS	NS	NS
D23	**	NS	*	NS
D24	NS	NS	NS	NS
D25	NS	NS	NS	NS
BLK	NS	*	NS	NS
BLK PG	**	**	NS	**
MITO	**	**	**	**

Bibliografía

Balmer, M. E.; Buser, H. R.; Muller, M. D.; Poiger, T., (2005): *Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes*. Environmental Science Technology. 39: 953-962.

Brown, B. E.; Dunne, R. P.; Goodson, M. S.; Douglas, A. E., (2000): *Marine ecology: bleaching patterns in reef corals.* Nature. 404: 142-143.

Bruno, J. F.; Selig, E. R.; Casey, K. S.; Page, C. A.; Willis, B. L.; Harvell, C. D., (2007): *Thermal stress and coral cover as drivers of coral disease outbreaks.* PLoS Biology. 5: 1220-1227.

Clarke, K. R. y Gorley, R. N., (2001): *PRIMER v5: User manual/tutorial.* PRIMER-E, Plymouth (RU), 91pp.

Connell, J. H.; Hughes, T. P.; Wallace, C. C.; (1997): *A 30-year study of coral abundance, recruitment and disturbance at several scales in space and time*. Ecological Monographs. 67: 461-488.

Danovaro, R. y Corinaldesi, C., (2003): *Sunscreen products increase virus production through prophage induction in marine bacterioplankton*. Microbial Ecology. 45: 109-118.

Danovaro, R.; Bongiorni, L.; Corinaldesi, C.; Giovannelli, D.; Damiani, E.; Astolfi, P.; Greci, L.; Pusceddu, A., (2008): *Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections.* Environmental Health Perspectives. 116: 441-447.

Daughton, C. G. y Ternes, T. A., (1999): *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?* Environmental Health Perspective. 107: 907-938.

Douglas, A. E., (2003): *Coral bleaching-how and why?* Marine Pollution Bulletin. 46: 385-392.

Giokas, D. L.; Salvador, A.; Chisvert, A., (2007): *UV filters: from sunscreens to human body and the environment.* Trends in Analytical Chemistry. 26: 360-374.

Glynn, P. W., (1996): *Coral reef bleaching: facts, hypotheses and implications.* Global Change Biology. 2: 495-509.

Hoegh-Guldberg, O., (1999): *Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs.* Marine Fresh- water Research. 50: 839-866.

Hughes, T. P.; Baird, A. H.; Bellwood, D. R.; Card, M.; Connolly, S. R., (2003): *Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs.* Science. 301: 929-933.

Jones, R. J., (2004): *Testing the 'photoinhibition' model of coral bleaching using chemical inhibitors.* Marine Ecology Progress Series. 284: 133-145.

Knowlton, N., (2001): *The future of coral reefs.* Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 98: 5419-5425.

Mise, T., y Hidaka, M., (2003): *Degradation of zooxanthellae in the coral Acropora nasuta during bleaching*. Galaxea JCRS. 5: 33-39.

Moberg, F., y Folke, C., (1999): *Ecological goods and services of coral reef ecosystems.* Ecological Economics. 29: 215-233.

Pandolfi, J. M.; Bradbury, R. H.; Sala, E.; Hughes, T. P.; Bjorndal, K. A.; Cooke, R. G., (2003): *Global trajectories of the long term decline of coral reef ecosystems.* Science. 301: 955-958.

Schlumpf, M.; Schmid, P.; Durrer, S.; Conscience, M.; Maerkel, K., (2004): *Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters-an update*. Toxicology. 205: 113-122.

Shibata, A.; Goto, Y.; Saito, H.; Kikuchi, T.; Toda, T.; Taguchi, S., (2006): *Comparison of SYBR Green I and SYBR Gold stains for enumerating bacteria and viruses by epifluorescence microscopy*. Aquatic Microbial Ecology. 43: 223-231.

Suharsono, (1992): *Coral assemblages around Palau Genteng Besar, Seribu Islands, Indonesia*. En L. M., Chou y C. R. Wilkinson (eds.), *3rd ASEAN Science and Technology Week Conference Proceedings*, Vol, 6, Marine Science: Living Coastal Resources, 21-23 Sept, 1992, Singapur, Universidad Nacional de Singapur. Pp,41-54.

Siebeck, U. E.; Marshall, N. J.; Klüter, A.; Hoegh-Guldberg, O., (2006): *Monitoring coral bleaching using a colour reference card*. Coral Reefs. 25: 453-460.

Veron, J. E. N.; Devantier, L. M.; Turak, E.; Green, A. L.; Kininmonth, S.; Stafford-Smith, S.; Peterson, N., (2009): *Delineating the Coral Triangle*. Galaxea, Journal of Coral Reef Studies 11: 91-100.

Wallace, C. C., (1999): *Staghorn Corals of the World: A revision of the coral genus Acropora (Scleractinia; Astrocoe- niina; Acroporidae) worldwide, with emphasis on morphology, phylogeny and biogeography*. Pp, 422, Melbourne: CSIRO Publishing.

Regional distribution patterns of Acropora and their use in the conservation of coral reefs in Indonesia.

Wallace, C. C.; Richards, Z.; Sharshono, (2001): *Regional distribution patterns of Acropora and their use in the conservation of coral reefs in Indonesia.*

Wilkinson, C., (2004): *Status of Coral Reefs of the World: 2004*. Townsville, Australia: Australian Institute for Marine Science.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de protección solar eco-compatible que comprende:

- uno o más filtros UV seleccionados de 2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)-fenol, benzoato de 2-[4-(dietilamina)-2-hidroxibenzoil]hexilo, etilhexil triazona;
- uno o más antioxidantes seleccionados de acetato de tocoferilo, tocoferol, retinol, compuestos polifenólicos extraídos de té verde;
- uno o más portadores seleccionados de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, aceite de oliva, cera de abejas,

y libre de:

- conservantes que pertenecen a la familia de los parabenos;
- derivados de ácido ascórbico;
- filtros UV seleccionados de bis etilhexiloxifenol metoxifenil triazina, cinamatos, benzofenonas, derivados de alcanfor, óxido de titanio;
- fragancias seleccionadas de aceite esencial de melaleuca, extractos de flor ylang ylang, extractos de Bambousa Arundinacea, Karité;
- portadores seleccionados de grasas derivadas de animales y aceite de argán.

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una o más fragancias seleccionadas de naranja, lavanda, pomelo, guayaba y coco.

3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende además ácido sórbico.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en:

- uno o más filtros UV seleccionados de 2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol, benzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]hexilo, etilhexil triazona;
- uno o más antioxidantes seleccionados de acetato de tocoferilo, tocoferol, retinol, compuestos polifenólicos extraídos de té verde;
- uno o más portadores seleccionados de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, aceite de oliva, cera de abejas;
- agua.

5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en:

- uno o más filtros UV seleccionados de 2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol, benzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]hexilo, etilhexil triazona;
- uno o más antioxidantes seleccionados de acetato de tocoferilo, tocoferol, retinol, compuestos polifenólicos extraídos de té verde;
- ácido sórbico;
- uno o más portadores seleccionados de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, aceite de oliva, cera de abejas;
- agua.

6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en:

- 2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol y/o benzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]hexilo;
- acetato de tocoferilo y/o tocoferol;
- ácido sórbico;
- uno o más portadores seleccionados de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, aceite de oliva, cera de abejas;
- agua;
- una o más fragancias seleccionadas de naranja, lavanda, pomelo, guayaba y coco.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en:

- 2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol y/o benzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]hexilo;
- acetato de tocoferilo y/o tocoferol;
- ácido sórbico;
- uno o más portadores seleccionados de dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, aceite de oliva, cera de abejas;
- agua;
- una o más fragancias seleccionadas de naranja, lavanda, pomelo, guayaba y coco;
- hidroxietilcelulosa y/o EDTA y/o hidróxido de sodio.

8. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en:

- 2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol, benzoato de 2-[4-(dietilamina)-2-hidroxibenzoil]hexilo y etilhexil triazona;
- acetato de tocoferilo;
- ácido sórbico;
- dicaprilato/dicaprato de propilenglicol, aceite de oliva y cera de abejas;
- agua;
- hidroxietilcelulosa;
- EDTA;
- hidróxido de sodio.

9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dichos filtros UV están presentes en una concentración comprendida entre el 3 y el 6 % en peso.

10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en forma de crema, loción, pomada, pulverización, barra de labios.

11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada por que no es perjudicial para el medio ambiente marino y en particular para los arrecifes de coral.

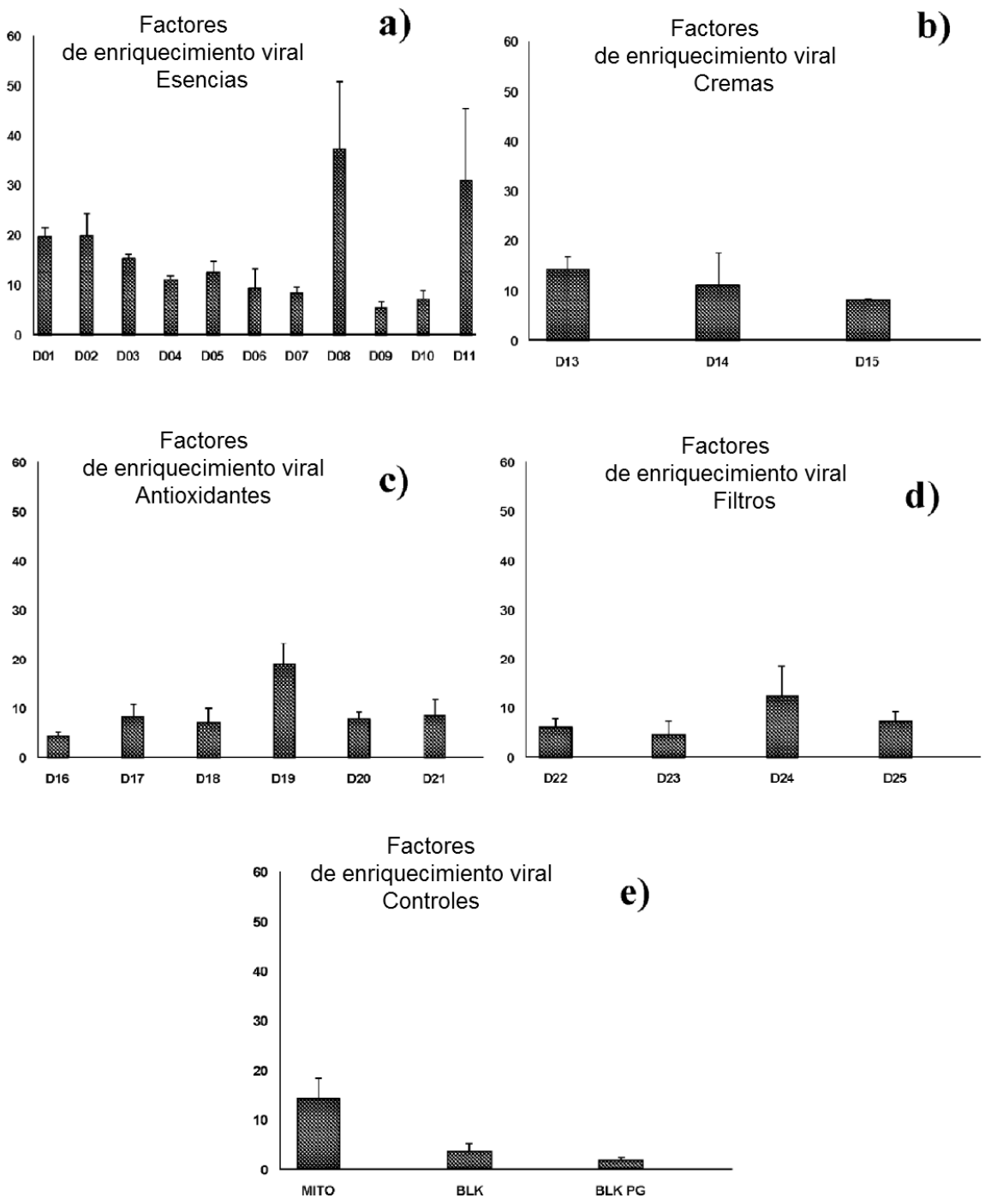
Factores
de enriquecimiento viral
Esencias
a)
60
50
40
30
20
10
0
D01
D02
D03
D04
D05
D06
D07
D08
D09
D10
D11
Factores
de enriquecimiento viral
Cremas
b)
D13
D14
D15
Factores
de enriquecimiento viral
Antioxidantes
c)
D16
D17
D18
D19
D20
D21
Factores
de enriquecimiento viral
Filtros
d)
D22
D23
D24
D25
Factores
de enriquecimiento viral
Controles
e)
MITO
BLK
BLK PG

Figura 1

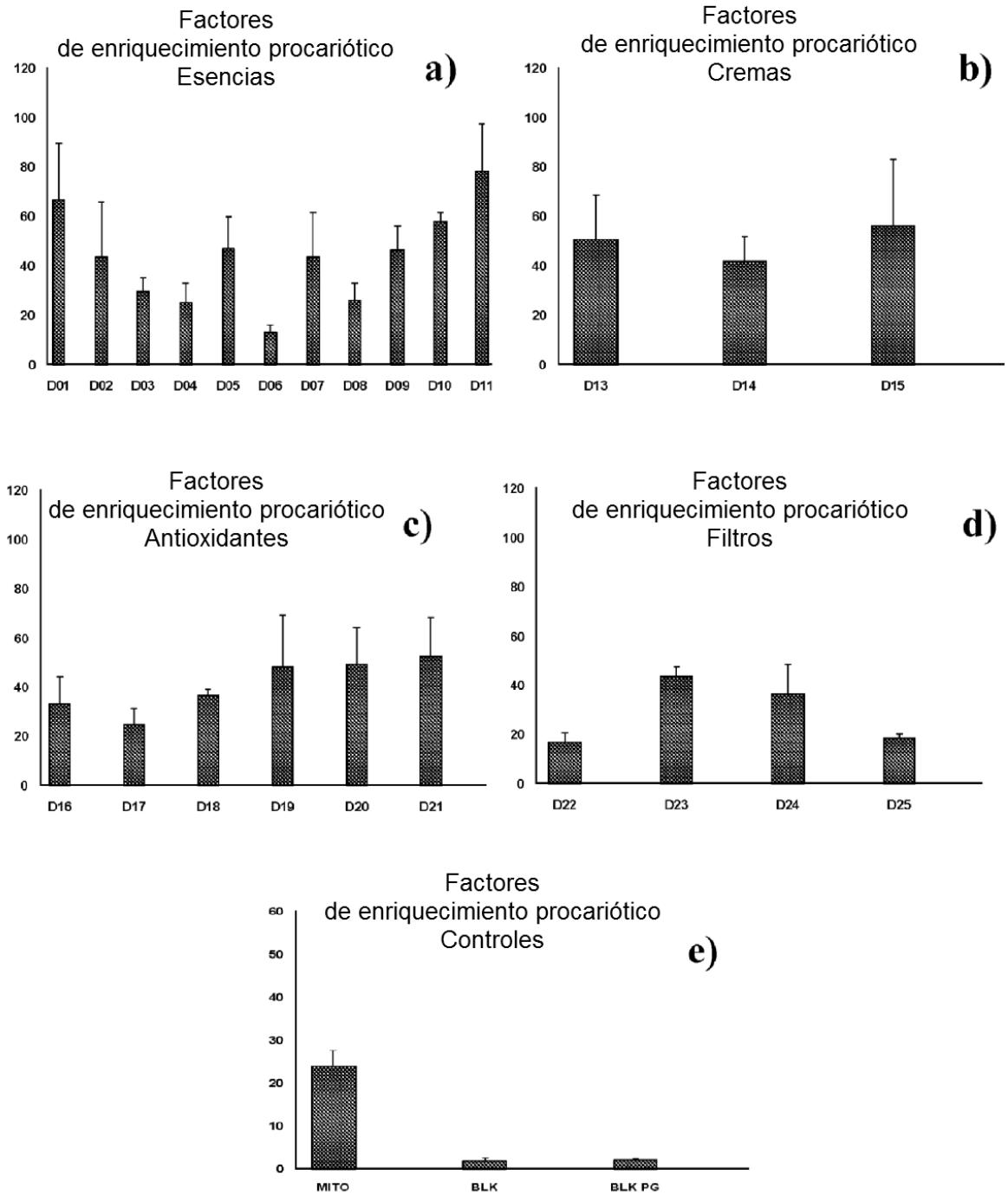
Factores
de enriquecimiento procariótico
Esencias
a)
120
100
80
60
40
20
0
D01
D02
D03
D04
D05
D06
D07
D08
D09
D10
D11
Factores
de enriquecimiento procariótico
Cremas
b)
D13
D14
D15
Factores
de enriquecimiento procariótico
Antioxidantes
c)
D16
D17
D18
D19
D20
D21
Factores
de enriquecimiento procariótico
Filtros
d)
D22
D23
D24
D25
Factores
de enriquecimiento procariótico
Controles
e)
60
50
40
30
20
10
0
MITO
BLK
BLK PG

Figura 2

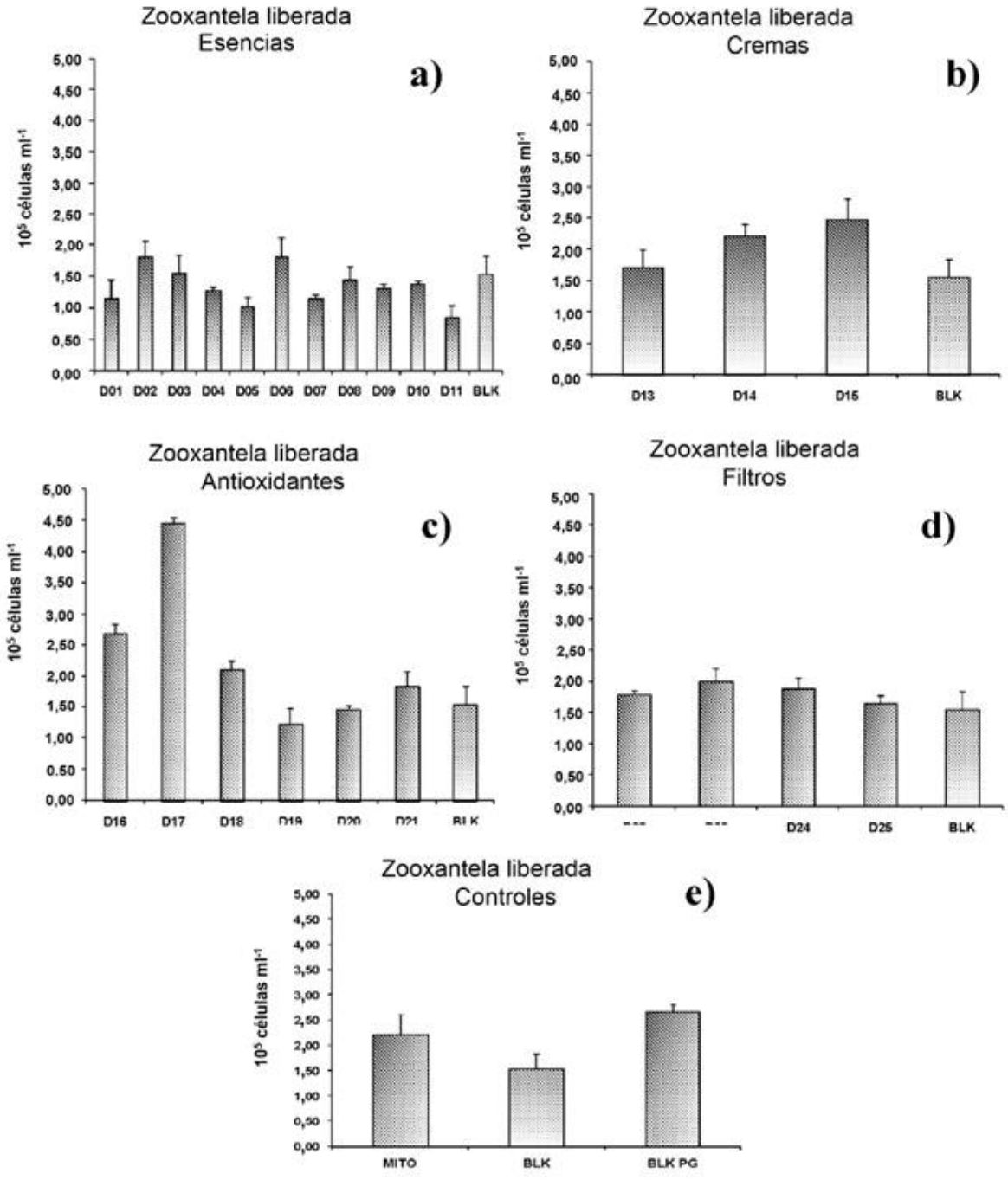
Zooxantela liberada
Esencias
a)
10^5 células ml^{-1}
5,00
4,50
4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
D01 D02 D03 D04 D05 D06 D07 D08 D09 D10 D11 BLK
Zooxantela liberada
Cremas
b)
10^5 células ml^{-1}
D13 D14 D15 BLK
Zooxantela liberada
Antioxidantes
c)
10^5 células ml^{-1}
D16 D17 D18
Zooxantela liberada
Filtros
d)
10^5 células ml^{-1}
D24 D25 BLK
Zooxantela liberada
Controles
e)
10^5 células ml^{-1}
MITO BLK BLK PG

Figura 3

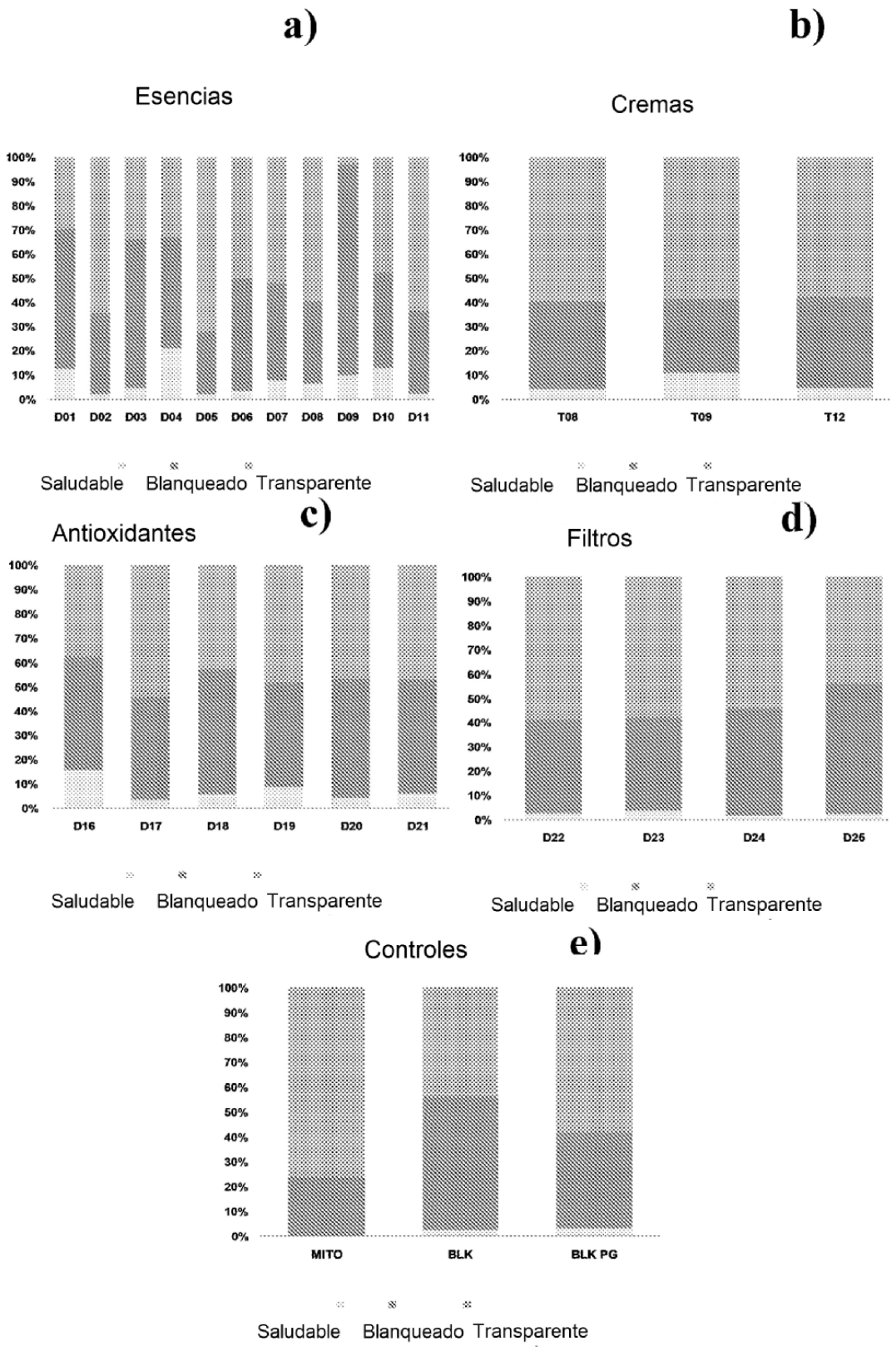
a)
Esencias
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
D01 D02 D03 D04 D05 D06 D07 D08 D09 D10 D11
Saludable Blanqueado Transparente
b)
Cremas
T08 T09 T12
Saludable Blanqueado Transparente
c)
Antioxidantes
D16 D17 D18 D19 D20 D21
Saludable Blanqueado Transparente
d)
Filtros
D22 D23 D24 D25
Saludable Blanqueado Transparente
e)
Controles
MITO BLK BLK PG
Saludable Blanqueado Transparente

Figura 4

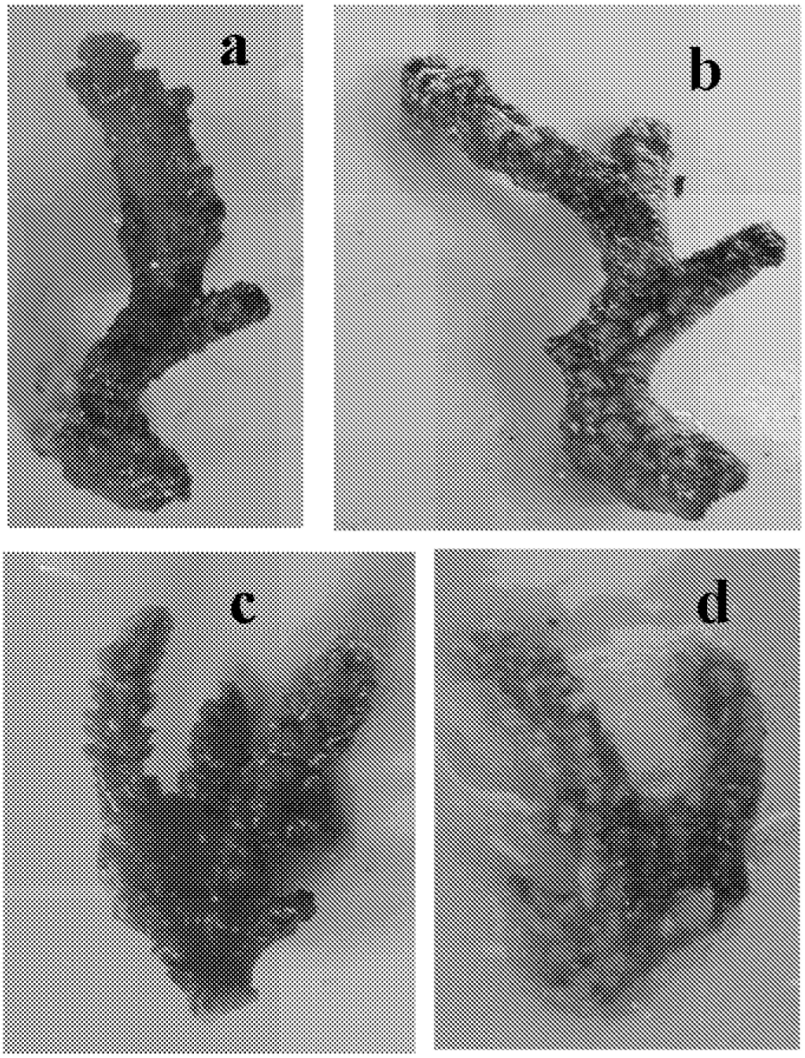

Figura 5

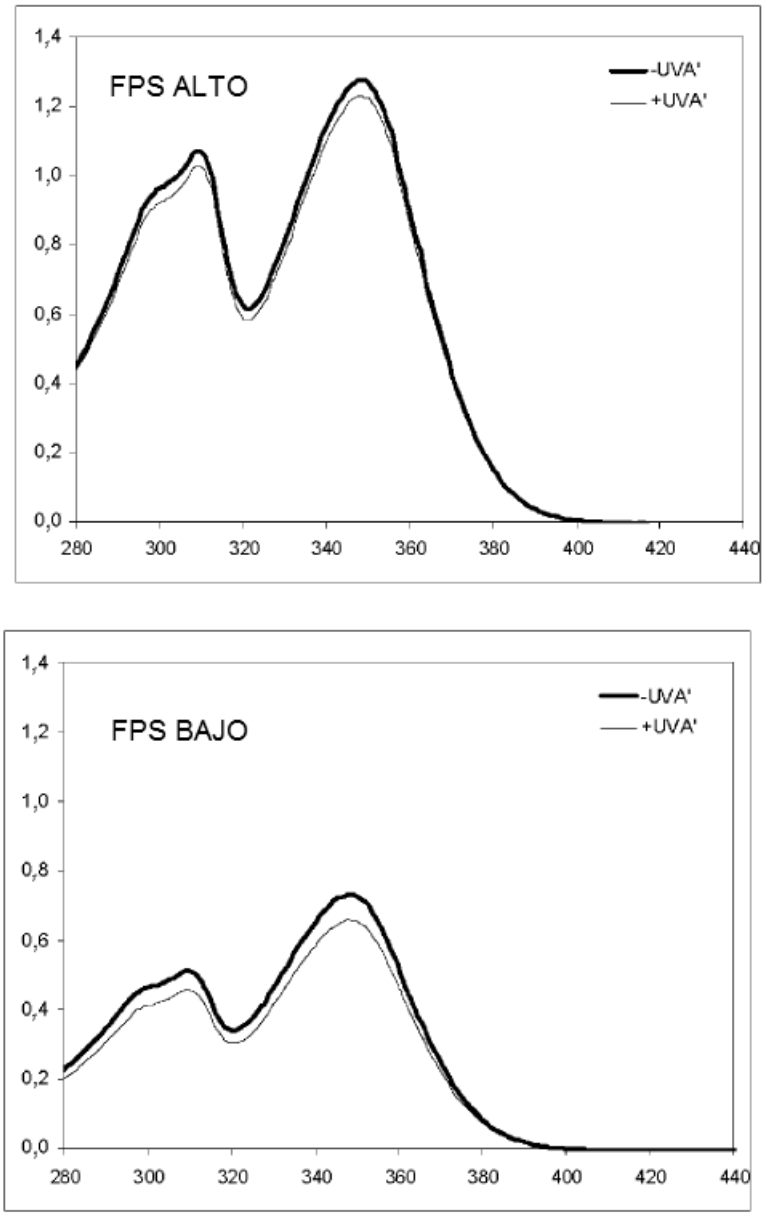
FPS ALTO
-UVA'
+UVA'
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
280
300
320
340
360
380
400
420
440
FPS BAJO
-UVA'
+UVA'
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
280
300
320
340
360
380
400
420
440

Figura 6