

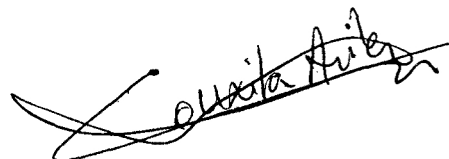
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

**SUSTANCIAS NATURALES DE MOLUSCOS OPISTOBRANQUIOS:  
ESTUDIO DE SU ESTRUCTURA, ORIGEN Y FUNCION  
EN ECOSISTEMAS BENTONICOS.**

VºBº de los Directores de la  
Memoria:  
Dr. Manuel Ballesteros, Profesor  
Titular del Departamento de Biología  
Animal de la Universidad de Barcelona.



Memoria redactada por Conxita  
Avila Escartín, para optar al grado  
de Doctor en Ciencias Biológicas  
por la Universidad de Barcelona.



Dr. Guido Cimino, Director del I.C.M.I.B.  
C.N.R.-Arco Felice, Nápoles, Italia.



**Barcelona, Marzo de 1993.**

**Als meus avis.**

## Agradecimientos.

Todo empezó en el I.N.B. Bernat Metge de Barcelona. De entre los varios profesores que marcaron mi trayectoria, había dos que debo destacar aquí: Tomás Padrosa y Pilar Sesé. Ambos hicieron que me decidiera por la biología, especialmente el primero por los trabajos de investigación que realizamos en el Instituto y que nos despertaron la "curiosidad científica". De aquel grupo de trabajo de los años 1978-1982, hoy en día el 50% somos biólogos. Adolfo Silván y Pere Cuevas merecen también mi agradecimiento por sus enseñanzas. Posteriormente, y durante la carrera, mi interés por los invertebrados marinos fue aumentando progresivamente, y en particular por los moluscos. Durante el curso 1986-1987 conseguí una Beca de Colaboración con el Dr. M. Ballesteros, que me permitió, además de entrar en contacto con la investigación y el trabajo de los biólogos marinos, hacer un Curso de Submarinismo y comprarme un traje de buceo.

El primer año después de acabar la carrera conseguí una beca para trabajar en Italia con el Dr. Guido Cimino. En realidad yo había empezado a estudiar los Dendrodorídidos, y el tema de la Beca era la defensa química, así que decidimos compaginar ambas cosas. Simultáneamente conseguí una Beca para realizar un curso de Ecología Marina en Woods Hole (Massachusetts, U.S.A.), y esto fue muy satisfactorio para el posterior desarrollo de mi trabajo, ya que no sólo aprendí a ver las mismas cosas desde otros puntos de vista, sino que me encontré con otra manera de trabajar y de entender la ciencia.

Es muy de agradecer el apoyo recibido en el Departamento de Biología Animal para el desarrollo de mi trabajo durante aquel año, especialmente a los que sufrieron los olores de los productos utilizados en las tinciones para los estudios histológicos. En aquella etapa fueron también muy importantes varios hechos, de entre los que destacaré que Antonio Jimeno y Dolors Rosell me dejaron compartir su mesa, hasta que conseguí que los bedeles me dieran otra (vieja pero repintada), y las nuevas amistades con la gente del C.I.B. (monitores, compañeros y amigos).

Mi llegada al I.C.M.I.B. de Nápoles fue ciertamente chocante viniendo de Woods Hole, sin embargo debo agradecer la ayuda de todo el personal del Instituto desde el principio y hasta el final de esta Tesis. Si debo mencionar algo ha de ser la ayuda de Aniello López, Tonino Crispino, Tonino Trabucco y Guido Villani. Por otro lado, la colaboración con Enzo di Marzo, Rosa Rita Vardaro, Aldo Spinella, Margheritta Gavagnin, Angelo Fontana y Enrico Trivellone ha sido un placer. A Mimmo y Rosanna Mazzarella les debo agradecer su gran hospitalidad a mi llegada, su simpatía y su ayuda. De esta etapa italiana debo destacar la amabilidad de la Sra. Biondi y de la Sra. Angela Sebastiano (d.e.p.). La primera por alquilarme su casa, traerme el panetone en Pascua y otras muchas cosas. La segunda por tratarme como si fuera de la familia mientras estuve en su casa y hacerme casi siempre la cena.

Sería imperdonable no mencionar aquí a los mejores amigos que he hecho en los últimos años en relación directa o indirecta con esta Tesis. Cristina Gambi consiguió hacer de mi "exilio" una estancia muy agradable. Nunca olvidaré los paseos por Capri e Ischia, las salidas junto a Paolo y Maria Assunta con el Carolina, los baños termales con Beatrice y Lucia, etc. Ernesto Mollo y su familia me ofrecieron la oportunidad de conocer la península sorrentina, siendo tan hospitalarios y amables que nunca se lo agradeceré lo bastante. Debo mencionar, entre los amigos italianos, a Giovanni Visetti, que cocina una maravillosa "pasta e patatte", por no hablar de los "spaghetti", y además conoce los vinos españoles.

Volviendo al I.C.M.I.B. debo destacar la ayuda incansable de Aniello López en todos los casos en que la necesité, tanto para los problemas bancarios como de alojamiento, etc., y debo agradecerle también su simpatía de siempre. A Tonino Crispino debo agradecerle todo

lo que me ha enseñado en el Laboratorio, y debo añadir que la parte química de esta Tesis nunca se hubiera realizado sin su ayuda. A él y a Tonino Trabucco les debo agradecer también los cafés y los "dolcini" de media tarde, los helados del verano en Baia, y su compañía y ayuda constante. A Enzo Calandrelli le debo agradecer que me dejara compartir su despacho a mi llegada, y a Eva Zubía su enorme simpatía mientras compartimos alojamiento en Arco Felice durante un mes de 1.991. No puedo mencionar aquí a todos los miembros del Istituto, sin embargo a todos les debo agradecer su ayuda e interés constante. Es necesario mencionar también al personal de NMR, GC, MS y al resto del personal técnico su colaboración en este trabajo. Raffaele Turco ha estado siempre dispuesto a ayudar en lo que se refiere a fórmulas, gráficas, etc., para los trabajos. Gracias también a Loredana, Franco, Rosaria, y todos los demás. Enzo Di Marzo me brindó alojamiento durante mi última estancia en Nápoles, y nunca se lo agradeceré lo suficiente. Guido Cimino, además de codirector de esta Tesis, ha sido quien la ha impulsado, con ideas, discusiones y críticas, siempre constructivas.

A todo esto, los trabajos en la defensa química de los opistobranquios iban "viento en popa", mientras que el asunto de los Dendroróridos permanecía bloqueado. Por ello, y tras reflexionarlo bastante, decidí, junto a mis dos directores, cambiar el tema de mi Tesis y enfocarla hacia lo que realmente estaba haciendo: las sustancias naturales de moluscos opistobranquios. La idea se centraba en los doridáceos, pero tras discutirlo con mis directores, se decidió que el título debía ser más amplio. Así pues, ya estaba todo decidido.

Al otro lado del Atlántico también hay varias personas que debo mencionar aquí. John Faulkner fue muy amable en mi visita a Scripps (La Jolla, California, U.S.A.), brindándome la oportunidad de volver cuando quisiera, además de algunas fructíferas discusiones científicas. Ivan Valiela del B.U.M.P. en Woods Hole me ayudó a conseguir parte de la bibliografía más difícil de encontrar, y además me dió consejos muy valiosos. Ken Foreman y Ann Giblin, así como Anjali y Ramakrishna Kilaparti fueron maravillosos al alojarme en repetidas ocasiones en sus casas en Woods Hole. Jella Atema dedicó algo de su tiempo a aclararme los conceptos de "antifeedant" y "feeding deterrence", además de otros interesantes comentarios sobre el tema. Alan Kuzirian y Catherina Tamse además de dejarme trabajar con ellos, me enseñaron todo lo que sé respecto al cultivo de opistobranquios, y fue muy agradable la estancia en su laboratorio. Al Marine Biological Laboratory de Woods Hole debo agradecerle toda la bibliografía que he conseguido en sus inmensas estanterías llenas de información.

Al volver de Italia, en 1990, el estupendo sistema de becas del Ministerio no me permitió cambiar la Beca que tenía en Italia por una Beca aquí, por lo cual me quedé sin Beca durante 6 largos meses. Por fortuna conseguí una Beca en el C.E.A.B con la Dra. M.J. Uriz, a la que debo agradecer su decisión de admitirme en el Centro y en su proyecto de investigación. Los dos años de Beca del Ministerio y los dos y algo más de Beca de la Generalitat constituyen el período de trabajo de esta Tesis. En el C.E.A.B. hay mucha gente a la que debo agradecerle cosas. Debo destacar a Rita, Gustavo, Esther, Ricardo, Susana, Concha, Xus, Anselmo, María, etc., por infinidad de cosas. Manolo Maldonado merece un agradecimiento especial por la vacuna contra el virus de la telefónica, y es con quien he compartido las angustias de los últimos meses de Tesis, las solicitudes de becas, etc. Sin José M. Tur y sin Gustavo Carreras hubiera sido imposible mantener a los "*Peltdoris*" durante tanto tiempo en acuario, y sin la ayuda del primero hubiera sido muy difícil realizar los experimentos de cuerdas con gusanos. La mayoría de los espectros NMR han sido redibujados por Gustavo. A Pere Maluquer le agradezco el dejarme compartir su despacho al principio, y a Just Cebrián con quien he compartido el despacho después de Pere, por su comprensión y simpatía. Al equipo de fútbol del C.E.A.B. hay que agradecerles su valentía para seguir luchando aunque pierdan casi siempre, y por brindar (a veces) espectáculo al público.

Debo agradecer al Departament d'Ensenyament la concessió de la Beca de F.I. que me ha permès acabar la Tesis, ademés de sufragar los gastos de los viajes a Italia. Hay que mencionar también al Servei de Suport de la Gestió Exterior y a la Divisió III de la Universidad de Barcelona por contribuir a varios desplazamientos previos al extranjero.

A J. Ros le agradezco sus consejos y su ayuda, así como su buena voluntad para firmar cartas de recomendación para solicitar múltiples becas. El agradecimiento por su apoyo en diversas solicitudes de becas debo extenderlo a M.J. Uriz, R. Margalef, E. Ballesteros, C. Duarte y J.M. Gili. La numerosa bibliografía necesaria para este trabajo ha sido obtenida con la ayuda de M. Ballesteros, G. Cimino, J. Ros, J. Ortea e I. Marigómez (quien además me dió muy buenos consejos para la histología). A M. Durfort le agradezco su gran ayuda en los estudios de histología y citología, sin la cual no hubiera sido posible exponer aquí esos resultados. A N. Yonow le agradezco sus comentarios y el envío de bibliografía.

A los pescadores de Blanes les tengo que agradecer las muestras de arrastre, y a Dani Martín también por algunas de estas muestras. Al Servicio de Microscopía de la Universidad de Barcelona (Almudena, Ana, Núria, Ana, M. José, Ramón, Jordi y los demás) les debo agradecer toda su ayuda en las numerosas sesiones fotográficas y de ultramicrotomía, y a Toni sus enseñanzas para el revelado de fotografías. Al Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Biología (especialmente a J. Gutiérrez) le agradezco que nos dejara llevarnos su lámpara de UV hasta que pudimos comprar una en Blanes. Los ejemplares de *Doriopsilla areolata* de Algeciras fueron cedidos por "Miguel", y otras muestras por J. García. *Haminoea solitaria* y *Doriopsilla pharpa* fueron cedidas por el Marine Biological Laboratory. Las esponjas fueron identificadas amablemente por M.J. Uriz y D. Rosell. Algunos ejemplares de Santander y San Sebastián fueron recogidos con la ayuda de alumnos de Zoología del Dr. M. Ballesteros y la Dra. P. Gracia, de diversas promociones. Algunas muestras proceden de proyectos como los de M. Ballesteros de Formentera y del Maresme, o del proyecto Fauna Ibérica, y de los proyectos de M.J. Uriz y de G. Cimino en los que he trabajado. Le agradezco a C. Duarte que me dejara participar en una de sus salidas al Delta del Ebro. Y al grupo de Inteligencia Artificial del C.E.A.B. le agradezco su ayuda con los MacIntosh, especialmente a L. Godó por arreglarme el Chemdrawn.

Debo agradecer las muestras cedidas por J. Ortea (todas las procedentes de Las Llanas, Asturias), que son muchas, y sin las cuales esta Tesis hubiera sido muy distinta, y especialmente a los principales recolectores de dichas muestras (Eugenia, Gonzalo y Angel). A Eugenia y Angel les debo agradecer su constante ayuda, y a Gonzalo, además, su gran interés por convertirme en una buena taxónoma (aunque no sé si al final lo conseguirá). A J. Ortea debo agradecerle su ayuda siempre que ha hecho falta, así como sus valiosos consejos, y por permitirme usar algunos de sus datos no publicados. Con Eugenia en particular, he compartido "aventuras y desventuras en Nápoles", y nos hemos consolado mutuamente en momentos "depres".

A mis dos directores, M. Ballesteros y G. Cimino, debo agradecerles su tiempo, su interés y su buena voluntad, así como sus críticas y "regañinas" siempre constructivas. Sin su apoyo y su dedicación no hubiera sido posible realizar esta Tesis. Especialmente les agradezco el haber depositado su confianza en mi para desarrollar este trabajo.

A mi familia le debo el haberme hecho llegar hasta aquí con su apoyo desde siempre. Las láminas de scánning han sido confeccionadas por mi hermano Ferran, a quien debo agradecerle su generosa ayuda. Sin la ayuda de Rafa esta Tesis no hubiera podido realizarse, y debo agradecerle muchísimas cosas. A todos gracias por la ayuda.

Conxita.

"The Opisthobranch Gastropoda are to the Mollusca what the orchids are to the angiosperms, or the butterflies to the arthropods"

Thompson, 1976

## **1. INDICE**

1. Índice.....	1
2. Resumen/Summary.....	11
3. Introducción y objetivos.....	19
3.1. Introducción.....	19
3.2. Objetivos.....	26
4. Material y métodos.....	27
4.1. Recolección e identificación de muestras.....	27
4.1.1. Localidades de muestreo.....	27
4.1.2. Listado de ejemplares capturados.....	29
4.1.3. Clasificación.....	34
4.2. Métodos de captura, mantenimiento y fotografía	39
4.3. Métodos histológicos y citológicos.....	39
4.3.1. Microscopía óptica.....	39
4.3.2. Microscopía electrónica de transmisión.	46
4.3.3. Microscopía electrónica de barrido.....	48
4.4. Métodos químicos.....	49
4.4.1. Introducción química.....	49
4.4.2. Extracción.....	50
4.4.3. Fase analítica: Cromatografía de capa fina (TLC).....	52
4.4.4. Aislamiento y purificación.....	55
4.4.5. Análisis químico e identificación.....	56
4.4.6. Experimentos con radiactivos.....	58
4.5. Metodología de los tests y experimentos.....	58
4.5.1. Ictiotoxicidad.....	58
4.5.2. De repelencia.....	60
4.5.3. Citotoxicidad.....	60
4.5.4. Otros experimentos.....	61
4.6. Cultivos en acuario y experimentos con larvas.	65
4.7. Métodos logísticos.....	67
5. Estudio detallado por especies.....	69
5.1. <i>Hypselodoris cantabrica</i> Bouchet y Ortea, 1980.	69
5.1.1. Introducción.....	69
5.1.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	69
5.1.1.2. Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	69
5.1.1.3. Referencias comentadas: . morfológicas o descriptivas..	69
. ecológicas.....	70
5.1.2. Material estudiado.....	70
5.1.3. Resultados y discusión.....	71
5.1.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	71
. Esquemas anatómicos.....	71
. Formaciones dérmicas del manto	72



. Rádula y armadura labial.....	73
5.1.3.2. Análisis químico.....	74
. Productos obtenidos:	
Estructura.....	74
. Origen de los productos.....	83
. Función.....	84
5.1.3.3. Resumen conclusivo.....	86
5.2. <i>Hypselodoris fontandraui</i> (Pruvot-Fol, 1951)...	87
5.2.1. Introducción.....	87
5.2.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	87
5.2.1.2. Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	87
5.2.1.3. Referencias comentadas:	
. morfológicas o descriptivas..	88
. ecológicas.....	88
5.2.2. Material estudiado.....	88
5.2.3. Resultados y discusión.....	89
5.2.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	89
. Esquemas anatómicos.....	98
. Rádula y armadura labial.....	90
5.2.3.2. Análisis químico.....	90
. Productos obtenidos:	
Estructura.....	90
. Origen de los productos.....	91
. Función.....	92
5.2.3.3. Resumen conclusivo.....	92
5.3. <i>Hypselodoris webbi</i> (D'Orbigny, 1839).....	93
5.3.1. Introducción.....	93
5.3.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	93
5.3.1.2. Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	94
5.3.1.3. Referencias comentadas:	
. morfológicas o descriptivas..	94
. ecológicas.....	95
. químicas.....	96
5.3.2. Material estudiado.....	97
5.3.3. Resultados y discusión.....	98
5.3.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	98
. Esquemas anatómicos.....	98
. Formaciones dérmicas del manto.....	99
. Rádula y armadura labial.....	101
. Desarrollo larvario.....	102
5.3.3.2. Análisis químico.....	102

. Productos obtenidos:	
Estructura.....	102
. Origen de los productos.....	111
. Función.....	112
5.3.3.3. Resumen conclusivo.....	113
5.4. <i>Hypselodoris villafranca</i> (Risso, 1818).....	114
5.4.1. Introducción.....	114
5.4.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	115
5.4.1.2. Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	115
5.4.1.3. Referencias comentadas:	
. morfológicas o descriptivas..	115
. ecológicas.....	115
. químicas.....	116
5.4.2. Material estudiado.....	116
5.4.3. Resultados y discusión.....	116
5.4.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	117
. Esquemas anatómicos.....	117
. Formaciones dérmicas del manto.....	118
. Rádula y armadura labial.....	121
5.4.3.2. Análisis químico.....	122
. Productos obtenidos:	
Estructura.....	122
. Origen de los productos.....	129
. Función.....	132
5.4.3.3. Resumen conclusivo.....	132
5.5. <i>Hypselodoris tricolor</i> (Cantraine, 1835).....	133
5.5.1. Introducción.....	133
5.5.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	133
5.5.1.2. Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	133
5.5.1.3. Referencias comentadas:	
. morfológicas o descriptivas..	134
. ecológicas.....	134
. químicas.....	135
5.5.2. Material estudiado.....	135
5.5.3. Resultados y discusión.....	135
5.5.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	135
. Esquemas anatómicos.....	135
. Formaciones dérmicas del manto.....	136
. Rádula y armadura labial.....	136
5.5.3.2. Análisis químico.....	137

. Productos obtenidos:	
Estructura.....	137
. Origen de los productos.....	140
. Función.....	141
5.5.3.3. Resumen conclusivo.....	141
5.6. <i>Hypselodoris</i> sp.....	142
5.6.1. Introducción.....	142
5.6.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	142
5.6.1.2. Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	142
5.6.2. Material estudiado.....	142
5.6.3. Resultados y discusión.....	143
5.6.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	143
. Esquemas anatómicos.....	143
. Formaciones dérmicas del manto.....	143
. Rádula y armadura labial.....	144
5.6.3.2. Análisis químico.....	145
. Productos obtenidos:	
Estructura.....	145
. Origen de los productos.....	146
. Función.....	146
5.6.3.3. Resumen conclusivo.....	147
5.7. <i>Hypselodoris orsini</i> (Vérany, 1846).....	148
5.7.1. Introducción.....	148
5.7.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	148
5.7.1.2. Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	148
5.7.1.3. Referencias comentadas:	
. morfológicas o descriptivas..	149
. ecológicas.....	149
. químicas.....	149
5.7.2. Material estudiado.....	150
5.7.3. Resultados y discusión.....	151
5.7.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	151
. Morfología externa.....	151
. Epitelio y formaciones dérmicas del manto.....	151
. Rádula y armadura labial.....	152
. Características de las puestas.....	153
5.7.3.2. Análisis químico.....	153
. Productos obtenidos:	
Estructura.....	153

. Origen de los productos.....	155
. Función.....	156
5.7.3.3. Resumen conclusivo.....	157
5.8. <i>Chromodoris luteorosea</i> (Rapp, 1827).....	158
5.8.1. Introducción.....	158
5.8.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	158
5.8.1.2. Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	158
5.8.1.3. Referencias comentadas:	
. morfológicas o descriptivas..	159
. ecológicas.....	159
. químicas.....	160
5.8.2. Material estudiado.....	160
5.8.3. Resultados y discusión.....	161
5.8.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	161
. Morfología externa.....	161
. Formaciones dérmicas del manto.....	161
. Rádula y armadura labial.....	161
5.8.3.2. Análisis químico.....	162
. Productos obtenidos:	
Estructura.....	162
. Origen de los productos.....	167
. Función.....	168
5.8.3.3. Resumen conclusivo.....	169
5.9. <i>Chromodoris purpurea</i> (Laurillard, 1831).....	170
5.9.1. Introducción.....	170
5.9.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	170
5.9.1.2. Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	170
5.9.1.3. Referencias comentadas:	
. morfológicas o descriptivas..	171
. ecológicas.....	171
5.9.2. Material estudiado.....	171
5.9.3. Resultados y discusión.....	172
5.9.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	172
. Rádula y armadura labial.....	172
5.9.3.2. Análisis químico.....	173
. Productos obtenidos:	
Estructura.....	173
. Origen de los productos.....	175
. Función.....	175
5.9.3.3. Resumen conclusivo.....	176

5.10. <i>Chromodoris krohni</i> (Vérany, 1846).....	177
5.10.1. Introducción.....	177
5.10.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	177
5.10.1.2. Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	177
5.10.1.3. Referencias comentadas: . morfológicas o descriptivas..	178
. ecológicas.....	178
5.10.2. Material estudiado.....	178
5.10.3. Resultados y discusión.....	179
5.10.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	179
. Esquemas anatómicos.....	179
. Formaciones dérmicas del manto.....	180
. Rádula y armadura labial.....	180
. Puesta.....	180
5.10.3.2. Análisis químico.....	181
. Productos obtenidos: Estructura.....	181
. Origen de los productos.....	182
. Función.....	183
5.10.3.3. Resumen conclusivo.....	183
5.11. <i>Chromodoris britoi</i> Ortea y Pérez, 1983.....	184
5.11.1. Introducción.....	184
5.11.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	184
5.11.1.2. Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	184
5.11.1.3. Referencias comentadas: . morfológicas o descriptivas..	184
5.11.2. Material estudiado.....	185
5.11.3. Resultados y discusión.....	185
5.11.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	185
. Esquemas anatómicos.....	185
. Formaciones dérmicas del manto.....	186
. Rádula y armadura labial.....	187
. Características de la puesta.	187
5.11.3.2. Análisis químico.....	188
. Productos obtenidos: Estructura.....	188
. Origen de los productos.....	189
. Función.....	190
5.11.3.3. Resumen conclusivo.....	190
*. Conclusiones sobre la Familia Chromodorididae...	192

5.12. <i>Doris verrucosa</i> Linné, 1758.....	193
5.12.1. Introducción.....	193
5.12.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	193
5.12.1.2. Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	194
5.12.1.3. Referencias comentadas:	
. morfológicas o descriptivas..	194
. ecológicas.....	194
. químicas.....	194
5.12.2. Material estudiado.....	195
5.12.3. Resultados y discusión.....	196
5.12.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	196
. Esquemas anatómicos.....	196
. Protuberancias dorsales del manto.....	297
. Rádula.....	200
. Desarrollo larvario y juvenil	201
5.12.3.2. Análisis químico.....	201
. Productos obtenidos:	
Estructura.....	201
. Origen de los productos.....	213
a) Experimentos de biosíntesis.....	213
b) Productos de origen dietético.....	217
. Función.....	220
5.12.3.3. Resumen conclusivo.....	224
5.13. <i>Peltodoris atromaculata</i> Bergh, 1880.....	226
5.13.1. Introducción.....	226
5.13.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	226
5.13.1.2. Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	226
5.13.1.3. Referencias comentadas:	
. morfológicas o descriptivas..	227
. ecológicas.....	227
. químicas.....	228
5.13.2. Material estudiado.....	229
5.13.3. Resultados y discusión.....	229
5.13.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	229
. Esquemas anatómicos.....	229
. Características del manto....	231
. Rádula y armadura labial.....	232
. Desarrollo y crecimiento. Ciclo de vida en acuario.....	233

5.13.3.2.	Análisis químico.....	237
	. Productos obtenidos:	
	Estructura.....	237
	Origen de los productos.....	243
	Función.....	244
	Autotomía.....	246
5.13.3.3.	Resumen conclusivo.....	247
5.14.	<i>Dendrodoris limbata</i> (Cuvier, 1804).....	248
5.14.1.	Introducción.....	248
5.14.1.1.	Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	248
5.14.1.2.	Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	248
5.14.1.3.	Referencias comentadas:	
	. morfológicas o descriptivas..	249
	. ecológicas.....	249
	. químicas.....	250
5.14.2.	Material estudiado.....	250
5.14.3.	Resultados y discusión.....	251
5.14.3.1.	Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	251
	. Esquemas anatómicos.....	251
	. Estudio comparado del epitelio del manto y otros.....	253
	. Otras características de la especie.....	257
	. Desarrollo larvario y juvenil	257
5.14.3.2.	Análisis químico.....	260
	. Productos obtenidos:	
	Estructura.....	260
	Origen de los productos.....	267
	Función.....	279
5.14.3.3.	Resumen conclusivo.....	273
5.15.	<i>Dendrodoris grandiflora</i> (Rapp, 1827).....	275
5.15.1.	Introducción.....	275
5.15.1.1.	Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	275
5.15.1.2.	Breve descripción y caracterís- ticas de la especie.....	275
5.15.1.3.	Referencias comentadas:	
	. morfológicas o descriptivas..	276
	. ecológicas.....	276
	. químicas.....	276
5.15.2.	Material estudiado.....	277
5.15.3.	Resultados y discusión.....	288
5.15.3.1.	Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	278
	. Esquemas anatómicos.....	278

. Otras características de la especie.....	279
5.15.3.2. Análisis químico.....	279
. Productos obtenidos:	
Estructura.....	279
. Origen de los productos.....	284
. Función.....	285
5.15.3.3. Resumen conclusivo.....	286
5.16. <i>Doriopsilla areolata</i> Bergh, 1880.....	287
5.16.1. Introducción.....	287
5.16.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.....	287
5.16.1.2. Breve descripción y características de la especie.....	287
5.16.1.3. Referencias comentadas:	
. morfológicas o descriptivas..	287
. ecológicas.....	288
5.16.2. Material estudiado.....	288
5.16.3. Resultados y discusión.....	289
5.16.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.....	289
. Esquemas anatómicos.....	289
. Características del manto....	290
. Desarrollo embrionario y larvario.....	290
5.16.3.2. Análisis químico.....	291
. Productos obtenidos:	
Estructura.....	291
. Origen de los productos.....	299
. Función.....	300
5.16.3.3. Resumen conclusivo.....	300
*. Conclusiones sobre los Doridáceos de los apartados 5-12 a 5-16.....	301
5.17. Otros Opistobranquios estudiados.....	302
5.17.1. Cefalaspídeos.....	302
5.17.2. Anaspídeos.....	303
5.17.3. Sacoglosos.....	304
5.17.4. Notaspídeos.....	305
5.17.5. Nudibranquios.....	307
5.17.6. Resumen conclusivo.....	312
6. Revisión bibliográfica: Tipos de moléculas halladas en Moluscos Opistobranquios.....	313
6.1. Breve introducción química.....	313
6.2. Derivados del acetato y del propionato.....	317
6.3. Derivados del mevalonato.....	322



6.4.	Derivados del ácido shikímico.....	343
6.5.	Compuestos nitrogenados.....	344
6.6.	Origen biosintético mixto.....	348
6.7.	Otras sustancias.....	350
6.8.	Breve discusión química.....	355
6.9.	Catálogo de sustancias naturales de opistobranquios del Mediterráneo Occidental y Atlántico próximo.....	356
7.	Discusión general.....	356
7.1.	Origen de las sustancias.....	365
7.1.1.	Origen dietético.....	365
	. Acumulación selectiva de metabolitos.	382
	. Variabilidad geográfica.....	383
	. Transformación de metabolitos de la especie presa.....	387
	. Aspectos ecológicos.....	391
7.1.2.	Biosíntesis.....	391
7.2.	Localización en el organismo.....	396
7.2.1.	Sustancias localizadas en la parte externa.....	401
7.2.2.	Sustancias localizadas en las vísceras.	408
7.3.	Aplicaciones taxonómicas y/o filogenéticas....	414
7.3.1.	Características generales de los distintos grupos.....	414
7.4.	Función e implicaciones ecológicas.....	427
7.4.1.	Test de actividad en laboratorio y efectos farmacológicos.....	427
7.4.2.	Experimentos <i>in situ</i> .....	456
7.4.3.	Tipos de defensa.....	457
	. Posibles depredadores.....	457
	. Clasificación de los tipos de defensa	461
	. Defensas estructurales.....	462
	. Defensas químicas.....	467
	. Defensas de comportamiento.....	477
	. Algunas consideraciones generales sobre la defensa.....	479
7.4.4.	Aspectos ecológicos.....	480
	. Ecología trófica.....	481
	. Nichos, especies vicarias, competencia, simpatria, etc.....	484
	. Coevolución y otras consideraciones..	486
	. Estrategias de la K y de la r.....	490
8.	Conclusiones.....	493
9.	Bibliografía.....	501
10.	Anexos.....	539
10.I.	Datos espectrales de algunas sustancias.....	539
10.II.	Datos de los ejemplares del apartado 5.17...	544

## **2. RESUMEN/SUMMARY**

Los Moluscos Opisthobranchios, en relación a la reducción o incluso pérdida de la concha, han desarrollado múltiples y sofisticados métodos de defensa (incluyendo la defensa química) que les han permitido sobrevivir sin dicha defensa mecánica. En esta Tesis se estudia el papel de las sustancias naturales de Moluscos Opisthobranchios, haciendo énfasis en aspectos biológicos tales como el origen dietético o biosintético de las mismas, su localización en el organismo, y su actividad y función en el ecosistema. Se analizan 16 especies de doridáceos del Mediterráneo y Atlántico próximo, para las que se detalla y discute la estructura, localización, origen y función de sus metabolitos; en algunos casos se describen características poco o nada conocidas de estas especies (como estudios detallados de la rádula mediante microscopía electrónica de barrido, o estudios histológicos y citológicos al microscopio óptico y al electrónico). Otras 39 especies se han analizado de modo preliminar.

El material ha sido capturado mediante inmersión, arrastre o dragado, especialmente en las costas napolitanas, catalanas y asturianas. Se han realizado diversos tipos de experimentos, algunos en acuario y otros en el mar, incorporando las sustancias a probar en fragmentos de calamar y de gusanos poliquetos. Se han cultivado las puestas de numerosas especies, y se han mantenido ejemplares en acuario durante más de un año para estudiar su crecimiento. La metodología química ha seguido las fases usuales de extracción, análisis mediante TLC, aislamiento, purificación e identificación de los metabolitos.

*Hypselodoris cantabrica* contiene moléculas orgánicas con 15 átomos de Carbono (sesquiterpenos): longifolina, tavacfurano, nakafurano-9, dendrolasina, agassizina, *ent*-furodysinina, *iso*-nakafurano-9 e *iso*-dehidrodendrolasina. Existen diferencias cualitativas y cuantitativas entre ejemplares de poblaciones distintas. La naturaleza química de los compuestos presentes en esta especie y su localización en la glándula digestiva y MDFs (formaciones dérmicas del manto), apoyan una estrategia defensiva ligada a la depredación sobre esponjas (*Dysidea fragilis*). Estas sustancias, de tipo furánico, presentan actividad ictiorrepelente, y se localizan en las MDFs cerca de branquias y rinóforos.

*Hypselodoris webbi* es capaz de seleccionar, en distintas áreas geográficas, esponjas (*D. fragilis*) ricas en longifolina y otros furanosesquiterpenos con actividades tóxicas y repelentes. En base al estudio químico, podemos decir que su dieta se amplía a esponjas similares a la variedad rica en longifolina, en las que otros furanos pueden ser mayoritarios (nakafurano-9, *iso-tavacfurano*). Estos metabolitos de origen dietético se acumulan en las MDFs y están presentes en la secreción mucosa del animal.

*Hypselodoris villafranca* presenta longifolina y nakafurano-9 en las MDFs y glándula digestiva, en ejemplares del Mediterráneo, mientras que los ejemplares del Cantábrico presentan los 8 furanos mencionados para *H. cantabrica*, con idéntica localización, procediendo en ambos casos de origen dietético (*Dysidea fragilis* y otras esponjas similares). *Hypselodoris tricolor* presenta idénticos productos que *H. villafranca* del Cantábrico, con igual localización, origen y función. *Hypselodoris fontandraui* e *Hypselodoris* sp presentan similares compuestos y estrategias defensivas, si bien no todos los compuestos han podido ser identificados.

*Hypselodoris orsini* utiliza una estrategia defensiva basada en compuestos derivados del scalaradial (sesterterpeno), compuesto de la esponja *Cacospongia mollior*, que acumula preferentemente en las MDFs y glándula digestiva. Estos metabolitos son completamente distintos a los mencionados hasta ahora para las demás especies de *Hypselodoris*.

*Chromodoris lutorosea* presenta compuestos con 20 átomos de Carbono (diterpenoides), distintos según su localidad de procedencia y localizados en el borde del manto (donde se hallan las MDFs) y hepatopáncreas, que proceden seguramente de esponjas relacionadas con *Aplysilla*, *Chelonaplysilla*, etc. y que el nudibranquio probablemente utiliza para su defensa. *C. lutorosea* de Asturias presenta macfarlandina A, luteorosina, polyrhaphina C, norrisolide y chelonaplysina C. *Chromodoris purpurea*, *C. krohni* y *C. britoi* presentan similares o iguales compuestos y la misma estrategia defensiva.

*Doris verrucosa* presenta, en poblaciones de distintos lugares, los mismos metabolitos: verrucosinas y xylosil-MTA. Las primeras se localizan

en el manto y son biosintetizadas por el animal, teniendo potentes efectos (ictiotóxicos y otros). La xylosil-MTA se localiza en glándula hermafrodita y puesta y podría estar implicada en la fisiología de la reproducción y/o desarrollo de la puesta, así como en su protección. Una oxima del ácido pirúvico, procedente de la esponja *Hymeniacidon sanguinea*, establece una clara relación depredador-presa. *Peltodoris atromaculata* acumula en la glándula digestiva las petroforminas de *Petrosia ficiformis*, que presentan varias actividades tóxicas.

*Dendrodoris limbata* presenta potentes sesquiterpenoides (olepupuana y otros) situadas en el borde del manto, y ésteres drimánicos localizados en la glándula hermafrodita y puesta, así como 7-deacetoxy-olepupuana en las branquias. Estos compuestos tienen efectos tóxicos y repelentes. El polygodial no se halla en los ejemplares en vivo, y es el resultado de la transformación de la olepupuana en el medio exterior. *Dendrodoris grandiflora* presenta una estrategia defensiva muy similar, si bien aparecen además otros productos minoritarios que no han podido ser identificados. En *D. grandiflora* se detectan en la glándula digestiva terpenos de origen dietético procedentes de esponjas. En ambas especies la 7-deacetoxy-olepupuana podría ser el precursor de la olepupuana. *Doriopsilla areolata* presenta metabolitos no identificados localizados en el borde del manto, similares a los descritos para *Dendrodoris* spp, así como en las branquias y en algunas vísceras. Del resto de especies analizadas, 7 presentan secreción ácida y 24 presentan otros compuestos de interés.

Se ha revisado la bibliografía existente hasta la fecha sobre este tema, agrupando las sustancias según su estructura, origen, localización y función. Se ha realizado un catálogo de las sustancias presentes en opistobranquios del Mediterráneo Occidental y Atlántico próximo, según su origen y actividad. Asimismo se valora la contribución que estas moléculas hacen a la taxonomía del grupo.

Se discute el papel que las sustancias naturales desempeñan en la defensa de estos moluscos, así como se revisan los puntos de vista anteriores sobre el tema a la luz de los conocimientos actuales, y en relación a la coloración que estos animales exhiben. Se proponen varias clasificaciones

para los tipos de defensa química en Opisthobranchios. Para las defensas químicas obtenidas de la dieta se propone la denominación de cleptoquimiodefensas.

La existencia de coloraciones aposemáticas, círculos de mimetismo, automimetismo, polimorfismos, y otras consideraciones ecológicas como las relaciones depredador-presa, la simpatria, la coevolución, y las estrategias de la K y la r, se revisan y discuten en función de las aportaciones del estudio químico en cada caso. Del mismo modo, se modifican los grupos de Opisthobranchios que se pueden establecer según su sistema defensivo.

Las estrategias defensivas en Doridáceos incluyen una gran variedad de mecanismos químicos que van desde la obtención de metabolitos de la presa, su acumulación y localización específica (*Hypselodoris* y *Chromodoris* spp), su posible transformación, etc., hasta la fabricación de moléculas mediante biosíntesis (*Doris verrucosa*), incluyendo casos de vías biosintéticas multifuncionales (*Dendrodoris* spp), en las que los metabolitos pueden incluso hallarse en las puestas. Esta visión particular de lo que se observa en Doridáceos es seguramente aplicable a otros Opisthobranchios.

Se concluye que este tipo de trabajos, utilizando metodología química con un enfoque ecológico, para resolver cuestiones biológicas, permite obtener resultados novedosos e interesantes que no podrían conseguirse sin un acercamiento pluridisciplinar.

Opisthobranch molluscs have developed sophisticated mechanisms of defense, including chemical defense. These mechanisms allow them the reduction or even loss of their principal mechanical defense, their shell. The knowledge of the origin (dietary or biosynthetic), the location in the animal and the activity or function in the ecosystem of the natural products of Opisthobranch molluscs are the main objectives of this Doctoral Thesis. Sixteen species of Mediterranean and Atlantic Doridacea have been studied. Details on the structure, origin, location and function of their metabolites are described. Other unknown or few known characteristics of the species have been studied and described (such as detailed studies of the radula and mantle by SEM, or histological and cytological studies by light microscopy and TEM). Other 39 species have been preliminarily studied.

Samples have been collected by immersion, trawling or dredging in the Napolitan, Catalan and Asturian shores. Chemical methods have followed the usual methodology: extraction, TLC analysis, isolation, purification and identification of metabolites. Different kinds of experiments, both in aquaria and in the field, using chemical extracts or substances from Opisthobranch have been carried out. The egg masses of some species have been cultured, and specimens of some species have been kept in the laboratory for more than one year to study their growth.

In *Hypselodoris* species, *Hypselodoris cantabrica* presents some organic molecules with 15 Carbon atoms (sesquiterpenes): longifolin, tavacfuran, nakafuran-9, dendrolasin, agassizin, *ent*-furodysin, *iso*-nakafuran-9, and *iso*-dehydro-dendrolasin. These furanic compounds are located in the digestive gland and MDFs (mantle dermal formations) near gills and rinophores and they show fish-feeding deterrent activity. The chemical structure of these substances and their location in the animal supports a defensive strategy related to predation on sponges (*Dysidea fragilis*).

*Hypselodoris webbi* is able to select, in different geographic areas, sponges rich in furanosesquiterpenes which display both toxic and deterrent

activities. The diet of *H. webbi* is based on sponges with high presence of longifolin and other furans as nakafuran-9 or *iso-tavacuran*

*Hypselodoris villafranca* from the Mediterranean Sea presents longifolin and nakafuran-9 in MDFs and digestive gland, while animals from the Cantabrian Sea presents the same 8 furans already mentioned for *H. cantabrica*, with identical location and dietary origin. *Hypselodoris tricolor* shown identical compounds to *H. villafranca* from the Cantabrian Sea, with the same location, origin and function. *Hypselodoris fontandraui* and *Hypselodoris* sp present similar compounds and defensive strategies than *H. villafranca* and *H. tricolor*, although not all the compounds have been identified.

*Hypselodoris orsini* seems to use a defensive strategy based on the accumulation of compounds derived from scalarial in the MDFs and digestive gland. These metabolites (sesterterpenes) are obtained from its diet, the sponge *Cacospongia mollior* and are very different from the previously mentioned for the rest of species of the genus *Hypselodoris*.

In *Chromodoris* species, *Chromodoris luteorosea* has compounds with 20 atoms of Carbon (diterpenoids). These compounds, different depending on their collection site, are accumulated in the border of the mantle (where the MDFs are situated) and the digestive gland. These products, that the nudibranch probably use for defense, are obtained from sponges related to *Aplysilla*, *Chelonaplysilla*, etc. *C. luteorosea* from Asturias has macfarlandin A, luteorosin, polyrhaphin C, norrisolide and chelonaplysin C. Other *Chromodoris* species as *Chromodoris purpurea*, *C. krohni* and *C. britoi* present the same or similar compounds and identical defensive strategy.

*Doris verrucosa* from different localities has the same metabolites: verrucosins and xylosil-MTA. Verrucosins are located in the mantle and are biosynthesized by the animal. Verrucosins have strong activities (ichthyotoxicity and others). Xylosil-MTA is found in the hermaphroditic gland and the egg masses. Both group of compounds could be implicated in the physiology of reproduction and/or development, as well as in the protection of the egg masses. A pyruvic acid oxime from the sponge



*Hymeniacion sanguinea*, clearly allows to establish a prey-predator relationship.

*Peltodoris atromaculata* accumulates in the digestive gland the petroformynes from *Petrosia ficiformis*. This petroformynes shown some toxic effects.

In *Dendrodoris* species, *Dendrodoris limbata* presents active sesquiterpenoids (olepupane and others) located in the border of the mantle, drimanic esters in the hermaphroditic gland and the egg masses, as well as 7-deacetoxy-olepupane in the gills. Some of these compounds display both toxic and deterrent activities. Polygodial is not present in the animal alive, and it is the result of transformation of olepupane. *Dendrodoris grandiflora* has a very similar defensive strategy, although other minority compounds, not identified, are also present. The digestive gland of *D. grandiflora* contains terpenes from dietary origin, obtained from several sponges. In both species, 7-deacetoxy-olepupane can be the precursor of olepupane.

*Doriopsilla areolata* presents unidentified compounds located in the border of the mantle gills and viscera, similar to the previously described compounds for *Dendrodoris* spp. From the rest of studied species, 7 of them have acid secretion and 24 present other interesting compounds.

Literature on this topic has been reviewed. A catalogue, with data of the origin and activity, of the substances from Opisthobranchs from Western Mediterranean and near Atlantic is presented. Furthermore, an evaluation of the contribution of natural products to the taxonomy of Opisthobranchs has been exposed.

The role that natural products have in the defense of these molluscs have been discussed matching previous interpretations on these topic. A new classification of chemical defenses in Opisthobranchs is given. The name cleptochemodefenses is proposed for chemical defenses obtained from the diet.

The existence of aposematic colorations, mimicry circles, automimicry, polymorphism and other ecological considerations, such as prey-predator relationships, sympatry, coevolution and K- and r- strategies are revised and discussed on the light of the chemical approach for each case. The classification of Opisthobranchs, depending on their defensive system, is modified according to previous ones.

Defensive strategies in Doridacea include a big variety of chemical mechanisms, going from acquisition of metabolites from diet, accumulation and specific location (*Hypselodoris* and *Chromodoris* spp), their transformation, etc., to the elaboration of molecules by *de novo* biosynthesis (*Doris verrucosa*), including cases of multifunctional biosynthetic pathways (*Dendrodoris* spp), in which metabolites can be found also in egg masses. This particular vision about Doridacea is useful also for other Opisthobranchs.

In conclusion, using chemical methods, with an ecological perspective, to answer biological questions, allows us to obtain new and interesting results that would not be obtained without this pluridisciplinary approach.

### **3. INTRODUCCION Y OBJETIVOS**

### 3.1. Introducción.

Los productos naturales obtenidos de organismos marinos han atraído la atención de muchos investigadores de campos diversos en las últimas décadas. En el caso de los moluscos, la "utilidad" de estas sustancias se conoce desde los tiempos de Dioscórides y Plinio el Viejo (Caprotti, 1977), como indican los párrafos siguientes, haciendo referencia a las liebres de mar (*Aplysia depilans*, según Caprotti, *op.cit.*):

*"La lepre marina è come una picciola loligine. Fatta in linimento fa cadere i peli per se sola, e parimente con la ortica marina".* (Dioscórides, De Materia Medica, Libro II, Cap. XVIII).

*"Non meno mirabile ciò che si dice della lepre di mare. Per alcuni è un veleno, se dato con cibo o con liquidi, per altri alla sola vista, poichè se le donne gravide vedono una femmina di questa specie, subito hanno nausea, vomito ed infine abortiscono. Come antidoto, si fa indurire il maschio nel sale e lo si porta come bracciale".* (Plinio el Viejo, Historia naturalis, Libro XXXI, Cap. III).

*"L'avvelenamento da lepre di mare si guarisce con ippocampi presi in bevanda".* (idem, Cap. V).

*"La lepre marina in se è velenosa, ma la sua cenere impedisce che ricrescano i peli inutili delle palpebre, che sono già stati tolti; per questo uso sono le lepre marine più piccole che sono le migliore,..."*. (idem, Cap. VII).

Halstead (1965) recopiló la información existente sobre los productos de *Aplysia*, incluso tratando de localizar en que partes del cuerpo se hallaba el "veneno", detallando algunos aspectos médicos, así como su posible tratamiento.

Asimismo, la especie *Dolabella auricularia* se conocía desde los tiempos de griegos y romanos por sus aplicaciones médicas. Concretamente en el año 200 a.C. el griego Nicandros recomendaba sus extractos para tratar

algunas enfermedades. Muy posteriormente se halló en dicha especie la sustancia antineoplásica más potente conocida hasta la fecha (Pettit *et al.*, 1989d).

En épocas más modernas (en las últimas décadas), el interés principal de la química de las sustancias naturales era caracterizar los metabolitos. Posteriormente se hizo énfasis en las toxinas terrestres y las sustancias con interés en medicina. La investigación sobre las toxinas marinas empezó en los años 60, coincidiendo con el inicio de un importante desarrollo de la sistemática en organismos marinos. Por ejemplo, en una revisión sobre biotoxinas marinas (Courville *et al.*, 1958) se mencionaban únicamente dos gasterópodos: el género *Conus*, del que no se conocía la naturaleza química de su toxina, y *Murex*, en el que se había hallado la murexina. En 1967 otra revisión sobre toxinas de origen animal realizada por Russell, mencionaba en el capítulo referente a moluscos únicamente una toxina, hallada por Winkler (1961) en *Aplysia vaccaria* y *A. californica*, que causaba la muerte al ser inyectada en ratones. Así pues, los primeros productos naturales de opistobranquios fueron hallados en aplisiáceos (Winkler, 1961; Yamamura e Hirata, 1963). Bakus (1969) citaba ya 46 especies tóxicas de moluscos. La investigación multidisciplinaria, incluyendo las implicaciones biológicas y ecológicas de las sustancias naturales, empezó mucho más tarde, en los 80. Un hecho destacable es que, de entre los moluscos, los gasterópodos marinos (de los que se conocen unas 22.000 especies según Hughes, 1986) han recibido una atención mucho mayor por parte de los químicos que el resto (Scheuer, 1977a).

En la gráfica de la Figura 3.1. se pueden observar las especies de moluscos opistobranquios (de los que se citan unas 3000 especies según Thompson (1976), aunque en la actualidad podrían ser casi el doble) mencionadas en sucesivas revisiones bibliográficas sobre sustancias naturales de origen marino. Es notorio el incremento de especies estudiadas en los últimos años, como indica la hipotética curva de regresión, que es claramente exponencial.

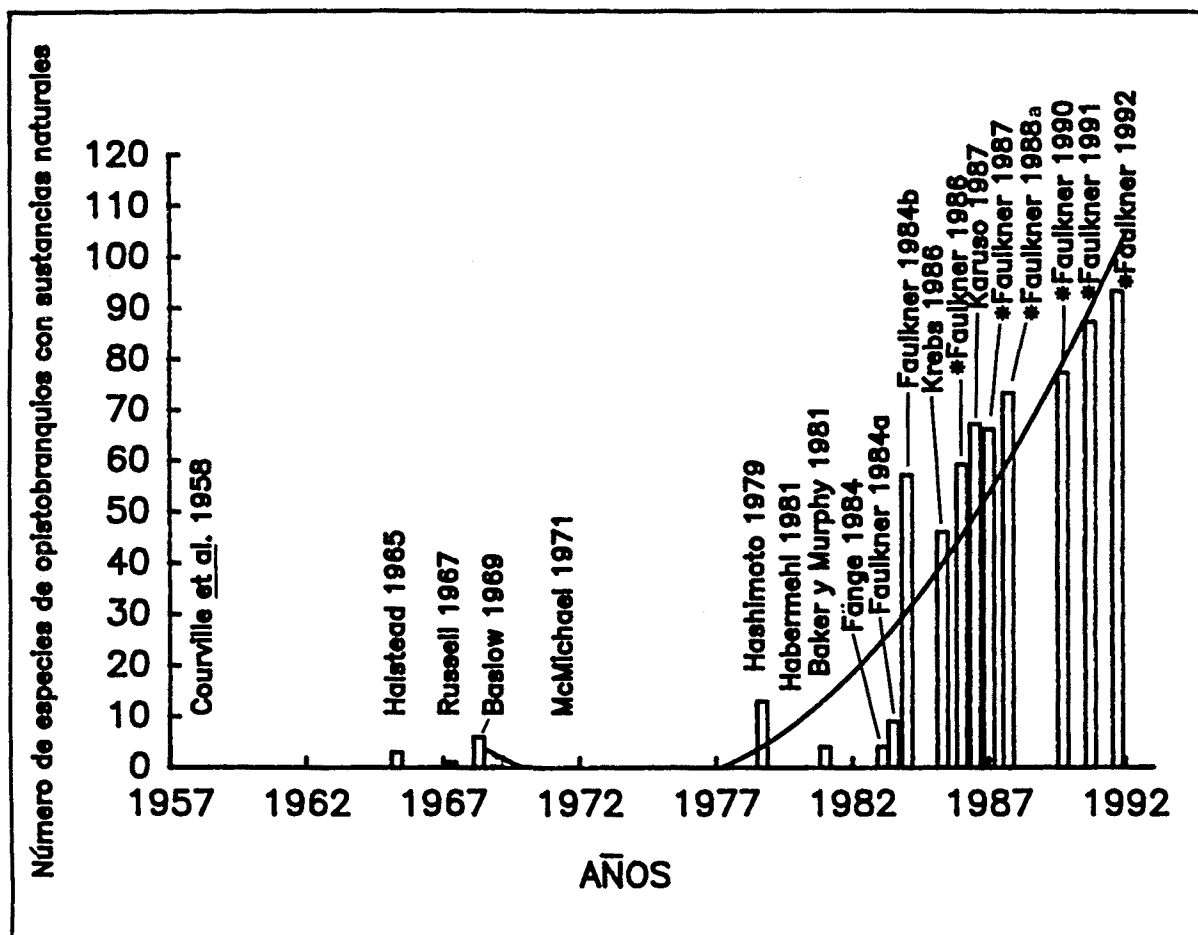


Figura 3.1. Número de especies de opistobranquios que presentan sustancias naturales de interés. (\*= valores obtenidos sumando las especies mencionadas a las de la revisión anterior, sin repetición).

Es necesario recordar que este interés creciente por las sustancias naturales de organismos marinos ha ido acompañado de grandes mejoras en las técnicas de recolección de ejemplares (inmersión y dragado) y en métodos químicos de aislamiento y nuevo instrumental analítico más moderno (von Berlepsch, 1980).

Si bien en el apartado de discusión referente a las sustancias químicas se exponen algunos conceptos básicos, se mencionará aquí una idea esencial sobre el metabolismo secundario. Glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos son las moléculas fundamentales que forman la materia viva y reciben el nombre de metabolitos primarios, siendo en todos los organismos bastante similares (Manitto, 1981). En contraste, los metabolitos secundarios

presentan una distribución restringida, son mucho más heterogéneos e importantes a nivel del organismo (y no a nivel estrictamente celular) (Luckner, 1984), y además su función es casi siempre desconocida (Torrsell, 1983). Si bien las plantas aparecen como las máximas productoras de estas sustancias, es necesario recordar que los animales eliminan muchos productos via riñones u otros órganos excretores, mientras que las plantas los almacenan. Este hecho facilita su posterior transformación y explica la gran multiplicidad de sus metabolitos (Luckner, 1984). Una toxina sería una sustancia con efecto fisiológico adverso para un organismo vivo (Hashimoto, 1979). Como referencia obligada, en el trabajo de Ros (1976b) sobre los sistemas de defensa en los opistobranquios se pueden hallar las explicaciones relativas a la nomenclatura ecológica pertinente: cleptodefensas, defensas primarias y secundarias, crípsis, etc., que a nivel general se detallan en Edmunds (1974) y Margalef (1982).

Desde siempre se ha dedicado una gran atención a las nuevas estructuras moleculares obtenidas de organismos marinos, y en particular de moluscos Opistobranquios (Scheuer, 1977a, 1981, 1982; Schulte *et al.*, 1980; Schulte y Scheuer, 1982; Faulkner, 1984a y b, 1986, 1987, 1988a y b, 1990, 1991, 1992; Cimino *et al.*, 1986a; Krebs, 1986; Karuso, 1987). Por otro lado, los trabajos sobre ecología y biología de opistobranquios seguían en general una vía independiente, acorde con la especialización de sus autores (Thompson, 1960a, b, y c, 1976; Thompson and Brown, 1984; Edmunds, 1966a y b, 1968a, 1987; Stasek, 1967; Harris, 1971, 1973; Ros, 1976b, 1978a y b; García *et al.*, 1991). Pocos estudios relacionaban la biología y la ecología con los fenómenos químicos: Fenical *et al.*, 1979; Sodano, 1982; Faulkner y Ghiselin, 1983; Bakus, 1986; Scheuer, 1987; Hay y Fenical, 1988; Paul, 1988; Cimino *et al.*, 1990c; Paul *et al.*, 1990; y Scheuer, 1990; estas citas se refieren a ciertas especies en concreto o bien a grupos reducidos de especies.

En 1969 se inició en el I.C.M.I.B. de Nápoles una línea de estudio sobre productos naturales de organismos marinos, aunque el análisis de opistobranquios no empezó hasta 1978 (Castiello *et al.*), en que se publicó su primer trabajo con la especie *Peltodoris atromaculata*. Un enfoque completamente distinto en este campo fue iniciado recientemente en el C.E.A.B. de Blanes, tratando de relacionar la estructura de las comunidades

con la actividad química en organismos bentónicos (Uriz *et al.*, 1991). Ambos tipos de enfoque pretenden contribuir a esclarecer el papel que los productos naturales desempeñan a distintos niveles.

Situados en este marco, este trabajo se ha basado en las observaciones "de campo" que planteaban una problemática ecológica, a las cuales se ha tratado de dar una respuesta química. Esta respuesta a través de la química de las sustancias naturales debe entenderse como una contribución al conocimiento de la biología y ecología de los moluscos opisthobranchios. Esta aproximación al tema ha ido dirigida básicamente a conocer la estructura de estas moléculas, su origen, su localización en el organismo y su función en el ecosistema. Para ello, se ha trabajado especialmente con Doridáceos del Mediterráneo y Atlántico próximo, y concretamente con 16 especies, mientras que se han realizado estudios preliminares (resumidos en el apartado 5.17.) en otras 39 especies. Las 16 especies que constituyen el grueso de esta Tesis se han seleccionado por su interés ecológico, por presentar distintos tipos de estrategias, por su relación de depredación con esponjas, y por la mayor facilidad para recolectarlas respecto a otras especies.

Es necesario destacar la originalidad de este trabajo, no sólo porque en el resto del mundo no se habían realizado estudios similares (con excepción de ciertos estudios del grupo de La Jolla, California), sino también por ser pioneros en el entorno geográfico (Mediterráneo y Atlántico próximo), en el uso novedoso de ciertas técnicas de metodología química al servicio de la biología (por ejemplo, ver el caso de los espectros NMR de la olepupuana obtenidos en *Dendrodoris limbata*), y por las características de los temas propuestos y los resultados obtenidos. En este sentido cabe señalar la importancia de una aproximación pluridisciplinaria a este tipo de cuestiones, que no hubiera sido posible resolver de otro modo.

Las 7 especies del género *Hypselodoris* estudiadas en esta Tesis, presentaban gran atractivo ya que, en 1982 se había hallado una interesante molécula, la longifolina (Cimino *et al.*), y posteriormente se había realizado un estudio en que esta sustancia parecía estar relacionada con unas estructuras del manto llamadas MDFs (García *et al.*, 1990), como veremos más adelante. Por todo ello, conocer exactamente dónde se localizaba esta



sustancia, cuáles eran su origen y su función, y si existían otras moléculas parecidas o similares en la misma especie u otras especies del género, era de gran interés.

Una de las especies del género *Chromodoris* fue objeto de un estudio químico (Cimino *et al.*, 1990b) en el que se hallaron 4 productos. Era de interés conocer si existía variabilidad geográfica en las sustancias presentadas por individuos de poblaciones distintas, si la estrategia de acumulación y almacenamiento de los metabolitos era similar a la hallada en *Hypselodoris*, si existían otras sustancias similares en otras especies del género, y averiguar cuáles eran su origen y su función.

El resto de especies parecían presentar estrategias diferentes a *Hypselodoris* y *Chromodoris*. *Dendrodoris* spp, *Doris verrucosa* y *Peltdoris atromaculata* habían sido ya objeto de varios estudios químicos (ver referencias en los apartados correspondientes), por lo que existía una buena base sobre la que desarrollar este nuevo enfoque de trabajo. Interesaba particularmente averiguar el origen, la localización y la función de los metabolitos ya conocidos, y la estructura de los nuevos productos aislados. La especie *Doriopsilla areolata*, al igual que la mayoría de especies de cromodorídidos, no había sido analizada químicamente con anterioridad.

Se han incluido también en este trabajo, otros datos de tipo diverso, no descritos anteriormente, sobre la zoología y biología de las especies estudiadas (fotografías de la rádula, histología y citología, desarrollo, etc.). Los experimentos realizados para tratar de averiguar la función ecológica de algunas sustancias tienen un carácter preliminar, habiendo sido incluidos por su interés y por lo novedoso de la metodología en ciertos casos. Estos experimentos constituyen una aplicación de los conocimientos adquiridos, mediante los análisis químicos, a la comprensión de los mecanismos de interacción en el ecosistema. Los apartados dedicados a la ultraestructura son también novedosos, ya que únicamente dos de las especies estudiadas habían sido analizadas anteriormente en profundidad. Además en los capítulos de discusión se incluye una recopilación bibliográfica de las sustancias naturales conocidas en moluscos opisthobranchios según su estructura, origen, localización y función, que sirve de base para la discusión.

Esta revisión a nivel mundial ha sido necesaria para el desarrollo de nuestro trabajo, ya que nos ha permitido ver con mayor claridad los distintos tipos de estrategias químicas defensivas presentes en moluscos Opisthobranchios, (y además, visto que los datos químicos no estaban al alcance de los biólogos, y viceversa, de este modo nos parecen mucho más asequibles). Nos parece necesario resaltar la dificultad que conlleva una revisión de este tipo, no sólo por el volumen de bibliografía revisado, sino porque los datos de interés biológico y ecológico, indispensables para realizar una revisión crítica de este tipo, no se extraen fácilmente de los trabajos químicos (en los que hasta ahora eran marginales).

Debido a la diversidad de los resultados obtenidos hemos creído conveniente exponerlos ordenados por especies para facilitar su seguimiento. Esta Tesis se ha estructurado de modo que para cada especie se incluye un apartado de resultados y discusión, y otro de conclusiones, mientras que en la parte final se expone la revisión bibliográfica y una discusión general.

## **3.2. Objetivos.**

Los objetivos básicos que pretende cubrir esta Tesis, y que ya han sido comentados ampliamente en el apartado 3.1., se resumen del siguiente modo:

- 1) Determinar la estructura química de las sustancias naturales de ciertas especies de moluscos opisthobranchios.
- 2) Averiguar el origen de dichas moléculas (dietético o mediante biosíntesis).
- 3) Conocer la localización de los metabolitos en el organismo.
- 4) Establecer su mecanismo de acción y su función.
- 5) Conocer los sistemas de protección en el animal contra la autotoxicidad.
- 6) Completar el conocimiento sobre algunas características concretas de las especies estudiadas.
- 7) Recopilar de manera útil la bibliografía y la información existente en este campo hasta la actualidad.
- 8) Aportar una nueva herramienta de trabajo a la moderna taxonomía.

## **4. MATERIAL Y METODOS**

## **4.1. Recolección e identificación de muestras.**

### **4.1.1. Localidades de muestreo.**

Se ha muestreado básicamente en localidades situadas en tres zonas: el Mediterráneo catalán, el Tirreno y el Cantábrico. En ellas se sitúan la mayoría de nuestros puntos de muestreo, como se puede observar en los mapas de la Figura 4.1. En las Islas Baleares, se recogieron muestras en distintas localidades de la isla de Formentera, que se detallan en los apartados de las especies pertinentes. Se han analizado también ejemplares de Sagres (Portugal), y de las Islas de Cabo Verde, Angola y las islas Canarias, y de la bahía de Algeciras y el Mar de Alborán, en base a material cedido en todos estos casos por otros investigadores (J. Ortea y J.C. García).

Del litoral italiano, además del Tirreno se capturaron ejemplares en el mar Jónico, concretamente en Taranto (señalado con un punto sin nombre en el mapa correspondiente), y en Crotone. En la isla de Sicilia se obtuvieron ejemplares de la localidad de Taormina (también señalada con un punto sin nombre sobre el mapa de la isla). Otro lugar donde se muestreó y que no figura en el mapa de la página siguiente es Fiumicello (Maratea) en Calabria, así como Castellammare di Stabia (en las proximidades de Torre Annunziata y la Península Sorrentina), y Sibari (en las cercanías de Taranto).

Otras localidades de procedencia de algunos ejemplares son Waquoit Bay (Massachusetts) y La Jolla (California) ambos en los E.E.U.U., así como el Mar de Ross (Tethys Bay) en la Antártida (este último material fue capturado por la expedición italiana de 1990; Ref. Camp MOR49).

Las localidades más frecuentemente muestreadas han sido: a) las zonas rocosas esciáfilas de entre 0 y 15 m de profundidad del litoral tirreno y catalán mediante inmersión y b) los intermareales rocosos del Cantábrico. Se han realizado aproximadamente un centenar de inmersiones y se han estudiado unas 20 muestras de material procedente de arrastre de los barcos pesqueros con base en los puertos de Blanes (Girona) y Arenys de Mar (Barcelona). Los ejemplares procedentes de Llavaneres fueron recogidos por los barcos de Arenys de Mar.

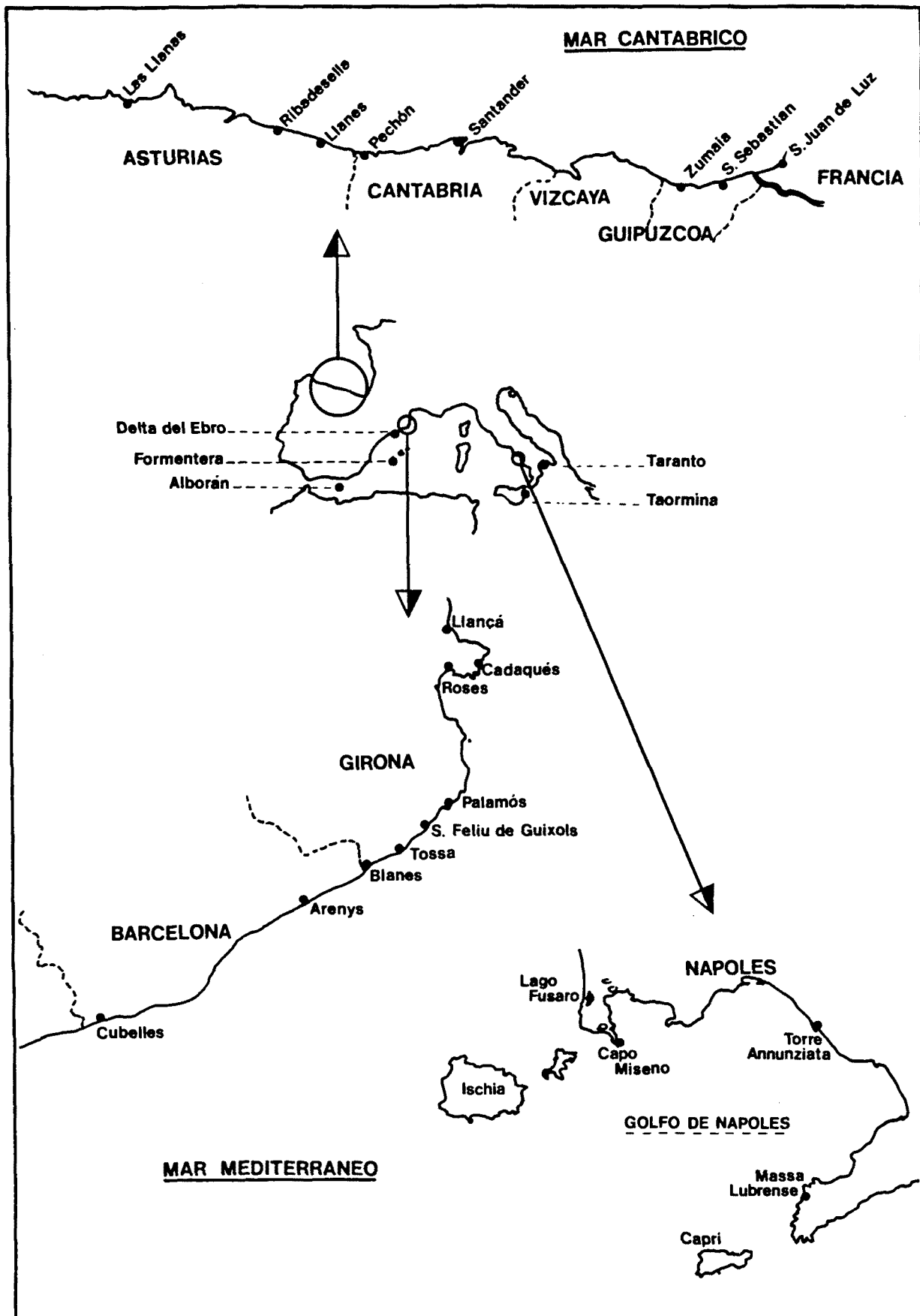


Figura 4.1. Mapa de las localidades de muestreo.

#### 4.1.2. Listado de ejemplares capturados.

En la Tabla 4.1 se detalla para cada especie el número de ejemplares capturados y la localidad de captura. Las fechas de recolección y otros datos se exponen en el apartado relativo a cada especie en particular, si bien la mayoría se recogieron entre 1988 y 1992, para las especies principales. Las localidades y fechas de captura de los ejemplares del apartado 5.17. se incluyen en la Tabla 4.1., en la que las especies se hallan ordenadas según la clasificación del apartado 4.1.3.

Los ejemplares fueron identificados según la bibliografía general (Schmekel y Portmann, 1982; Thompson, 1976; Thompson y Brown, 1984), y la bibliografía específica que se incluye en cada caso.

ESPECIE	LOCALIDAD	NUMERO DE EJEMPLARES	METODO DE CAPTURA
<i>Scaphander lignarius</i>	Blanes	7 (Enero-90)	AR
		8 (26-1-91)	AR
		1 (6-5-91)	AR
<i>Philine aperta</i>	Delta del Ebro	1 (Julio-91)	IM
	Blanes	1 (16-3-92)	DR
<i>Gastropteron meckeli</i>	Blanes	16 (Enero-90)	AR
		25 (28-8-91)	AR
	Algeciras	2 (Julio-89)	AR
<i>Philinopsis depicta</i>	Fusaro	1 (10-5-89)	IM
		24 puestas	
<i>Aglaja tricolorata</i>	Malgrat	2 (Junio-92)	IM
<i>Haminoea spp</i>	Fusaro	60 (5-4-89)	IM
	Delta del Ebro	100 puestas 2 (Julio-91)	IM
<i>Haminoea solitaria</i>	Waquoit Bay	32 (21-6-90)	IM
		12 puestas	
<i>Akera bullata</i>	Fusaro	1 (7-4-89)	IM
	Roses	1 puesta 9 (27-4-92)	IM

<i>Aplysia fasciata</i>	Delta del Ebro	18 (Julio-91)	IM
<i>Oxynoe olivacea</i>	Miseno	6 (18-3-89) 1 puesta	IM
<i>Elysia viridis</i>	Fusaro	52 (22-5-89)	IM
	Miseno	3 (20-2-90)	IM
<i>Elysia timida</i>	Ischia	1 (9-7-89)	IM
	Massa Lubrense	1 (1-4-90)	IM
	Ventotene	3 (20-5-90)	IM
<i>Thuridilla hopei</i>	Taranto	27 (11-10-88)	IM
	Miseno	5 (23-5-89)	IM
		3 (6-7-89)	IM
		2 puestas	
	Formentera	1 (29-10-89)	IM
		1 (30-10-89)	IM
Taormina	2 (6-4-90)	IM	
<i>Umbraculum mediterraneum</i>	Blanes	1 (6-5-91)	AR
	Capri	1 (20-9-92)	IM
<i>Pleurobranchus membranaceus</i>	Formentera	1 (27-10-89)	IM
<i>Berthella plumula</i>	San J. de Luz	1 (14-4-91)	IT
<i>Berthella aurantiaca</i>	Taranto	2 (11-10-88)	IM
	Santander	1 (Marzo-90)	IT
	S. J. de Luz	1 (14-4-91)	IT
<i>Berthella stellata</i>	S. J. de Luz	4 (14-4-91)	IT
<i>Berthella ocellata</i>	Taranto	1 (29-3-89)	IM
<i>Pleurobranchaea meckeli</i>	Blanes	1 (Febrero-90)	AR
		1 (5-4-90)	AR
		2 (Mayo-91)	AR
		1 (16-3-92)	DR
	Massa Lubrense	3 (21-3-90)	IM
	Llavaneres	12 (30-5-91)	AR
<i>Trapania maculata</i>	Formentera	1 (25-10-89)	IM
<i>Diaphorodoris luteocincta</i>	Blanes	1 (15-12-89)	IM
<i>Diaphorodoris papillata</i>	Blanes	1 (15-12-89)	IM
		3 (25-4-91)	IM
		1 puesta	
	Tossa de Mar	2 (27-2-91)	IM
		2 puestas	



<i>Limacia clavigera</i>	Las Llanas	24 (Abril-89)	IT
	Tossa de Mar	2 (27-2-91)	IM
	Ribadesella	2 puestas 1 (18-4-91)	IT
<i>Polycera quadrilineata</i>	Taranto	60 (29-3-89)	IM
	Blanes	3 (17-7-91)	IM
<i>Hypselodoris cantabrica</i>	Santander	29	IT
	Sagres	9	IM
	Las Llanas	52	IM/IT
	Zumaia	4	IT
	S. Juan de Luz	2	IT
	Llanes	1	IT
	Pechón	1	IT
	Ribadesella	1	IT
<i>Hypselodoris fontandraui</i>	Taormina	6	IM
<i>Hypselodoris webbi</i>	Castell. di Stabia	2	IM
	Formentera	1	IM
	Sibari	1	IM
	Blanes	3	IM
	Palamós	10	IM
	Tossa	1	IM
	Cadaqués	1	IM
<i>Hypselodoris villafranca</i>	Sagres	7	IM
	Taranto	86	IM
	Las Llanas	61	IT
	Formentera	3	IM
	Blanes	2	IM
	Santander	2	IT
<i>Hypselodoris tricolor</i>	Las Llanas	40	IT
	S. Juan de Luz	1	IT
	Santander	2	IT
<i>Hypselodoris sp</i>	Castell. di Stabia	7	IM
	Massa Lubrense	1	IM
<i>Hypselodoris orsini</i>	Blanes	24	IM
	Cadaqués	1	IM
	Fiumicello	6	IM
<i>Hypselodoris bilineata</i>	Blanes	2 (26-6-91)	IM
<i>Hypselodoris pinna</i>	Cabo Verde	8 (Agosto-85)	IM
<i>Chromodoris luteorosea</i>	Taranto	11	IM
	Las Llanas	50	IM
	Zumaia	1	IT
	Pechón	1	IT

<i>Chromodoris purpurea</i>	Taormina	2	IM
	Las Llanas	2	IM
	Zumaia	2	IT
	S. Juan de Luz	1	IT
	Blanes	1	IM
<i>Chromodoris krohni</i>	Miseno	1	IM
	Ischia	2	IM
	Las Llanas	2	IM
	Blanes	4	IM
<i>Chromodoris britoi</i>	Blanes	37	IM
	Cadaqués	33	IM
<i>Doris verrucosa</i>	Cubelles	36	IT
	Torre Ann.	10	IM
	Las Llanas	4	IM
	Angola	2	-
	S. Juan de Luz	3	IT
<i>Archidoris tuberculata</i>	Las Llanas	2 (10-12-89)	IT
	Santander	2 (Abril-91)	IT
	Blanes	3 (Sept.-86)	AR
<i>Austrodoris kerguelenensis</i>	Tethys Bay	7 (19-1-90)	AR
<i>Peltodoris atromaculata</i>	Blanes	16	IM
	St. Feliu	5	IM
	Massa	2	IM
	Taormina	8	IM
	Palamós	8	IM
	Tossa	15	IM
<i>Discodoris rosi</i>	Las Llanas	23 (Abril-89)	IT
<i>Platydoris argo</i>	Formentera	1 (26-10-89)	IM
	Miseno	1 (20-3-90)	IM
	Taormina	2 (6-4-90)	IM
<i>Dendrodoris limbata</i>	Taranto	5	IM
	Miseno	42	IM
	Formentera	2	IM
	Cadaqués	2	IM
	Blanes	21	IM
	Torre Annunz.	2	IM
	Llançá	2	AR
<i>Dendrodoris grandiflora</i>	Cubelles	40	IT
	Miseno	27	IM
<i>Dendrodoris languida</i>	Asturias	1 (27-10-88)	IT
	Santander	1 (27-3-90)	IT

<i>Dendrodoris subpellucida</i>	La Habana	3 (Junio-88)	IM
<i>Doriopsilla areolata</i>	Cubelles	1	IT
	Las Llanas	2	IM
	Alborán	1	IT
	Santander	6	IT
	Blanes	40	AR
	Algeciras	12	IM
<i>Doriopsilla pharpa</i>	Waquoit Bay	2 (Julio-90)	IM
<i>Doriopsilla ciminoi</i>	Cabo Verde	2 (Agosto-85)	IM
<i>Tritonia nilsodhneri</i>	Blanes	5 (14-9-89)	IM
	Cadaqués	20 (17-2-90)	IM
		12 puestas	
<i>Tritonia striata</i>	Blanes	1 (14-9-89)	IM
<i>Marionia blainvillea</i>	Blanes	2 (6-5-91)	AR
		1 (14-5-91)	AR
<i>Tethys fimbria</i>	Blanes	2 (14-5-91)	AR
	Llavaneres	3 (30-5-91)	AR

Tabla 4.1. Localidades, métodos de captura y número de ejemplares (y fecha de recolección para las especies del apartado 5.17). (IM= Inmersión; IT= intermareal; AR= arrastre; DR= dragado).

Junto a estas especies se han capturado otros organismos susceptibles de ser depredados por los opistobranquios o con el fin de realizar algunos experimentos, tales como las esponjas: *Hymeniacidon sanguinea* (Cubelles), *Laxosuberites ferrerhernandezii* (Torre Annunziata), *Dysidea fragilis* (Taranto y Blanes), *Dysidea avara* (Blanes), *Cacospongia mollior* (Blanes), *Pleraplysilla spinifera* (Blanes), *Petrosia ficiformis* (Blanes) y otras; y las algas *Caulerpa prolifera* (Miseno) y *Sphaerococcus coronopifolius* (Blanes).

Otras especies utilizadas en los tests de experimentación fueron los peces de aguas salobres o dulces *Gambusia affinis* y *Carassius auratus*, (obtenidos en tiendas de acuarios), y otras especies marinas como *Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris* y *Trypterigion tripteronotus* procedentes de Blanes, así como el crustáceo *Dardanus arrosor* y los equinodermos *Paracentrotus lividus* y *Echinaster sepositus*.

#### 4.1.3. Clasificación.

La clasificación taxonómica de las especies recolectadas es la siguiente, de acuerdo con Cervera *et al.* (1988), y otros autores:

##### **Orden Cephalaspidea Fischer, 1883.**

###### . Superfamilia Philinoidea Gray, 1850.

- Familia Scaphandridae G.O. Sars, 1878.

Género *Scaphander* Montfort, 1810.

*Scaphander lignarius* (Linné, 1758).

- Familia Philinidae Gray, 1850

Género *Philine* Ascanius, 1772.

*Philine aperta* (Linné, 1767).

- Familia Gastropteridae Swainson, 1840.

Género *Gastropteron* Koose, 1813.

*Gastropteron meckeli* Kosse, 1813.

- Familia Aglajidae Renier, 1807.

Género *Aglaja* Renier, 1807.

*Aglaja tricolorata* Renier, 1807.

Género *Philinopsis* Pease, 1860.

*Philinopsis depicta* (Renier, 1807).

###### . Superfamilia Haminoeidea Pilsbry, 1895.

- Familia Haminoeidae Pilsbry, 1895.

Género *Haminoea* Turton y Kingston, 1830.

*Haminoea* sp

*Haminoea solitaria* (Say, 1822).

##### **Orden Anaspidea Fischer, 1883.**

- Familia Akeridae Odhner, 1922.

Género *Akera* Müller, 1776.

*Akera bullata* Müller, 1776.

- Familia Aplysidae Lamarck, 1809.

Género *Aplysia* Linné, 1767.

*Aplysia fasciata* Poiret, 1789.

**Orden Sacoglossa Bergh, 1876.**

- . Suborden Conchoidea Gascoigne, 1985.
  - Familia Oxynoidae Fischer, 1883.
    - Género *Oxynoe* Rafinesque, 1819.
      - Oxynoe olivacea* Rafinesque, 1819.
- . Suborden Aconchoidea Gascoigne, 1985.
  - Familia Elysiidae H. y A. Adams, 1854.
    - Género *Elysia* Risso, 1818.
      - Elysia viridis* (Montagu, 1804).
      - Elysia timida* (Risso, 1818).
    - Género *Thuridilla* Bergh, 1872.
      - Thuridilla hopei* (Vérany, 1853).

**Orden Notaspidea Fischer, 1883.**

- . Suborden Umbraculacea Dall, 1889.
  - Familia Umbraculidae Dall, 1889.
    - Género *Umbraculum* Schumacher, 1817.
      - Umbraculum mediterraneum* (Lamarck, 1812).
- . Suborden Pleurobranchacea Férussac, 1822.
  - Familia Pleurobranchidae Férussac, 1822.
    - . Subfamilia Pleurobranchinae Férussac, 1822.
      - Género *Pleurobranchus* Cuvier, 1805.
        - Pleurobranchus membranaceus* (Montagu, 1803).
      - Género *Berthella* Blainville, 1824.
        - Berthella plumula* (Montagu, 1803).
        - Berthella aurantiaca* (Risso, 1818).
        - Berthella stellata* (Risso, 1826).
        - Berthella ocellata* (Delle Chiaje, 1828).
    - . Subfamilia Pleurobranchaeinae Pilsbry, 1896.
      - Género *Pleurobranchaea* Meckel en Leue, 1813.
        - Pleurobranchaea meckeli* Blainville, 1825.

**Orden Nudibranchia Blainville, 1814.**

. Suborden Doridacea Odhner, 1934.

. Superfamilia Anadoridoidea Odhner, 1939.

- Familia Goniodorididae H. y A. Adams, 1854.

Género *Trapania* Pruvot-Fol, 1931.

*Trapania maculata* Haefelfinger, 1960.

- Familia Onchidorididae Alder y Hancock, 1845.

Género *Diaphorodoris* Iredale y O'Donoghue, 1923.

*Diaphorodoris luteocincta* (Sars, 1870).

*Diaphorodoris papillata* Portmann y Sandmeier, 1960.

- Familia Polyceridae Alder y Hancock, 1845.

Género *Limacia* O. F. Müller, 1781.

*Limacia clavigera* (O. F. Müller, 1776).

Género *Polycera* Cuvier, 1817.

*Polycera quadrilineata* (O. F. Müller, 1776).

. Superfamilia Eudoridoidea Odhner, 1934.

- Familia Chromodorididae Bergh, 1891.

Género *Hypselodoris* Stimpson, 1855.

\**Hypselodoris cantabrica* Bouchet y Ortea, 1980.

\**Hypselodoris fontandraui* (Pruvot-Fol, 1951).

\**Hypselodoris webbi* (D'Orbigny, 1839).

\**Hypselodoris villafranca* (Risso, 1818).

\**Hypselodoris tricolor* (Cantraine, 1835).

\**Hypselodoris* sp.

*Hypselodoris bilineata* (Pruvot-Fol, 1953).

\**Hypselodoris orsini* (Vérany, 1846).

*Hypselodoris pinna* Ortea, 1988.

Género *Chromodoris* Alder y Hancock, 1855.

\**Chromodoris luteorosea* (Rapp, 1827).

\**Chromodoris purpurea* (Laurillard, 1831).

\**Chromodoris krohni* (Vérany, 1846).

\**Chromodoris britoi* Ortea y Pérez, 1983.

- Familia Dorididae Rafinesque, 1815.

Género *Doris* Linné, 1758.

\**Doris verrucosa* Linné, 1758.

- Familia Archidorididae Bergh, 1892.
  - Género *Archidoris* Bergh, 1879.
    - Archidoris tuberculata* (Müller, 1778).
  - Género *Austrodoris* Odhner, 1926.
    - Austrodoris kerguelenensis* (Bergh, 1884)
- Familia Discodorididae Bergh, 1891.
  - Género *Peltodoris* Bergh, 1880.
    - \**Peltodoris atromaculata* Bergh, 1880.
  - Género *Discodoris* Bergh, 1877.
    - Discodoris rosi* Ortea, 1979.
- Familia Platydorididae Bergh, 1891.
  - Género *Platydoris* Bergh, 1877.
    - Platydoris argo* (Linné, 1767).
- . Superfamilia Porodoridoidea Odhner en Franc, 1968.
- Familia Dendrodorididae O'Donoghue, 1924.
  - Género *Dendrodoris* Ehrenberg, 1831.
    - \**Dendrodoris limbata* (Cuvier, 1804).
    - \**Dendrodoris grandiflora* (Rapp, 1827).
    - Dendrodoris languida* Pruvot-Fol, 1951.
    - Dendrodoris subpellucida* (Mörch, 1863)
  - Género *Doriopsilla* Bergh, 1880.
    - \**Doriopsilla areolata* Bergh, 1880.
    - Doriopsilla ciminoi* Avila, Ballesteros y Ortea, 1992.
    - Doriopsilla pharpa* Marcus, 1961.
- . Suborden Dendronotacea Odhner, 1934.
  - Familia Tritoniidae Lamarck, 1809.
    - Género *Tritonia* Cuvier, 1903.
      - Tritonia nilsodhneri* Marcus, 1983.
      - Tritonia striata* (Haefelfinger, 1963).
    - Género *Marionia* Vayssière, 1877.
      - Marionia blainvillea* (Risso, 1818).
  - Familia Tethyidae Alder y Hancock, 1855.
    - Género *Tethys* Linné, 1767.
      - Tethys fimbria* Linné, 1767.

En total, pues, se ha trabajado con 55 especies que se distribuyen en los distintos órdenes y subórdenes de la siguiente manera:

Cefalaspídeos:	7 especies.
Anaspídeos:	2 especies.
Sacoglosos:	4 especies.
Notaspídeos:	7 especies.
Nudibranquios:	
Doridáceos:	31 especies.
Dendronotáceos:	4 especies.
Armináceos:	0 especies.
Aeolidáceos:	0 especies.

En el listado anterior, se han señalado con un asterisco (a la izquierda) las especies principales de esta Tesis, pertenecientes al Orden Doridacea. El resto de especies se han estudiado con menos detalle y se exponen brevemente en el apartado 5.17.



## **4.2. Métodos de captura, mantenimiento y fotografía.**

Los animales fueron capturados mayoritariamente en inmersión con escafandra autónoma. Se usaron indistintamente equipos de bi o monobotellas según los casos. Se transportaron en botes de plástico al laboratorio donde fueron conservados vivos en acuarios (sala climatizada del C.E.A.B. o laboratorio húmedo del Acuario de Blanes) para realizar experimentos, o congelados para ser extraídos sus productos (a T° de -20 a -80°C según los casos). Los acuarios utilizados han sido diversos, en forma rectangular o a veces redonda, y desde 4 l a 20 l de capacidad. Los acuarios de mantenimiento del laboratorio húmedo tenían una capacidad de 200 l. Los ejemplares fueron fijados previa narcotización con Cl<sub>2</sub>Mg (al 4%, durante varias horas), y posteriormente introducidos en el fijador.

En ciertos lugares, como en el Cantábrico, se muestreó en los intermareales. En otros casos, el material procedía de arrastre de barcos pesqueros del puerto de Blanes, y otras veces de Arenys de Mar, entre 40 y 100 m de profundidad (aproximadamente). Esto se ha detallado para cada especie en el listado del apartado 4.1.2. (Tabla 4.1.), usando los códigos siguientes: IM = inmersión, IT = intermareal, AR = arrastre y DR= dragado.

Se realizaron fotografías de algunas especies con una cámara Nikonos V, con tubos de aproximación de diversos tamaños, y con distintos equipos de iluminación. Para especies de pequeño tamaño, detalles, u otros, se realizaron fotografías mediante una cámara Wild Leitz MPS 52 acoplada a una lupa Leica Wild M10, si bien también se usó una lupa Swift (20-40x) en algunas ocasiones.

## **4.3. Métodos histológicos y citológicos.**

### **4.3.1. Microscopía óptica.**

Tras narcotizar con Cl<sub>2</sub>Mg, se introducían las muestras (disecadas si era necesario) en alcohol (70%), bicromato potásico, líquido de Ciaccio,

glutaraldehido o formol, según el destino previsto, y en el caso de la ultracriomicrotomía en glutaraldehido directamente.

Aunque todos los cortes semifinos obtenidos en la preparación de las muestras para microscopía electrónica fueron observados, y en ocasiones fotografiados, mediante microscopía óptica, se incluyen en el apartado de microscopía electrónica.

#### Ejemplares disecados.

El material utilizado para este estudio fue el que se expone en la Tabla 4.2. Se seleccionaron estas especies por su interés particular o por la mayor facilidad para su recolección, según los casos.

ESPECIE	LOCALIDAD y FECHA	SECCION ESTUDIADA
<i>Hypselodoris villafranca</i>	Blanes 15-11-87	manto y MDFs
<i>Doris verrucosa</i>	Torre Ann. Abril 89	manto y verrugas
<i>Dendrodoris</i> spp	Cubelles 19-7-87 Miseno Abril 89	manto, vísceras, espinas peniales
<i>Doriopsilla cimini</i>	Cabo Verde Ag. 85	espinas peniales

Tabla 4.2. Especies utilizadas en los estudios de microscopía óptica.

La disección se realizó bajo lupa en todos los casos en que los ejemplares eran inferiores a 2-3 cm. Las muestras ya fijadas fueron teñidas con métodos diversos que vamos a exponer a continuación. En los casos de órganos enteros o ejemplares muy pequeños, se incluyeron en parafina siguiendo el procedimiento siguiente:

- . fijación en alcohol 70%
- . deshidratación:
  - 2 h alcohol 70%
  - 2 h alcohol 90%
  - 2 h alcohol 96%
  - 2 h alcohol 100%
  - 2 h xilol
- . inclusión:

xilol-parafina (2x30')  
parafina (2x6h)  
parafina (24h)

. hacer el bloque y dejar endurecer (al menos 24 h).

En el caso de *Doris verrucosa* se usó también el fijador de Ciaccio y posteriormente se deshidrató la muestra para su inclusión como ya se ha descrito. El fijador de Ciaccio se prepara con 80 ml de bicromato potásico al 5% en agua destilada, 15 ml de formol al 40% y 5 ml de ácido acético glacial. Este fijador tiene la particularidad de mantener los lípidos. Al cabo de 18 horas se lavan las muestras unos 20' con bicromato potásico al 3% en agua destilada y se dejan 5 días en una nueva solución del mismo reactivo a temperatura ambiente. Después se lava en agua corriente durante 4' y se sigue con la deshidratación previa a la inclusión.

La obtención de cortes se realizó mediante el uso de un micrótopo de deslizamiento. Los cortes, de unas 7-12  $\mu\text{m}$ , se engancharon a los portas mediante una solución de gelatina (2g de gelatina en 2 l de agua destilada y un poco de timol). Naturalmente es necesario desparafinar, e hidratar en algunos casos:

. 2 h xilol  
. 2 h alcohol absoluto  
. 2 h alcohol 90%  
. 2 h alcohol 70%  
. 2 h agua destilada

Posteriormente se procedió a teñirlos con una de las tinciones que se describen seguidamente. Las tinciones empleadas han sido las siguientes (se pueden hallar más detalles metodológicos y otras variaciones en los libros clásicos de histología y citología: Martoja y Martoja-Pierson, 1970, Nezelof *et al.*, 1975):

- Tetracrómico de Herlant.

Desparafinar e hidratar.

10' eritrosina (solución acética: 1 g eritrosina en 100 ml de agua destilada, más una gota de ácido acético)

lavado rápido con agua destilada

5' azul de Heidenhain diluido

lavado con agua destilada

10' azul ácido de alizarina

lavado con agua destilada

10' ácido fosfomolibdico (solución acuosa al 5%)  
lavado con agua destilada  
diferenciar eritrosina con alcohol 70%  
deshidratar  
10' esencia de limón o creosota de haya  
3' xilol  
montar con bálsamo del Canadá o DPX

- Hematoxilina-eosina.

desparafinar e hidratar  
3' hematoxilina (1 g en 100 ml de alcohol 95%)  
lavado 10' con agua corriente  
3' eosina (0.5% en alcohol 25%)  
5' alcohol 90%  
10' alcohol absoluto (2 baños)  
15' esencia de limón o creosota de haya  
3' xilol  
montaje con bálsamo de Canadá o DPX

- Mallory (tricrómico).

desparafinar e hidratar  
15' solución saturada de sublimado corrosivo (biclورو de Hg)  
lavado rápido con agua destilada  
30" fucsina ácida al 1% en agua destilada  
lavado rápido en agua destilada  
1' ácido fosfomolibdico al 1% en agua destilada  
1' reactivo de Mallory  
lavado rápido en agua destilada  
1' alcohol absoluto-azul de anilina al 0.05%  
5' alcohol absoluto (2 baños)  
15' esencia de limón o creosota de haya  
3' xilol  
montaje con bálsamo del Canadá o DPX

- Acido periódico de Schiff.

desparafinar e hidratar  
10' ácido periódico al 1% en agua destilada  
lavado rápido en agua destilada  
15' reactivo de Schiff  
1' lavado rápido en agua destilada  
2' azul de metileno o azul de toluidina al 0.05%  
deshidratar  
10' esencia de limón  
3' xilol  
montaje con DPX

- Sudán Negro B.

desparafinar  
10' alcohol absoluto  
10' alcohol 90%  
12' alcohol 70%  
45' Sudán Negro B

1' alcohol 70%  
3' agua corriente  
montaje en glicerina gelatinada

Las recetas para preparar los colorantes y otros reactivos empleados, son las siguientes:

. Reactivo de Mallory:

0.5 g Azul de anilina soluble en alcohol.  
2 g Orange G.  
2 g ácido oxálico.  
100 ml agua destilada.  
(filtrar)

. Sublimado corrosivo: 20 g de bicloruro de Hg en 500 ml de agua corriente, se agita y se deja en la estufa 24 h a 30°.

. Azul de Heidenhain:

(Esta es la solución madre, para usarla se diluye un volumen en dos volúmenes de agua destilada).  
0.2 g azul de anilina soluble en agua.  
0.5 g Orange G.  
100 ml agua destilada.  
1 ml ácido acético.

. Azul ácido de alizarina:

0.5 g azul ácido de alizarina  
100 ml agua destilada  
10 g sulfato alumínico  
Hervir 5', dejar enfriar, filtrar a las 24 h.

. Reactivo de Schiff:

192 ml agua destilada.  
8 ml ácido clorhídrico concentrado.  
3.8 g metabisulfito sódico.  
2 g fucsina básica.

. Sudán Negro B:

Sudán Negro B al 0.3% en alcohol al 70% durante 12 h a 37°.  
Transcurridas esas horas se deja enfriar y posteriormente se filtra.

. Glicerina gelatinada:

7 g de gelatina  
50 g de glicerina  
42 ml de agua destilada  
Disuelto al baño María y filtrado.

### Puestas, embriones y larvas.

El material utilizado para este estudio fue el que se expone en la Tabla 4.3.

ESPECIE	PROCEDENCIA	MATERIAL ESTUDIADO
<i>Hypselodoris webbi</i>	Cadaqués	puesta
<i>Hypselodoris orsini</i>	Blanes	puestas
<i>Dendrodoris limbata</i>	Miseno Cadaqués Blanes	puestas embriones puestas hasta juvenil
<i>Doriopsilla areolata</i>	Blanes	embriones y larvas

Tabla 4.3. Especies de las que se han estudiado microscópicamente los embriones o los juveniles.

En estos casos se observaba previamente la muestra *in vivo*, se hacían fotografías a la lupa o al microscopio óptico y se tomaban medidas (usando a veces una cámara clara acoplada). Para obtener los tamaños de embriones y cápsulas se han tomado una media de entre 5 y 20 medidas según los casos. La fijación se realizaba tras anestesiar con  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ . Se usaron como fijadores alcohol 70%, glutaraldehído y fijador de Ciaccio (preparado como ya se ha explicado). La fijación con glutaraldehído se realizó introduciendo la muestra (un pequeño fragmento de puesta, o algunas larvas) en glutaraldehído al 2,5% tamponado con cacodilato y agua de mar (1:4:5). Transcurridas 24 horas se lavaba con agua de mar filtrada y se procedía a la tinción.

En algunos casos, fragmentos de las puestas fueron deshidratados y montados con bálsamo del Canadá sin teñir previamente, ya que solamente se pretendía medirlos.

En los casos en que se tiñeron las muestras se usaron las tinciones siguientes:

- . MayGrunwald-Giemsa:
  - fijación en alcohol 70% (o deshidratación previa).
  - 30' alcohol 70%.
  - 18-24 horas May-Grunwald (0.25% en metanol).
  - aclarado con alcohol absoluto.
  - 3 h Giemsa (0.4% en metanol): alcohol absoluto (1:1).
  - lavados varios con alcohol absoluto y una gota de ácido acético.
  - 30' alcohol absoluto.
  - 15' alcohol absoluto: xilol (1:1).
  - 2-3 h xilol.
  - 15' xilol-bálsamo del Canadá.
  - montaje en bálsamo del Canadá o Entellán.
  
- . Sudán negro B:
  - Se preparaba como se ha explicado anteriormente. El procedimiento para la tinción era el siguiente:
  - fijación en alcohol 70%
  - 15' alcohol 70%
  - 45' Sudán Negro B
  - 1' alcohol 70%
  - 3' agua corriente
  - montaje en glicerina gelatinada (preparada como se ha indicado anteriormente)

Para las fotografías microscópicas se utilizó una cámara Wild MPS 51 S Spot acoplada a un microscopio Leitz Diaplan Wetzlar 307.

### Secreción ácida.

El pH se midió por contacto con el animal (en distintas zonas del organismo) o bien en las secreciones mucosas con papeles Merck Universalindikator (pH 0-14). El muco se obtenía *in vivo* molestando al animal con una varilla de cristal para provocar la secreción.

A parte de la detección de las secreciones ácidas, en algunos casos (p. ej. en *Pleurobranchaea meckeli*) se aplicó una de las técnicas histoquímicas de Thompson (1983), concretamente la número 4:

- . puntear el muco del animal (que fue recogido con una micropipeta de 5 µl) en papel de filtro Whatmann (del número 1).
- . puntear diluciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (al 10, 25 y 95%) como referencia.
- . calentar y detectar, por comparación, los puntos negros correspondientes a iones SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (presencia de ácido sulfúrico).

### 4.3.2. Microscopía electrónica de transmisión.

El material empleado para este estudio se detalla en la Tabla 4.4.

ESPECIE	LOCALIDAD y FECHA	ZONA ESTUDIADA
<i>Hypselodoris cantabrica</i>	Santander 16-4-88	manto y MDFs
<i>Hypselodoris webbi</i>	Palamós Abril-92	manto y MDFs
<i>Hypselodoris</i> sp	Castell. di S. 12-12-88	manto y MDFs
<i>Hypselodoris orsini</i>	Blanes Abril-92	manto y MDFs
<i>Hypselodoris pinna</i>	Cabo Verde 28-8-85	manto y MDFs
<i>Chromodoris britoi</i>	Blanes Ag./Set. 1992	manto y MDFs
<i>Doris verrucosa</i>	Torre Ann. Dic. 88 Blanes Mayo 92	manto manto
<i>Dendrodoris limbata</i>	Blanes 8-11-87/19-3-92	borde del manto, manto, branquias, rinóforos y otras Blanes Enero- 92 embriones, larvas y juv.
<i>Doriopsilla areolata</i>	Blanes 19-3-92	borde del manto, manto
<i>Peltdoris atromaculata</i>	Blanes 23-4-92	manto
<i>Platydorís argo</i>	Blanes 23-4-92	manto
<i>Gastropteron meckeli</i>	Blanes 19-3-92	borde parápodos

Tabla 4.4. Material utilizado en el estudio de microscopía electrónica de transmisión.

La fijación con glutaraldehído se realizó introduciendo la muestra (un pequeño fragmento) en glutaraldehído al 2,5% tamponado con sosa cacodilato y agua de mar filtrada (1:4:5). Las partes del organismo que se han estudiado en diversas especies han sido básicamente el borde del manto, otras zonas del manto, branquias y rinóforos. Transcurridas 24 horas se lavaba con agua de mar filtrada (o se dejaba en solución tamponada), y posteriormente se



procedía a la post-fijación con osmio: 2 horas en tetraóxido de Osmio al 2% en agua de mar filtrada. Tras esto se iniciaba el proceso de inclusión en resina de Spurr, en el que se procede como sigue:

- . lavado con agua destilada
- . 10-15' acetona-agua destilada al 50%
- . 10-15' acetona-agua destilada al 70%
- . 10-15' acetona-agua destilada al 90%
- . 10-15' acetona-agua destilada al 96%
- . 10-15' acetona al 100%
- . 1 h 30' acetona-spurr 3:1
- . 2 horas acetona-spurr 1:1
- . 5 horas acetona-spurr 1:3
- . spurr (5 cambios en 48 h en la nevera)
- . colocar en los moldes y dejar en la estufa 48 h
- . desmoldar
- . piramidar
- . hacer semifinos (1  $\mu\text{m}$ ) y elegir zona a observar
- . repiramidar
- . cortar ultrafinos (<90 nm)
- . recogerlos con las rejillas
- . contrastar las rejillas
- . observar al microscopio

La composición de la resina Spurr utilizada (normal) es la siguiente:

- . 26 g NSA (Anhidrido Nonenyl Succínico)
- . 10 g ERL (Vinyl cyclohexeno dióxido)
- . 6 g DER (736 diglycidyl eter de polipropilén glicol)
- . 0.4 g S-1 (2-dimetil-amino-etanol)
- . 0.6 g Delta (ftalato de butilo)

Los cortes semifinos se observaban al microscopio óptico tras una breve tinción con azul de metileno (0.5%)-borax (0.5%) según la receta siguiente:

- . 0.5 g de azul de metileno en 100 ml de agua destilada
- . 0.5 g de tetraborato sódico cristalizado

Tras ello se colocaba el cubreobjetos con una gota de DPX.

Los cortes ultrafinos se obtuvieron, como los semifinos, con un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut, con cuchilla de vidrio. Los cortes se recogieron con rejillas de cobre (200). El contrastado de las rejillas se realizaba siguiendo este proceso:

- . acetato de uranilo al 2% (30 min): 0.1 g en 5 ml de agua destilada filtrada.
- . citrato de plomo según Reynolds (10 min): 1.33 g  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , 1.76 g  $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)2\text{H}_2\text{O}$ , 30 ml agua destilada hervida, agitar 30 min y añadir 8 ml de  $\text{NaOH}$  1N, enrasar a 50 ml con agua destilada hervida.
- . dejar secar al aire con agua destilada.

Tras esto ya se podían observar las rejillas al microscopio. Las rejillas con los cortes ultrafinos, tanto las procedentes de ultracriomicrotomía como las de ultramicrotomía, fueron observadas y fotografiadas con un microscopio electrónico de transmisión Philipps 301 T.E.M. en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona.

#### Ultracriomicrotomía.

Se procesaron con este sistema algunas muestras del manto de *Doris verrucosa* (Cubelles, 10-8-91). Se fijaron en glutaraldehído al 2.5% del modo habitual y tras ello se crioprotegieron con sacarosa 2.1 M (3 baños de 10' cada uno). Se montaron sobre los portamuestras bajo nitrógeno líquido. Con un ultracriomicrotomo se cortaron semifinos de 0.5  $\mu\text{m}$  y ultrafinos de 0.12  $\mu\text{m}$ , con cuchilla de vidrio. Los cortes se recogieron con rejillas en una solución de sacarosa 2.3 M. La temperatura de corte era de unos  $-72^\circ\text{C}$ .

En una ocasión se realizó una post-tinción con tetraóxido de osmio al 2% durante 1', 5', 10' y 15', tras lo cual se procesaron las rejillas como se ha descrito anteriormente.

#### **4.3.3. Microscopía electrónica de barrido.**

El material que se ha observado se detalla en cada apartado específico. Podemos decir que además de unas 60 rádulas (y armaduras labiales) de *Hypselodoris* spp, *Chromodoris* spp, *Doris verrucosa*, *Peltodoris atromaculata*, *Platydorís argo* y otros, se han estudiado fragmentos del manto, pie, rinóforos, branquias y espinas peniales de *Dendrodoris* spp, manto, verrugas y larvas de *Doris verrucosa*, larvas de *D. limbata* y de

*Hypselodoris webbi*, y otros. En cada caso se detallan los datos en los apartados correspondientes.

Las rádulas se preparaban tras disección bajo la lupa del bulbo bucal pasándolas por una solución de KOH o NaOH durante unos minutos a temperatura elevada o varias horas a temperatura ambiente (y dependiendo del tamaño de la rádula). Se limpiaban en ocasiones con un baño de ultrasonidos durante unos minutos. El montaje se hacía en discos adhesivos dejando evaporar el alcohol al 70% en que se hallaban (en unos pocos casos se hizo con nitrato de plata). Estos discos se montaban en "stubbs" o portadiscos y eran sometidos a un baño de oro ("sputtering") durante 6 minutos. La observación se realizó en un microscopio de barrido Hitachi (a 15 Kv), aunque en ocasiones se usaron otros microscopios como el Jeol 840 con detector para microanálisis y un Stereoscan 120. La obtención de fotografías se realizó con una cámara acoplada al microscopio.

En el caso de muestras blandas, como fragmentos del manto, etc., se efectuaba el llamado punto crítico: deshidratación progresiva hasta alcohol absoluto, antes de colocarlas en el portamuestras.

En los apartados específicos respectivos se incluyen algunas de las fotografías obtenidas de las rádulas, con un interés descriptivo, ya que hasta ahora no había sido publicado ningún estudio de microscopía electrónica de estas especies. El valor taxonómico de la rádula, y su relación con el tamaño del animal, ha sido ya discutido con anterioridad (Rudman, 1974, y Bloom y Bloom, 1977, entre otros).

#### **4.4. Métodos químicos.**

##### **4.4.1. Introducción química.**

La separación de los compuestos de mezclas complejas, como las muestras biológicas, es una labor difícil y tediosa. Un método ideal de separación nos permitiría separar de una matriz compleja las diferentes especies químicas con una pequeña cantidad de muestra. El objetivo de los

métodos de separación es detectar y medir tantos compuestos como sea posible, conocidos o desconocidos. Las características de este método serían aplicación universal, alto poder de separación y alta sensibilidad. La técnica que cumple todos estos requisitos es la cromatografía.

#### **4.4.2. Extracción.**

La extracción de los productos es la fase previa para cualquier estudio. En nuestro caso, la extracción de las sustancias químicas se realizó a partir del material fresco o congelado (preferentemente a  $-20^{\circ}\text{C}$ ): opistobranquios disecados o no, puestas, o posibles presas de las especies analizadas. Se trituraba la muestra (con o sin arena (Merck 1/1 p/p)), extrayendo con acetona repetidas veces (al menos 3 ó 4, y a veces más, según lo exigiera el material) a temperatura ambiente. En ocasiones se facilitaba la extracción con un baño de ultrasonidos, y a veces era necesario extraer a oscuras para evitar la alteración de los productos (por ejemplo, en *Hypselodoris* spp).

El extracto acetónico recogido se filtraba con papel de filtro, y se procedía a la evaporación del disolvente al vacío mediante el uso de un rotavapor. En casos de cantidades muy pequeñas se usaba directamente una bomba de vacío o se evaporaba bajo una corriente de Nitrógeno. El residuo del extracto acetónico se pesaba en una balanza de precisión, evaporando el agua si ésta era poca. En los demás casos, el agua residual se extrajo secuencialmente con éter etílico y n-butanol usando un embudo separador. Se separaba en una fracción etérea y una acuosa, y cada una de ellas era evaporada al vacío y pesada. La fracción acuosa era separada en una fracción butanólica y un residuo acuoso. La fracción butanólica era a su vez evaporada y pesada. Este proceso y los tipos de compuestos que se obtienen en cada fracción se hallan esquematizados en el gráfico de la Figura 4.2.

En los casos en que la sustancia a extraer era ya conocida se utilizaba directamente el extracto acetónico o el extracto etéreo en las siguientes fases. Se anotaba el peso de los extractos acetónico, etéreo, acuoso y butanólico, en su caso, y el peso seco del residuo sólido del material ya extraído, después de un mínimo de 24-48 horas al vacío en presencia de fuertes agentes deshidra-

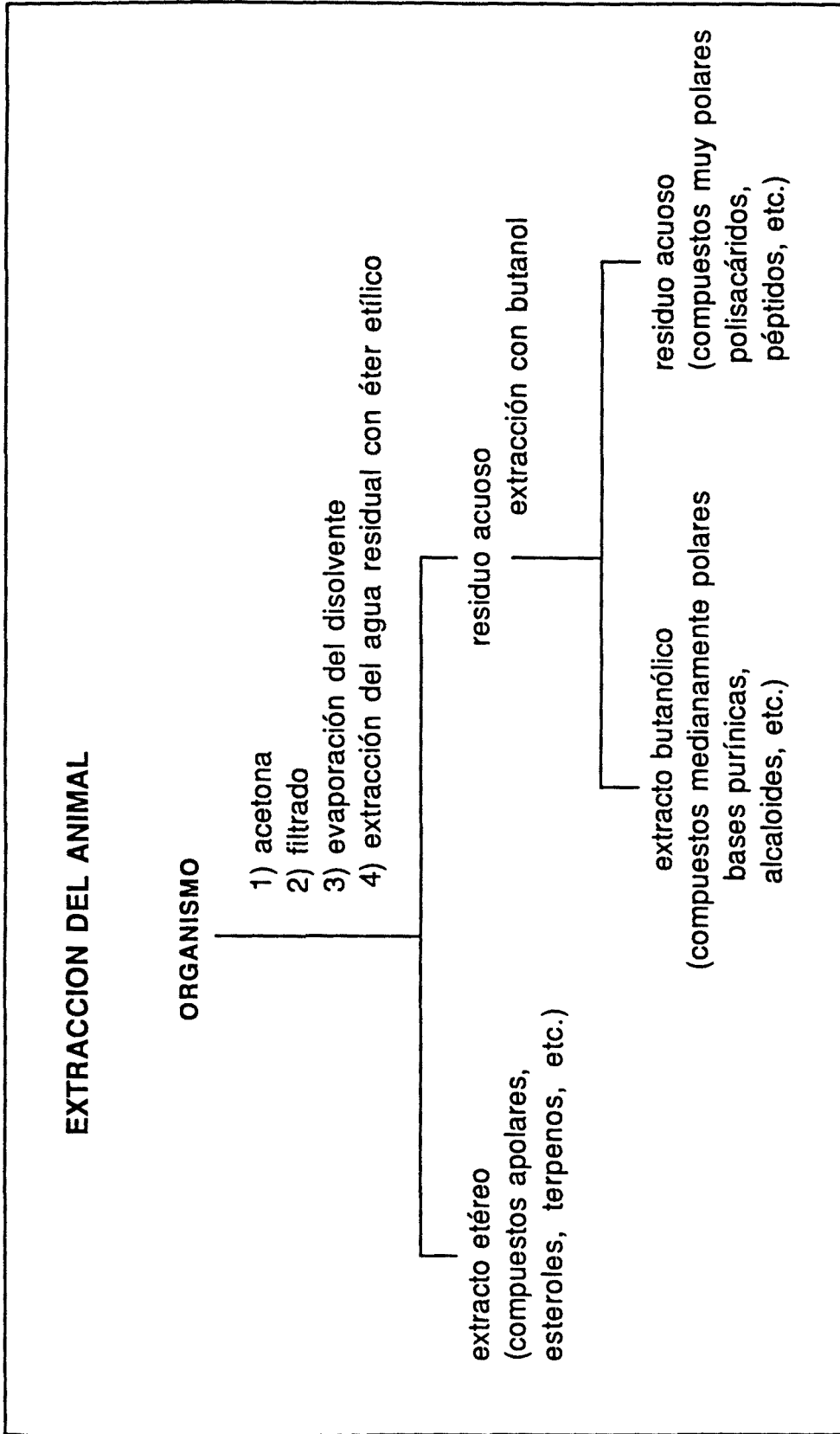


Figura 4.2. Esquema del proceso de extracción.

tantes (NaOH, CaCl<sub>2</sub>, etc.). La obtención del peso seco se realizaba siempre tras la extracción.

En algunos casos excepcionales la extracción se efectuaba en un modo diverso: ver por ejemplo, *Hypselodoris webbi* con C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, o el caso de la olepupuana en *Dendrodoris limbata*, etc.

#### 4.4.3. Fase analítica: cromatografía de capa fina.

De entre los muchos métodos cromatográficos existentes se ha utilizado preferentemente la llamada TLC ("Thin-Layer Chromatography"), así como la cromatografía en columna, la cromatografía de gas (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Sus principales ventajas son la rapidez, poder de resolución y capacidad de uso con muestras de muy diversas características. En toda cromatografía intervienen una fase estacionaria y una fase móvil. En TLC la fase móvil es líquida y la fase estacionaria es sólida. Las ventajas concretas de la TLC son su simplicidad y flexibilidad, siendo adecuadas para separaciones preparativas, análisis cuantitativos, y tests rápidos de comprobación.

Para controlar cualitativamente la presencia de metabolitos de interés se efectuaban cromatografías en capa fina que permitían saber el estado de las moléculas, así como su comparación con otros metabolitos conocidos.

Las diferentes fracciones eran analizadas mediante cromatografía en capa fina, usándose distintos solventes y mezclas de los mismos (que se detallan para cada caso particular), algunos de los cuales se citan a continuación.

- Fase estacionaria: Sílice.
- Fase móvil:
  - . éter etílico
  - . éter de petróleo
  - . combinaciones de los dos anteriores.
  - . tolueno-éter de petróleo-éter etílico
  - . benceno
  - . benceno-éter etílico

- . cloroformo
- . cloroformo-metanol
- . cloroformo-metanol-ácido acético
- . cloroformo-hexano
- . hexano-acetato de etilo.
- . heptano-benceno
- . butanol-ácido acético-agua

La mayor presencia del disolvente más polar facilita la migración de los componentes menos liposolubles. El  $r_f$  se mide como la relación entre la migración del producto y el frente, considerando el punto donde se coloca la muestra como el origen (ó 0), y el frente de migración como 1 ó 100 indistintamente. Las placas calibradas son aquellas en las que la cantidad de muestra que se coloca en la placa es proporcional al peso del extracto.

La mayoría de los disolventes usados eran de la marca Farmitalia Carlo Erba o Merck. Las placas cromatográficas usadas han sido de sílice Merck Kiesegel F254 (70-230), de distintos grosores según el uso: analíticas de 0.25 mm y semipreparativas de 0.5 mm (para posterior purificación).

Las placas con las muestras eran sometidas antes del revelado a una rutinaria observación bajo una lámpara de luz ultravioleta de una longitud de onda de 254 nm. Para ello se usó un aparato Minuvis Desaga (Heidelberg, 254-366 nm).

Las placas se revelaron según los casos con reactivo de Ehrlich, sulfato de cerio, revelador para fenoles, hidróxido de sodio, ninhidrina, vapores de yodo, etc., aunque los más empleados fueron los dos primeros, y de manera combinada. En un horno de alta temperatura, o mediante el uso de un secador, también de alta temperatura, se procedía a calentar las placas para hacer carbonizar los compuestos que reaccionaban con los reveladores.

La preparación de los reveladores es la siguiente:

- . Revelador comercial para fenoles: 50 ml de agua y una espátula pequeña (0.5 cm) de "fast red B-salt" (microrreactivo standard para fenoles polivalentes) (guardar en la nevera).
- . Sulfato de Cerio: (120 ml de ácido sulfúrico en 1 l agua destilada para obtenerlo 2N) en 1/2 litro de ácido sulfúrico 2N poner una espátula pequeña (0.5 cm) de sulfato de cerio (resulta aproximadamente al 0.1%).

- . Reactivo de Ehrlich: 1 g de 4-dimetilaminobenzaldehido ( $C_9H_{11}NO$ ) + 30 ml de alcohol etílico absoluto y 9 ml de ácido clorhídrico (HCl).
- . Hidróxido sódico: (NaOH) de 5 a 10 lentejas en 80 ml de agua destilada.

Un ejemplo de placa cromatográfica se puede observar en la Figura 4.3.

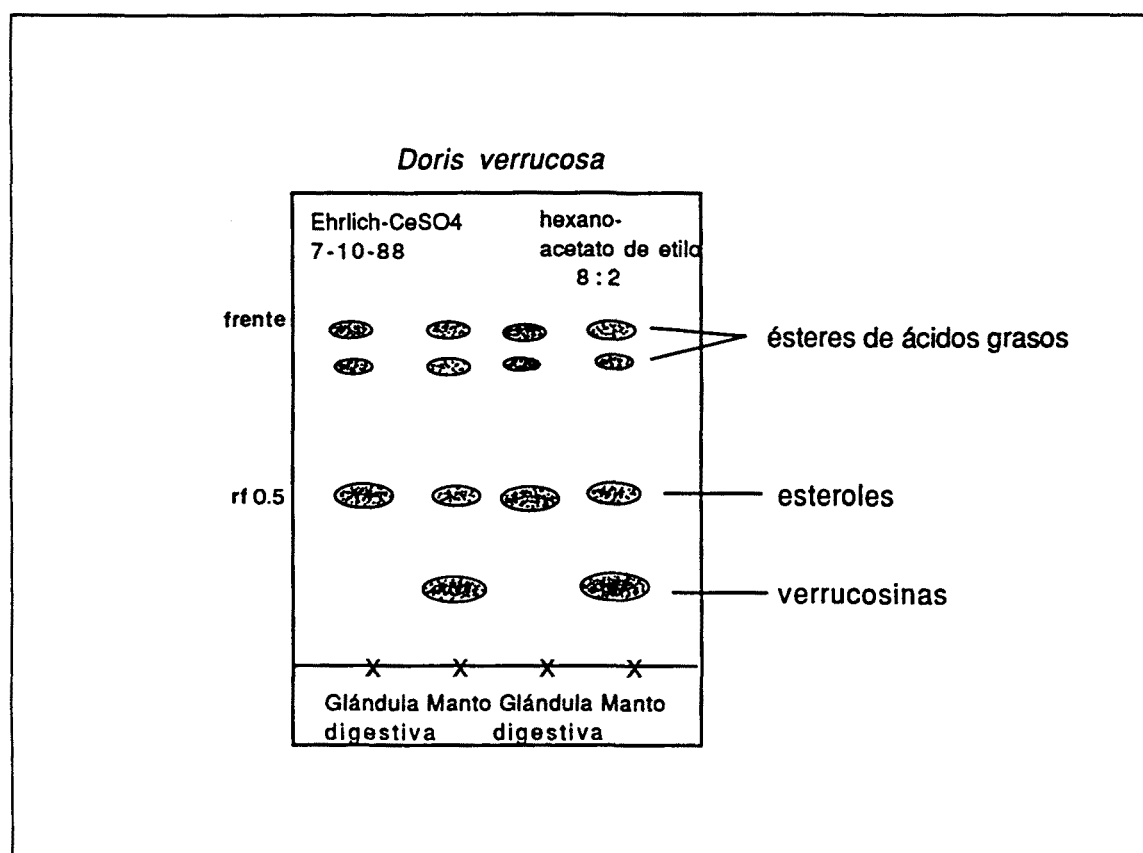


Figura 4.3. Ejemplo de placa cromatográfica.

El sulfato de cerio no es específico, sino que sirve en general para todas las sustancias. La ninhidrina permite detectar la presencia de compuestos nitrogenados, en particular aminas. El reactivo de Ehrlich detecta los productos heterocíclicos (p. ej. furánicos), y el revelador para fenoles es un reactivo para detectar fenoles polivalentes.

En casos muy concretos (furanosesquiterpenos de *Hypselodoris*) las placas fueron previamente impregnadas con nitrato de plata al 8% (disuelto



en acetona-agua 8:2), que resalta las diferencias de polaridad formando complejos entre los dobles enlaces y la plata. En estos casos los productos se separaron en una columna también con sílice al nitrato de plata (8%). Otra peculiaridad de estos productos es que se alteran fácilmente con la luz, por lo que se trabajó a oscuras o bien cubriendo las muestras con papel de aluminio.

En la fracción etérea se localizan los compuestos apolares, esteroides, terpenos, etc. En la fracción butanólica se hallan los compuestos medianamente polares, como bases purínicas, alcaloides, etc. En el residuo acuoso podemos encontrar los compuestos muy polares, como polisacáridos, péptidos, etc. Todo esto se detalla en la Figura 4.2.

Se han realizado placas bidimensionales en los casos en los que se sospechaba que el producto se transformaba con la sílice o con el calor, por ejemplo los compuestos de *Doriopsilla* y *Dendrodoris*. Este proceso consiste en hacer mover los compuestos dos veces, en direcciones perpendiculares, para observar si ha habido alguna transformación.

#### **4.4.4. Aislamiento y purificación.**

Posteriormente se pasaba al aislamiento y análisis de las moléculas de interés. Se hizo mediante distintas fases:

- 1) Fase preparativa: columna cromatográfica.
- 2) Purificación final: columna de alta presión (HPLC, cromatografía flash).
- 3) Métodos espectroscópicos: NMR, GC, MS, IR, UV.

Para purificaciones simples se han usado placas semipreparativas y preparativas de distintos grosores. En estos casos los productos a separar eran visibles bajo la lámpara UV, o bien se separaban fácilmente con una referencia revelada al lado, por lo que se rascaba la sílice de la zona donde debía estar el producto, se recogía el producto sobre un filtro o en una pipeta Pasteur, se evaporaba el disolvente, y se pesaba previo control mediante TLC.

La cromatografía en columna (LC) tiene la ventaja de poseer una mayor capacidad y alta eficiencia respecto a la TLC. En estos casos se usó sílice Merck Kiesegel "60 powder" (70-230 ASTM). Se hacían cromatografías en pequeñas columnas, pipetas Pasteur, etc. Los disolventes eran los mismos que se han mencionado para TLC, variando la mezcla a medida que salían los productos, siguiendo esta salida mediante TLC de las fracciones recogidas. La cantidad de sílice utilizada era en cada caso proporcional (1:60) al peso del extracto a separar. Se obtenían fracciones según los casos de 0.5 ml hasta 12 ml cada una. Los disolventes empleados generalmente eran éter de petróleo y éter etílico, iniciándose con la proporción 98:2 y aumentando la cantidad de éter etílico hasta eliminar el éter de petróleo. Los demás casos se detallan en cada especie.

Tras observar la TLC de las fracciones obtenidas, se realizaba la reunión de las fracciones que contenían los productos de interés, se evaporaba y se pesaba. Se hacía otra placa de control de las reuniones y en caso necesario se repetía la purificación, si el producto no había quedado suficientemente limpio.

Las purificaciones con HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) se han empleado para casos de difícil separación, por ejemplo la mezcla de verrucosinas, en un aparato Waters 6000 A equipado con detector IR y UV (490E). Los disolventes utilizados eran especiales para HPLC y AR Grade de la marca Merck y Farmitalia Carlo Erba. En su caso, se expondrán más datos en el capítulo relativo a cada especie.

En todos los casos en que era necesario se usaba la campana de extracción, trabajando bajo la misma.

#### **4.4.5. Análisis químico e identificación.**

Visto que la mayoría de las moléculas orgánicas están constituidas por Carbono, Oxígeno e Hidrógeno, los datos necesarios para su determinación se referirán a sus características en cada molécula (NMR, GC, MS). Es necesario destacar que la cantidad mínima de sustancia pura para hacer un análisis

espectral completo es 1 mg si la sustancia es ya conocida. Obviamente, para el estudio estructural de una sustancia no conocida se requiere una mayor cantidad de producto.

Se han realizado análisis de los productos purificados mediante un aparato de NMR (Resonancia Magnética Nuclear) de 500MHz de la marca Bruker modelo WM500 adaptado a un ordenador Aspect 2000. La sustancia a analizar era disuelta en  $\text{CDCl}_3$  (cloroformo deuterado), o  $\text{C}_6\text{D}_6$  (benceno deuterado) o acetona deuterada según los casos. Se obtenían espectros de  $^1\text{H}$ - (500 MHz) NMR y de  $^{13}\text{C}$ - (125.8 MHz) NMR, así como gráficas bidimensionales y de desacoplamiento con el fin de que fuera posible su estudio químico. El espectro NMR de una molécula proporciona información sobre la distribución de los átomos de H y C en la molécula. En un caso se realizó un experimento directo o *in vivo* (ver olepupuana, capítulo 5.14.).

Mediante el espectro de masa (MS) se conocen las dimensiones de las moléculas (peso molecular), así como su composición elemental. Los aparatos de espectrometría de masa empleados han sido un AEI MS-30 y un Kratos MS-50.

Para realizar cromatografías de gases capilares fue utilizado un aparato modelo Carlo Erba HRGC 5300 Mega Series. Para las verrucosinas se usaron columnas de 25 m x 0.2 mm de sílice con SE-30 y detector con ionizador de llama a 280°C con hidrógeno como gas transportador. Para los esteroides, previamente acetilados, se usaron columnas de 250-300°C con flujo de Helio, con el inyector /detector a 280°C, (1°C/min, 1 mV, velocidad= 0.25 mm/min), y se inyectaron 2.5 microlitros. Para ello se acetilaron previamente los esteroides de la siguiente manera: se ponían 0.5 ml de piridina y 1 ó 2 gotas de anhídrido acético y se dejaba 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se evaporaba bajo  $\text{N}_2$ , añadiendo algo de metanol para facilitar la evaporación de la piridina.

La fase siguiente es la obtención de datos característicos de las sustancias: espectros IR (infrarrojos) y UV (ultravioletas), ángulo de desviación de la luz polarizada y punto de fusión. A través de todas estas técnicas se obtienen los datos que permiten caracterizar las moléculas.

Los espectros IR se registraron con un aparato Biorad FTS-7 FTIR o con un IR Spectra Nicolet FT-5 DXB. Este tipo de espectro nos permite conocer los tipos de enlaces presentes en la molécula (Carbono-Oxígeno, Carbono-Carbono, dobles enlaces, etc.). Los espectros UV se realizaron con un aparato Varian DMS-90. En este caso nos da información sobre la presencia de cromóforos (si la molécula tiene color, si absorbe,...). La rotación óptica se midió con un polarímetro JASCO DIP 370.

Los datos espectrales de las moléculas más interesantes se detallan en el apéndice 10.I.

#### **4.4.6. Experimentos con radiactivos.**

Fueron realizados en el caso de los metabolitos de *Doris verrucosa*. Los precursores de las verrucosinas utilizados (mevalonato y glicerol marcados) eran de la marca Amersham International plc. (England). La radiactividad era medida con un aparato Tricarb liquid Scintillation Counter (Packard PRIAS, model PLD), equipado con un analizador absoluto de radiactividad. El "quenching" fue corregido con estandarización externa. El líquido "Insta-Fluor II Scintillation counting fluid" era también de la marca Packard. En el apartado correspondiente a la especie *D. verrucosa* (5.12.) se hallarán más datos sobre este experimento.

### **4.5. Metodología de los tests y experimentos.**

#### **4.5.1. Ictiotoxicidad.**

Este test se ha realizado tal y como fue descrito por Gunthorpe y Cameron (1987) y Andaló (1988) con el rango de toxicidad definido por Coll *et al.* (1982). Se introducían 6 peces de la especie *Gambusia affinis* en 70 ml de agua destilada. Se añadían 0.5 ml de disolvente (acetona o metanol) con el producto a probar a 10 ppm, 1 ppm o 0.1 ppm según los casos. Se hacía un control con 0.5 ml de acetona o metanol.

## TEST DE ICTIOTOXICIDAD CON *Gambusia affinis*

Fecha.....

Sustancia utilizada:						
Tiempo de observación:						
Localización del pez A. Superficie B. A media agua C. Fondo						
Orientación A. Normal B. Giro lateral C. Giro ventral D. ambos giros						
Movimiento A. Ninguno B. Hipoactivo C. Normal D. Hiperactivo						
Actividad de la aleta caudal A. Ninguna B. Hipoactiva C. Normal D. Hiperactiva						
Mortalidad A. Vivos B. Muertos						
<b>Toxicidad del compuesto</b> MT. Muy tóxico. Mortalidad 6/6 en los primeros 90'. T. Tóxico. Mortalidad 5/6 en las primeras 12 h. P. Peligroso. Mortalidad 4/6 en las 24 h. NT. No tóxico. Mortalidad menor o igual a 3/6 en las 24 h.						

Figura 4.4. Modelo de hoja de control de un test de ictiotoxicidad.

Se controlaba el estado de los peces cada cierto tiempo: 5', 10', 22', 45', 1h 30', 3h, 6h, 12h y 24h. Se apuntaban los datos en una hoja de control como el modelo que se incluye en la Figura 4.4.

Prácticamente todas las sustancias aisladas en cantidades suficientes fueron utilizadas en este test.

#### **4.5.2. De repelencia ("Feeding inhibition bioassay").**

Se usaban peces de la especie *Carassius auratus*. Antes de realizar el test estos peces eran sometidos a una ambientación previa de al menos 24 h sin alimento, tras lo cual se les daba alimento para peces (TetraMin) con los productos a probar. La cantidad de producto se calculaba en relación a la superficie del alimento, ya que este viene en escamas, según la proporción: 50 mg de alimento = 16.4 cm<sup>2</sup> de superficie media (Cimino *et al.*, 1982). Se probaban las sustancias a 600, 300, 100 y 50 µg/cm<sup>2</sup>, según los casos.

Se observaba la reacción del pez, si se lo comía o no, y si lo escupía a los pocos segundos de haberlo comido. La mayoría de los productos de *Hypselodoris* spp, *Chromodoris* spp, y el resto de especies de las que se aislaron sustancias en cantidades suficientes, fueron empleadas en este test.

#### **4.5.3. Citotoxicidad.**

Este test se realizó con embriones de erizos (*Paracentrotus lividus*). Se capturaban los erizos (en época de reproducción) y se hacía que expulsaran los productos sexuales en agua de mar filtrada mediante una inyección de KCl a través de la membrana oral. Se colocaban óvulos y espermatozoides en un bote con agua de mar filtrada y se situaba un número superior al centenar en pequeñas cámaras de incubación de alrededor de 2 ml. Se introducía la sustancia a probar disuelta en una cantidad de disolvente (acetona) inferior a la que resultaría tóxica (Martín y Uriz, resultados no publicados), y se observaba a lo largo del tiempo bajo la lupa. Se hacían cuatro réplicas por

cada concentración para una sustancia, y cuatro réplicas de los controles con agua sola y con agua más el disolvente empleado (a igual concentración). Las concentraciones probadas iban desde los 10 a los 80 µg/ml.

Los controles se efectuaban en los momentos clave del desarrollo: división del huevo fecundado, fase de mórula, formación de la pre-gástrula, formación de la gástrula y formación de la larva pluteus. Se anotaba en cada caso el % de embriones en una fase u otra, contándose un mínimo de 100 organismos en cada réplica. El tiempo total de duración del test era de unas 72 h.

Las sustancias probadas fueron:

- . Poliacetilenos de *Peltdoris atromaculata* (mezcla de las dos fracciones) 20 y 40 µg/ml
- . Extracto del borde del manto (polygodial) de *Dendrodoris limbata* 20 y 40 µg/ml
- . Tiopurina de *Doris verrucosa* 40 y 80 µg/ml
- . Verrucosinas (mezcla) de *Doris verrucosa* 10 y 20 µg/ml
- . Extracto del manto de *Tethys fimbria* 10 y 20 µg/ml
- . Esteres de la puesta de *Dendrodoris limbata* 20 y 40 µg/ml

#### 4.5.4. Otros experimentos.

Se han realizado varios tipos de experimentos distintos entre sí, con el objetivo de obtener resultados que tengan significado ecológico. Los tests explicados con anterioridad (a excepción del test de citotoxicidad) se realizan con especies que no cohabitan con los opistobranquios poseedores de las sustancias probadas en el test. Esto implica que su significado ecológico es más que discutible. Para obviar este problema se han intentado realizar otros experimentos en los que intervinieran organismos del mismo habitat que los moluscos. Algunos de los experimentos se han realizado de manera preliminar y la metodología será seguramente mejorada próximamente.

a) En acuario.

Se efectuaron experimentos similares al expuesto para *Carassius auratus* con peces de la zona rocosa litoral (*Diplodus vulgaris*, *Diplodus sargus*, *Trypterigion tripteronotus*,...) y con el cangrejo *Dardanus arrosor*. Se les ambientó durante un período de varias semanas y se les habituó a comer comida preparada para peces (TetraMin) e incluso trozos de calamar con acetona. A continuación se les dieron las sustancias a probar en el alimento, al igual que los tests anteriormente explicados. Se probaron los extractos acetónicos de *D. limbata* del borde del manto, puesta, branquias y glándula hermafrodita.

Los cangrejos *D. arrosor* fueron utilizados también para probar la toxicidad de algunas sustancias al ser inyectadas en su organismo. Se inyectaron disueltas en acetona, y se inyectó también acetona sola como blanco. Se utilizaron los extractos acetónicos de *D. limbata* del borde del manto, puesta, branquias y glándula hermafrodita.

Además con *D. arrosor* y la estrella de mar *Echinaster sepositus*, así como con erizos (*P. lividus* y *Arbacia lixula*), peces (*Trypterigion tripteronotus*), la anémona *Aiptasia mutabilis* y una planaria (*Prosteceraeus roseus*) se realizó otro tipo de experimento que consistía en darles de comer a los opistobranquios vivos y/o muertos, y/o disecados. Esto se hizo también con otros opistobranquios posibles depredadores, como *Pleurobranchaea meckeli*, *Philinopsis depicta* y *Aglaja tricolorata*. En todos estos casos se anotaba la reacción del posible depredador, y en algunos casos se fotografiaba. Las especies probadas como presas en este experimento fueron *Haminoea* spp, *Hypselodoris* spp, *Chromodoris* spp, *Dendrodoris limbata*, *Platydorís argo*, *Peltodoris atromaculata*, *Akera bullata*, *Polycera quadrilineata*, *Philine aperta*, *Doris verrucosa*, *Diaphorodoris papillata* y *D. luteocincta*. También se les dió calamar con sustancias o extractos inyectados en algunos casos (*Dendrodoris limbata*, *Doris verrucosa*, *Tethys fimbria*, *Peltodoris atromaculata*), siempre con los posibles depredadores hambrientos y al azar. En el caso de la anémona se consideraba respuesta positiva la expansión del



disco oral, contracción de tentáculos y apertura bucal, y negativa la liberación del posible alimento por parte de los tentáculos (Shick, 1991).

Por último, se realizaron experimentos de predación para intentar establecer las relaciones depredador-presa entre opistobranquios y posibles presas. Algunos de estos experimentos se explicarán en el apartado b), ya que se hicieron en un acuario en forma de tubo Y, pero otros se efectuaron de forma similar a la utilizada por Paul y Van Alstyne (1988) y Hay *et al.* (1989). En estos se situaba un ejemplar de opistobranquio y dos fragmentos de esponja (u otros) en lugares opuestos, en un recipiente de 50 ó preferentemente de 100 ml con agua de mar filtrada. Se dejaba al molusco en el centro y se anotaba donde estaba al cabo de 5', observándolo a lo largo de varias horas. Se repitió varias veces y se realizaron distintas combinaciones de esponjas presas, para detectar si tenían preferencias por alguna en concreto. Se anotaba también si se observaba comer a algún ejemplar o si estaban en movimiento por el recipiente. Se usaron ejemplares de *Hypselodoris* spp y *Chromodoris* spp, y las esponjas: *Pleraplysilla spinifera*, *Dysidea fragilis*, *D. avara*, *Anchinoe fictitius*, *Clathrina coriacea*, *Cacospongia mollior*, *Spirastrella cunctatrix*, *Siphonochalina coriacea*, *Hippospongia communis*, y el tunicado *Cystodites dellechiajei*.

#### b) Mediante olfactómetro.

Se usó un acuario en forma de Y de una longitud de 40 cm y una anchura de 10 cm por rama. Se tomaron como modelo los experimentos de Davenport (1950), Castiello *et al.* (1978) y Yonow (1989). Se hacía circular el agua de mar corriente desde los extremos separados hacia el extremo final donde se colocaba el molusco, de modo que éste recibía el agua procedente de ambos lados y podía orientarse. En cada uno de los extremos se situaba un fragmento de esponja y se anotaba la reacción del molusco. Se variaban las posiciones y las especies de esponjas probadas. El tiempo máximo de duración de cada experimento era de una hora, aunque en general en pocos minutos el animal tomaba una de las dos direcciones. (En algunos casos los animales se dedicaban a pasear en sentido contrario a la corriente o a subirse por las paredes laterales; ninguno de estos casos se ha considerado como positivo, y

se repitieron unos días después). Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio húmedo del C.E.A.B. en el Acuario de Blanes.

Las especies utilizadas en este tipo de experimentos fueron: *Hypselodoris webbi*, *H. cantabrica*, *H. villafranca*, *H. bilineata*, *Chromodoris britoi*, *C. krohni*, *Dendrodoris limbata* y *Doris verrucosa*. Y como presas o factores de atracción: *Dysidea avara*, *D. fragilis*, *Hymeniacidon sanguinea* más sustrato calcáreo, *Spongia officinalis* y *Chondrosia reniformis*.

c) En el mar.

Paul y Van Alstyne (1988) y Poiner *et al.* (1989) realizaron unos experimentos ofreciendo calamar a los posibles depredadores, naturalmente impregnado con las sustancias a probar. Los compuestos lipídicos no se disuelven rápidamente (Paul y Van Alstyne, 1988 y refs. allí mencionadas). En nuestros experimentos utilizamos calamar (trozos de 1 cm<sup>2</sup>) colocado en unas cuerdas de "nylon", situadas en flotación desde el fondo (a unos 9 m de profundidad). Las sustancias probadas fueron:

- . Poliacetilenos de *Peltodoris atromaculata* (mezcla de las dos fracciones) 40 µg/trozo de calamar
- . Extracto del borde del manto (polygodial) de *Dendrodoris limbata* 30 µg/trozo de calamar
- . Tiopurina de *Doris verrucosa* 80 µg/trozo de calamar
- . Verrucosinas (mezcla) de *Doris verrucosa* 40 µg/trozo cal.
- . Extracto del manto de *Tethys fimbria* 40 µg/trozo cal.
- . Esteres de la puesta de *D. limbata* 40 µg/trozo cal.

Se dejaba evaporar el disolvente (que había sido inyectado en los trozos de calamar) y se congelaba hasta el momento de realizar el experimento. Los controles se realizaron con calamar sin nada y calamar con disolvente (acetona). Se utilizaban cuatro cuerdas en las que había el mismo número de muestras ordenadas de forma distinta (mediante números al azar). Las cuerdas se situaban a poca distancia unas de otras (entre 1 y 2 m) en zonas rocosas de la Punta Sta. Ana (Blanes) durante alrededor de una hora, durante la cual se observaban a distancia y se anotaban los peces que

acudían a comer (*Symphodus tinca*, *Diplodus sargus*, *D. vulgaris*, *D. annularis*, *Coris julis*, *Mullus barbatus*, *Mullus surmuletus* y *Morone labrax*).

Al parecer el calamar no es el plato favorito de los peces litorales (aunque en acuario sí se lo comen), así que se tuvo que cambiar el sustrato del experimento y se probó con gusanos poliquetos (*Marphysa sanguinea*, la "rosca"). Las sustancias se probaron a las mismas concentraciones (excepto el extracto del borde del manto de *D. limbata* conteniendo polygodial, que esta vez se usó a una concentración de 40 µg por fragmento de gusano (1.5 cm de largo x 8 mm de ancho)). Esta vez se incorporó al experimento un fragmento de gusano (de las mismas proporciones) teñido con azul de metileno por cuerda. El resto de datos es el mismo que para los experimentos con calamar.

#### **4.6. Cultivos en acuario y experimentos con larvas.**

Con el objeto de seguir la formación y/o adquisición de los metabolitos en las distintas fases de desarrollo del animal, se recogieron las puestas obtenidas en acuario (y ocasionalmente alguna del medio natural). Una vez obtenidas las puestas estas se pesaban, se pasaban por alcohol al 70% durante un par de segundos (para limpiarlas) y se mantenían en agua de mar filtrada con oxigenador durante unos siete días (o hasta ver algunas larvas ya formadas). Al iniciar el cultivo todas las puestas fueron pesadas (peso húmedo), secándolas bien antes de pesarlas. A continuación se transferían enteras o a trozos a recipientes con agua de mar filtrada que eran cerrados herméticamente (con parafilm, sin aire dentro). Se añadía una cantidad de cloranfenicol en algunos casos (1 ml de solución (preparada con 5 g de cloranfenicol en 0.5 l de agua destilada) por cada litro de agua de mar filtrada), y nunca después de la metamorfosis. También se añadía al agua de mar 0.25 ml de solución de EDTA (preparada con 50 mg de EDTA en 50 ml de agua destilada) por cada litro de agua de mar filtrada. Para cambiar el agua de los cultivos (semanal o quincenalmente) se usaban filtros de tamaños diversos: 53 µm, 60 µm, 125 µm, 224 µm y 500 µm.

Para el caso de que las larvas pudieran ser planctotróficas, se preparó un cultivo del alga *Isochrysis galbana*, que se añadía a la puesta poco antes

de la metamorfosis. El alga iba acompañada de una solución con vitaminas y minerales preparada con la siguiente receta:

- . 1 l de agua de mar filtrada.
- . 1 ml de  $\text{NaNO}_3$  (7.5 g en 100 ml de agua destilada)
- . 1 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.5 g en 100 ml de agua destilada)
- . 0.5 ml de solución de vitaminas. Esta solución se prepara de la siguiente manera: se preparan separadamente 1 mg de biotina en 9.6 ml de agua destilada (a mantener en el congelador) y 1 mg de vitamina  $\text{B}_{12}$  en 8.9 ml de agua destilada. Se coge 1 ml de la primera solución y 0.1 ml de la segunda, se enrasa hasta 100 ml de agua destilada y se añaden 20 mg de tiamina. Esta es la solución de vitaminas de la cual se cogen 0.5 ml.
- . 1 ml de minerales traza (este ingrediente no lo hemos añadido en ninguna ocasión, ya que no lo hemos hallado a la venta, y lo hemos sustituido por unas gotas de agua de mar filtrada).

De esta manera se obtenían muestras (al cambiar el agua) de todos los cultivos a lo largo del tiempo, muestras que eran fijadas con alcohol al 70% o con glutaraldehído según su finalidad. Los cultivos se realizaron en una sala a temperatura aproximadamente constante entre 14 y 18°C, con luz artificial.

Otra serie de experimentos se realizó con los ejemplares de *Dendrodoris limbata* obtenidos en cultivo en el C.E.A.B., tratando de averiguar cuál es su alimento. Para ello, se colocaron en placas de Petri con un sustrato a base de algas secas trituradas y se contaron los supervivientes a lo largo del tiempo, por comparación con ejemplares sin este sustrato (y sin otro alimento). En el capítulo correspondiente (5. 14.) se hallaran más datos al respecto.

El último experimento se realizó con la especie *Peltodoris atromaculata*. Se mantuvieron dos grupos de ejemplares desde que se capturaron, midiendo unos pocos milímetros hasta su estado adulto (durante más de un año). Durante este tiempo se alimentaron con la esponja *Petrosia ficiformis*, que era renovada como mínimo una vez cada 15 días. Se anotaron las fases en que se realizaron puestas y se intentaron cultivar (del modo ya descrito) para cerrar el ciclo. Para ello se emplearon más de 20 puestas

obtenidas en acuario. En el apartado correspondiente a esta especie (5.13.) se detallan los datos de este experimento.

#### **4.7. Metodos logísticos.**

Se han empleado diversos ordenadores y programas a lo largo del desarrollo de este trabajo. Cabe destacar como "hardware" un ordenador Compaq LTE 286, un IBM PS/50 y un IBM/Value Point 450DX2, así como varios MacIntosh. Como "software" se han empleado los programas Word Microsoft, QuattroPro, SigmaPlot, Paint, Harvard Graphics y ChemDrawn, entre otros. Es de destacar el uso de una tableta digitalizadora y el programa Hipad para medir áreas, acoplando cámara clara y ordenador.



**5. ESTUDIO DETALLADO  
POR ESPECIES**

## 5.1. *Hypselodoris cantabrica* Bouchet y Ortea, 1980.

### 5.1.1. Introducción.

#### 5.1.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.

*Glossodoris gracilis*.- Pruvot-Fol (1953).

*Glossodoris valenciennesi*.- Ros (1975, 1976a).

*Hypselodoris cantabrica*.- Bouchet y Ortea (1980); García (1983); Luque (1983 y 1986); García *et al.* (1990 y 1991); Avila y Durfort (1992); Fontana *et al.* (en prensa).

#### 5.1.1.2. Breve descripción y características de la especie.

Esta especie se caracteriza en estado adulto por presentar una línea central amarilla que se ensancha delante y tras los rinóforos, acompañada por numerosas puntuaciones y manchas amarillas. El borde del manto es amarillo. Generalmente presenta de 8 a 10 hojas branquiales. Los rinóforos son azules y las láminas presentan manchas amarillas por detrás formando un zig-zag.

#### 5.1.1.3. Referencias comentadas.

##### Morfológicas o descriptivas.

Una descripción detallada de esta especie se puede hallar en Bouchet y Ortea (1980), y Ortea y García (en prensa).

La histología y descripción histoquímica de las MDFs de *Hypselodoris cantabrica* fue realizada por García *et al.* (1990 y 1991). El tamaño de las MDFs varía con el tamaño de los individuos: a) en ejemplares de 13-25 mm encontraron de 1 a 3 MDFs anteriores de unas 300  $\mu\text{m}$ , y de 3 a 6 posteriores de 1900  $\mu\text{m}$ , b) en ejemplares de 40 a 45 mm citaron de 3 a 4 MDFs anteriores de unas 600  $\mu\text{m}$  y 7 posteriores de unas 1400  $\mu\text{m}$ .



El desarrollo larvario ha sido mencionado por Bouchet y Ortea (1980). *Hypselodoris cantabrica* presenta huevos de unos 110 µm de diámetro y las larvas eclosionan aproximadamente a los siete días.

### Ecológicas.

*Hypselodoris cantabrica* se encuentra bajo piedras y sobre ellas muy especialmente, en extraplomos y en grutas, donde parece alimentarse de *Dysidea fragilis* (Bouchet y Ortea, 1980).

Hasta el presente no habían sido descritos mecanismos de defensa para esta especie, así como tampoco ningún tipo de secreción externa ni pH.

### 5.1.2. Material estudiado.

LOCALIDAD	FECHA	(1)	(2)	(3)
Magdalena (Santander)	16-4-88	6	IT	rád-MDFs
Mataleñas (Santander)	15-4-88	6	IT	MDFs
Sagres (Portugal)	Mayo 1988	9	-	*
Las Llanas (Asturias)	2-11-89	14	IT/IM	química
	10/22-12-89	38	IT/IM	química
Santander	27-3-90	17	IT	quím-rád
Zumaia (Guipúzcoa)	13-4-91	4	IT	MDFs-exp
St. Juan de Luz (Francia)	14-4-91	2	IT	MDFs-exp
Toró (Llanes, Asturias)	16-4-91	1	IT	exp
Pechón (Cantabria)	17-4-91	1	IT	rád-exp
Ribadesella (Asturias)	18-4-91	1	IT	exp
=====				
TOTAL		99		

(1) Número de individuos.  
(2) IT= Intermareal rocoso, IM= Inmersión (0-10m).  
(3) Utilización del material (rád= rádula, quím= química, exp= experimentos, MDFs= estudio microscópico de las MDFs).  
\* = Este material fue analizado químicamente, pero debido a su larga conservación en alcohol no se obtuvieron resultados positivos, ya que los productos se alteraron.

Tabla 5.1. Datos de los ejemplares de *H. cantabrica* estudiados.

Aunque los ejemplares no fueron recolectados sobre *Dysidea fragilis*, dicha esponja se encuentra citada en estas zonas (Ferrer Hernández, 1914, 1918; Lombas, 1982) al igual que *Dysidea avara* (Lombas, 1982).

### 5.1.3. Resultados y discusión.

#### 5.1.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

##### Esquemas anatómicos.

Los ejemplares de *Hypselodoris cantabrica* capturados presentaban un modelo cromático similar al descrito por Bouchet y Ortea (1980) (Fig. 5.1.A).

La disposición de los órganos anatómicos de esta especie fue asimismo descrita por estos autores (Fig. 5.1.B). En esta figura puede apreciarse la disposición de los distintos órganos que fueron analizados químicamente por separado (ver apartado 5.1.3.2).

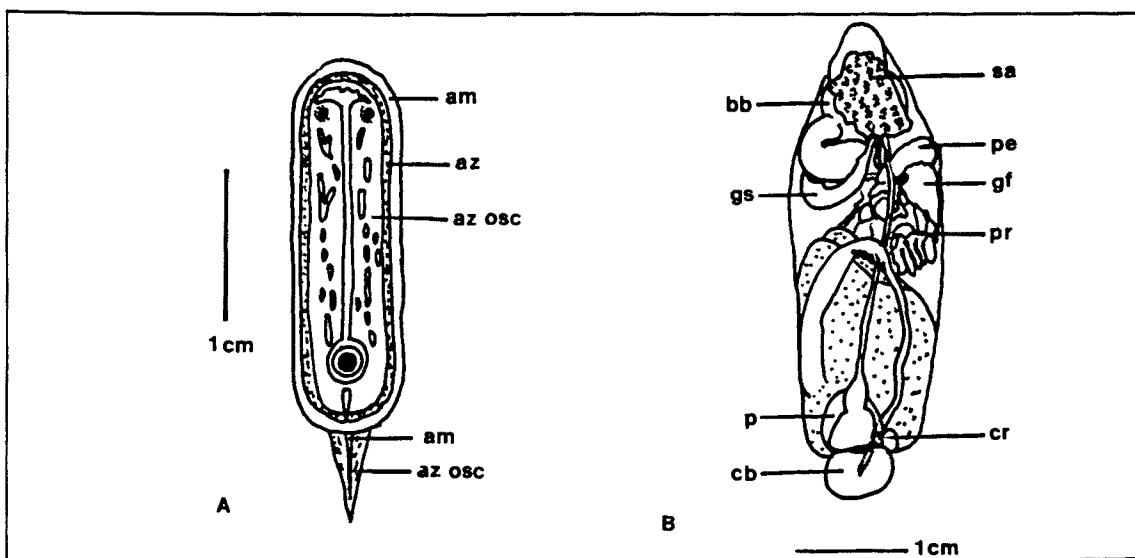


Figura 5.1.A. Morfología externa de *H. cantabrica*. B. Anatomía interna de la misma especie. (Ambos de Bouchet y Ortea, 1980). (bb= bulbo bucal; gs= glándulas salivares; p= pericardio; cb= cavidad branquial; sa= glándula sanguínea; pe= pene; gf= glándula femenina; pr= próstata; cr= canal renopericárdico; am= amarillo; az= azul; az osc= azul oscuro).

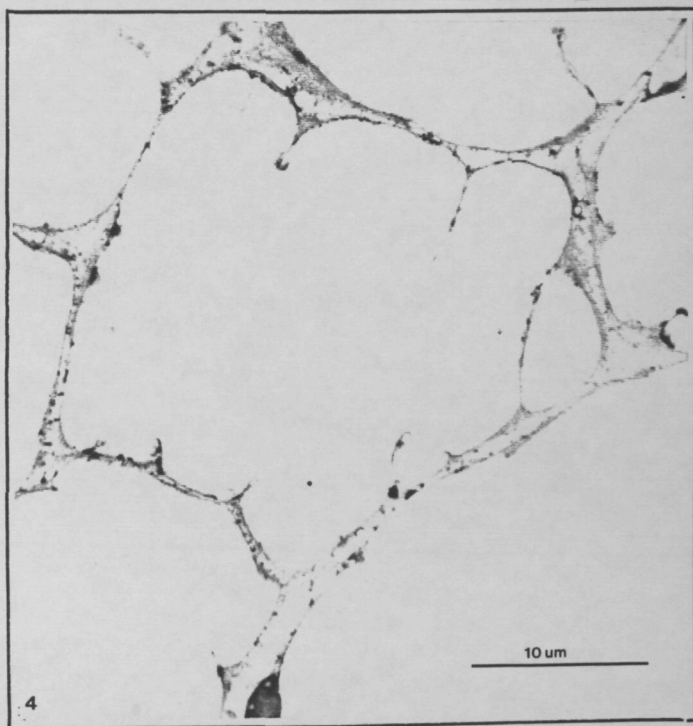
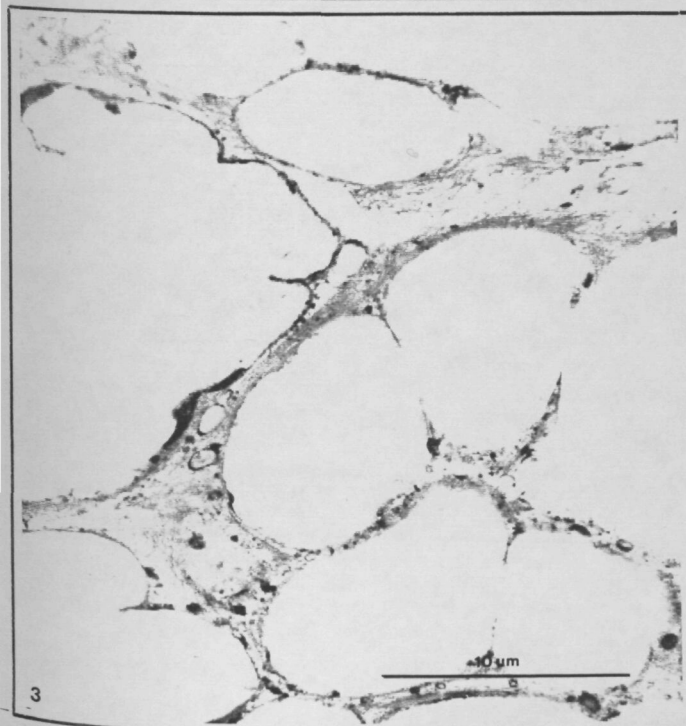
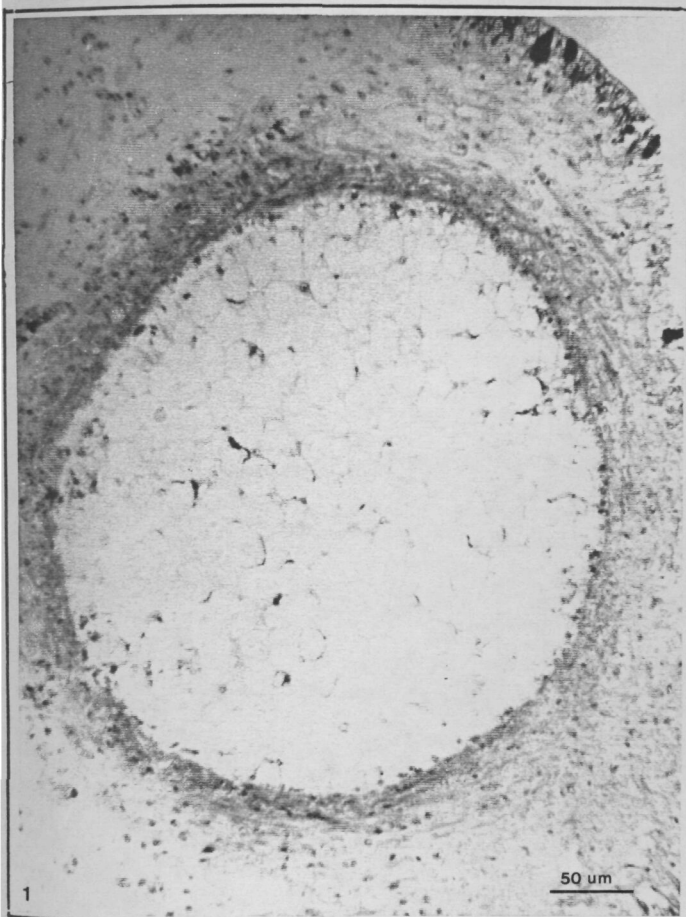
### Formaciones dérmicas del manto (MDFs).

La Tabla 5.2. presenta el tamaño de los ejemplares y el número de MDFs anteriores y posteriores de los mismos.

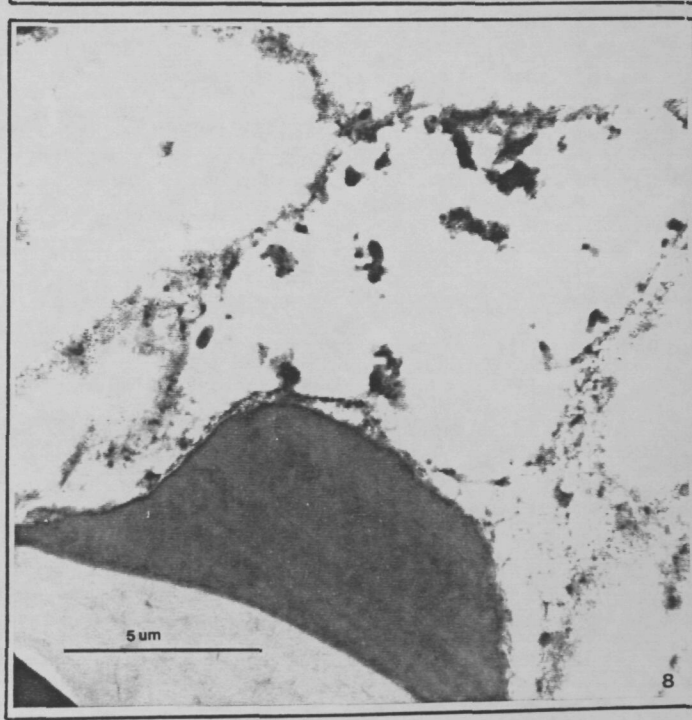
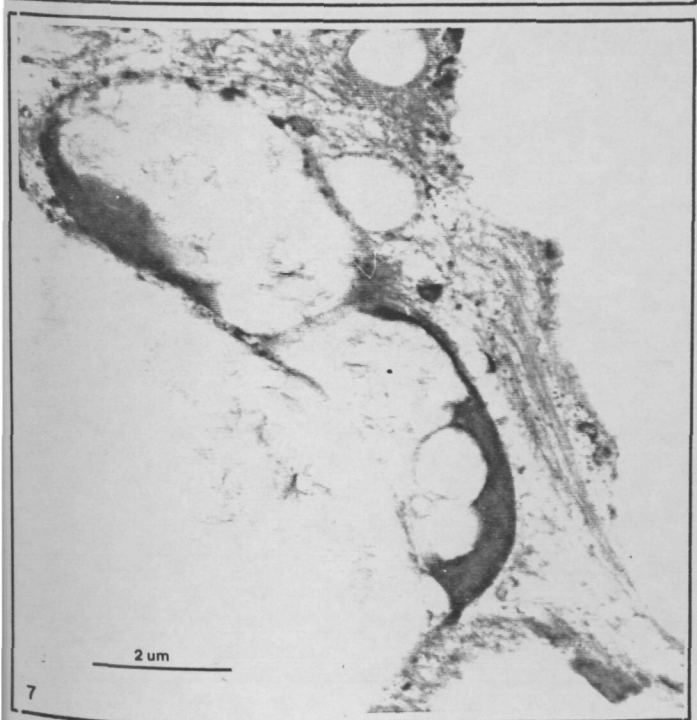
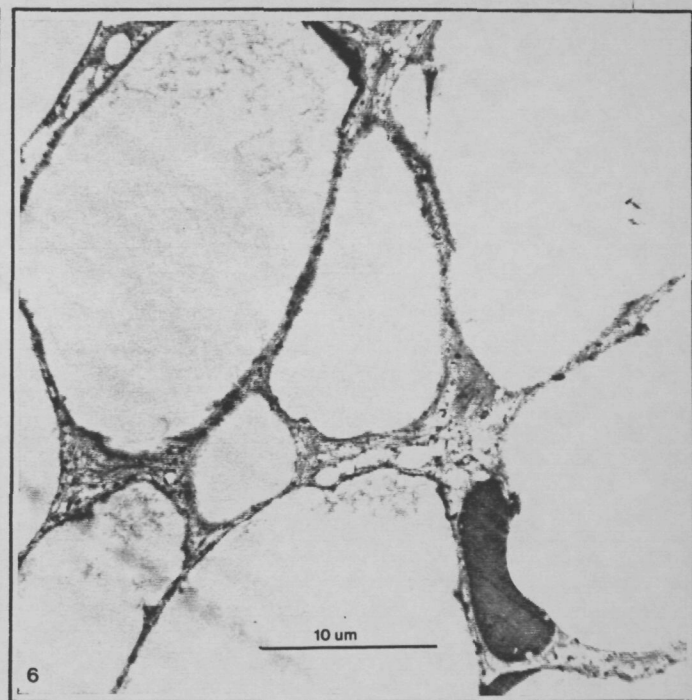
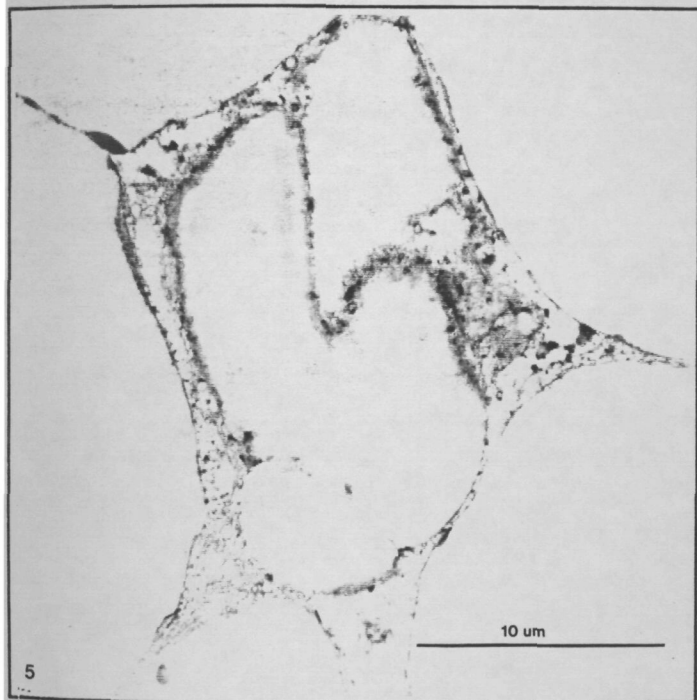
PROCEDENCIA	TAMAÑO (cm)	MDFs ant.	MDFs post.
Magdalena	2	2+2	4
	*2.4	1+1	3
	*2.2	0	3
Mataleñas	*1.8	0	4
	*1.6	0	4
Sagres	*2.3	0	4
	*2.4	0	6
	*2.8	0	5
Las Llanas	2	2	7
	1.5	2+2	4
	1.4	2+2	4
	1.5	1+1	5
	*0.8	0	2
	*0.7	0	3
Santander (27-3-90)	1	1+2	3
	2.5	3+2	5
Cantábrico 1991	*1.6	1+0	4
	*1.6	0	3

Tabla 5.2. Número de MDFs en los ejemplares de *H. cantabrica* estudiados (\*= ejemplares observados tras un largo período de conservación).

El número de MDFs hallado resulta ligeramente superior al descrito por García *et al.* (1991), sobre todo para las anteriores, que corresponderían en estos ejemplares a los de García *et al.* de mayor tamaño. Este hecho podría ser debido a una variabilidad poblacional (aquellos ejemplares procedían de Gibraltar, mientras que estos fueron capturados en la cornisa cantábrica). El reducido número de MDFs hallado en algunos de estos ejemplares, señalados con un asterisco en la tabla, es debido a que estas se contaron en animales fijados o congelados durante un largo período, por lo cual era bastante difícil verlas, principalmente las anteriores por ser más pequeñas.



LAMINA 1



En cuanto a la localización en el animal, se ha observado que se encuentran a ambos lados de los rinóforos y tras las branquias, como en la mayor parte de las especies.

No se ha hallado ninguna referencia en la bibliografía a la morfología particular que presentan las MDFs anteriores, que son piriformes, a diferencia de las posteriores que son esféricas. Este hecho no ha sido observado en ninguna otra de las especies estudiadas.

Al microscopio óptico, los cortes semifinos de las MDFs posteriores de dos ejemplares de la Magdalena (16-4-88) presentan el aspecto que se puede ver en las fotografías 1 y 2. Son muy voluminosas. La periferia es menos basófila que en otras especies (como *H. villafranca*), presentando más elementos fibrilares que celulares (coincidiendo con García *et al.* 1991). La morfología es bastante particular, siendo las vesículas internas más poliédricas que en otras especies. Al microscopio electrónico (MET) los límites se observan con claridad, siendo evidente la fusión de unas vesículas con otras (sugerida por García *et al.*, 1990), como se puede ver en las fotografías de las páginas siguientes (3, 4 y 5). Entre las células vacuolares se hallan también otras células con un contenido electrodenso, como se puede apreciar en las fotografías (1, 2, 6, 7 y 8), hecho que no coincide con la descripción de García *et al.* (1991).

El epitelio presenta varios tipos de células secretoras, de tipo mucoso y de contenido basófilo (ver fotografía 2).

### Rádula y armadura labial.

Si bien la fórmula radular de esta especie es ya conocida y la morfología de los dientes ha sido descrita (un máximo de 5 dentículos poco desarrollados en la segunda cúspide de los dientes), hemos considerado de interés incluir algunas de las fotografías realizadas al MEB, tanto de la rádula como de la armadura labial, en la que los uncinos son simples (Bouchet y Ortea, 1980).

Las fórmulas radulares de algunos ejemplares se detallan en la Tabla 5.3.

Número de filas	Número de dientes	Localidad	Referencia
84	140-0-140	Santander	esta
40	73-0-73	Santander	esta
64	130-0-130	Magdalena	esta
74	100-0-100	Asturias	esta
60	116-0-116	Málaga	Bouchet y Ortea (1980)
63	135-0-135	Asturias	Ortea y García ( <i>en prensa</i> )

Tabla 5.3. Fórmulas radulares de algunos ejemplares de *H. cantabrica*.

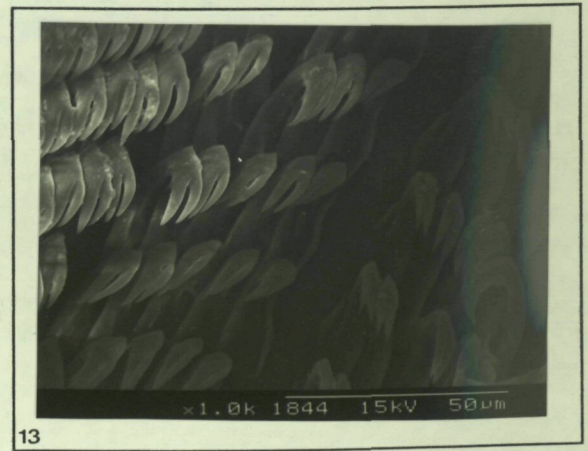
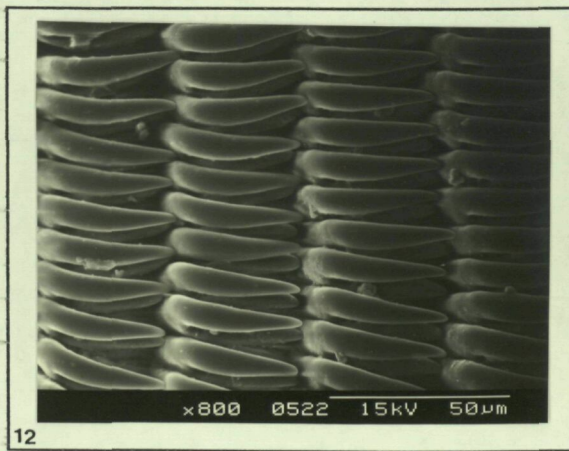
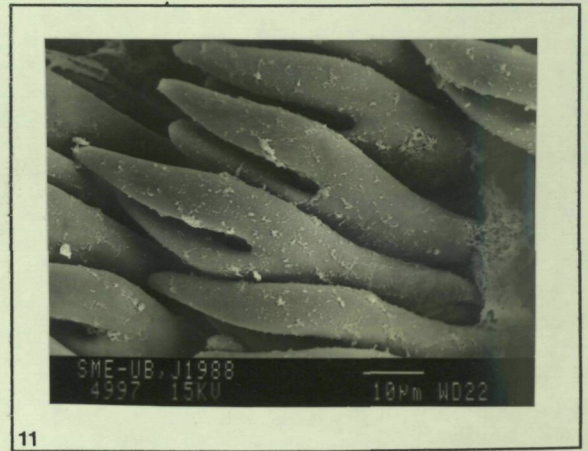
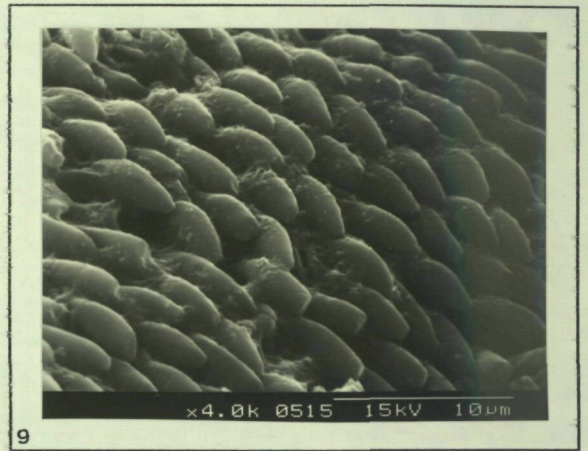
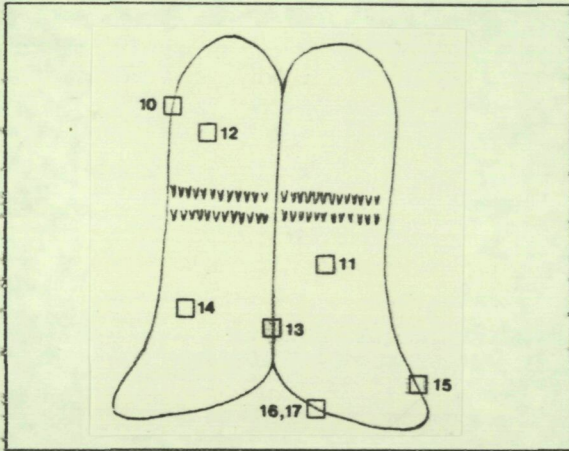
Los valores obtenidos son similares a los descritos por Bouchet y Ortea (1980) y Ortea y García (*en prensa*), si bien algo superiores, lo que podría ser debido, por ejemplo, a diferencias en el tamaño de los ejemplares (detallado en la Tabla 5.2. para algunos ejemplares). En el esquema y fotografías siguientes se puede observar la morfología de los dientes en cada zona de la rádula. En algunos casos se cuentan más de 5 dentículos en los dientes, llegando a 6 en numerosas ocasiones.

#### 5.1.3.2. Análisis químico.

##### Productos obtenidos: estructura.

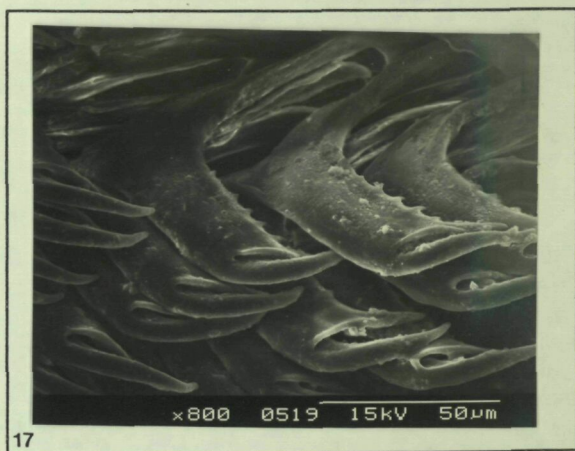
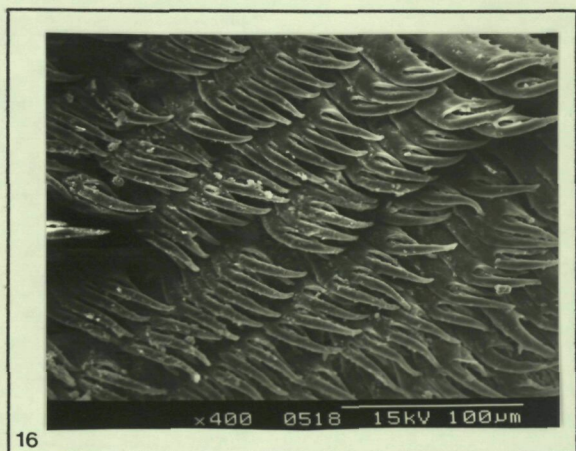
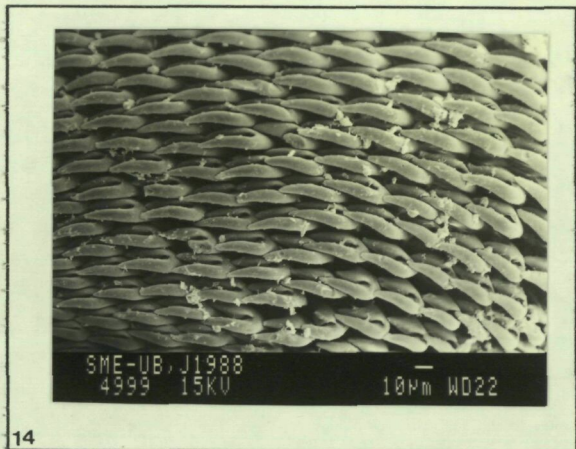
Ejemplares de Santander. Se pretendía detectar la presencia de longifolina, metabolito que había sido hallado en otras especies de este género con anterioridad (Cimino *et al.*, 1982), cuya fórmula se observa en la Figura 5.3., y tras haber iniciado estudios previos con otras especies (*H. webbi* y *H. villafranca*). Un primer ejemplar (Magdalena-1988) fue disecado y se realizaron las extracciones en el modo habitual. Mediante placas cromatográficas (en éter de petróleo-éter etílico 1-1 y en éter de petróleo sólo, con referencia de longifolina para comparar). En dichas placas no se vió la longifolina, aunque aparecieron unos productos aparentemente relacionados con ella y otros furanos de *rf* superior, posiblemente como resultado de su

*Hypselodoris cantabrica*





*Hypselodoris cantabrica*



degradación, también observados en ejemplares de localidades cercanas (Mataleñas) y de otros lugares (Sagres).

Una nueva colección de ejemplares de Santander (17) fue obtenida en 1990. El mucus fue obtenido de los animales vivos y congelado a continuación. El extracto etéreo del mucus de 3 animales y de 2 animales por separado, no pareció presentar nada de interés (tras un análisis cromatográfico mediante TLC). Sin embargo, extrayendo con éter etílico el mucus de 11 ejemplares conjuntamente se pudo observar una pequeña cantidad de furanos de rf superior y una sustancia de rf inferior tipo tavacfurano (sustancia hallada en otras especies, ver apartado 5.3., por ejemplo). Se observaba claramente la presencia de los productos furánicos, a pesar de presentar el extracto alguna mancha correspondiente a productos de degradación.

De esta colección, 14 ejemplares fueron extraídos con acetona, conservándose 3 para disecar y para el estudio de su rádula. El peso seco de estos 14 ejemplares fue de 668.4 mg. No presentaban ni longifolina, ni tavacfurano, sino solo furanos tipo nakafurano-9 y dendrolasina (que se comentarán posteriormente).

Dos de los ejemplares restantes se disecaron del modo habitual. La extracción se realizó a oscuras. Uno de ellos medía 2.5 cm y el otro 1 cm. Se obtuvieron los resultados que se exponen en la Tabla 5.4.

Partes	Peso seco	Extracto acetónico
MDFs (10+6)	3.1	1.8
resto del manto y pie	30.4	12.9
glándula digestiva	19.8	8.8
resto de vísceras	12.2	1.9
branquias	<0.1	5.0

Tabla 5.4. Análisis químico de los ejemplares de Santander (datos en mg).

La placa cromatográfica calibrada en éter de petróleo, revelada con Ehrlich, mostró productos furánicos muy abundantes en las MDFs, y poco

abundantes en el resto. El furano más abundante era el que presentaba un rf de 0.7, de color naranja-marrón, más otro muy poco abundante, justo encima del anterior, de color fucsia. En el extracto de la glándula digestiva se observó a rf 0.9, un furano similar al de *H. villafranca* de Santander, poco abundante. Se hicieron también las placas impregnadas con AgNO<sub>3</sub>, en heptano-benceno 1-1.

En total, de 14 animales de Santander, se obtuvieron 119 mg de extracto etéreo de los cuales se separaron mediante columna de sílice primero, y de SiO<sub>2</sub>-AgNO<sub>3</sub> después, los compuestos que se indican en la Tabla 5.5.

<i>ent-furodysinina</i>	0.5 mg/animal
<i>nakafurano-9</i>	0.3 mg/animal

Tabla 5.5. Sustancias halladas en *H. cantabrica* de Santander.

Análisis del pigmento. Se comprobó que el fuerte color azul de estos animales se debe a un pigmento (como en la especie *H. webbi* según Anderson y Lane (1963)), ya que al poner ácido clorhídrico (1N) en el extracto, el color viraba a rojo y al poner a continuación NaOH viraba otra vez a azul. El pigmento se hallaba en el extracto acuoso. Se separó repetidas veces con butanol y se hicieron placas en cloroformo-metanol 7-3. Aparecieron algunas manchas visibles bajo la luz UV. En butanol-ácido acético-agua 60-15-25 se observaron más manchas, es decir más sustancias, visibles al UV y reactivas con sulfato. Se conservaron los extractos del pigmento de 8 animales, más otros extractos acuosos y butanólicos de ejemplares de Santander (de 1988). Estos extractos están en fase de estudio en el ICMIB.

Secreciones externas y pH. Hasta el momento, no habían sido descritos hasta ahora ni las secreciones ni el pH de esta especie. Se recogió la secreción mucosa de 17 animales de Santander mientras estaban vivos. Dicha secreción fue congelada y el resultado de su análisis cromatográfico es el indicado anteriormente. Se puede afirmar que las sustancias furánicas estaban en dicha secreción mucosa, aunque se degradaron bastante. Se midió asimismo el pH en ejemplares vivos (del Cantábrico-91), que resultó ser neutro (pH=7).

Ejemplares de Asturias. Se realizó un primer análisis cualitativo extrayendo con acetona un ejemplar entero (1989), comparándolo con otras especies de la misma zona geográfica. Este ejemplar presentaba más longifolina y al menos otros 4 furanos de rf superior (algunos de ellos probablemente distintos a los de *Hypselodoris villafranca*, única especie analizada de aquella zona antes de ésta).

Se extrajo un segundo animal, esta vez disecado. Las 5 MDFs posteriores, de gran tamaño, presentaban, a juzgar por el extracto y las placas, longifolina y todos los furanos antes mencionados. El resto de las vísceras, así como los rinóforos y las branquias, no presentaban productos interesantes. El hepatopáncreas y el resto del manto presentaban el mismo patrón que las MDFs, pero en cantidades bastante inferiores. Las MDFs anteriores, una a cada lado, que fueron extraídas también por separado, presentaban lo mismo pero en cantidades inferiores. En la placa se pusieron como referencia la longifolina y los demás furanos de *H. villafranca*. El análisis se repitió con otro ejemplar de la misma colección, obteniéndose resultados análogos.

Se extrajeron a continuación 8 ejemplares enteros del modo habitual y se preparó una columna de sílice. Tras filtrar y evaporar la acetona, se separó la fracción etérea mediante un embudo separador. El peso del extracto etéreo fue de 40 mg. Se realizaron placas de control antes de iniciar la columna. El solvente inicial fue éter de petróleo, aumentando progresivamente el éter etílico hasta llegar a la proporción 1-1 al final de la columna. Las fracciones resultantes, agrupadas según las placas cromatográficas reveladas con Ehrlich, fueron las siguientes:

- fr. 15-20: primera substancia, violeta, 1 mg.
- fr. 21-31: productos furánicos violeta y rosa, 4 mg.
- fr. 32-39: mezcla de productos. 2 mg.
- fr. 40-51: 3 mg de furanos.
- fr. 52-76: varios, 8 mg.
- fr. 82-84: longifolina, 3mg.
- fr. 85: fin (descargo con 1-1).6.8 mg. Esteroles.

Con estos resultados se realizaron los siguientes análisis:

. una primera sustancia, violeta, 1 mg, (fr. 15-20), se estudió al NMR y espectrometría de masa.

. 3 mg de furanos de rf inferior, (fr. 40-51), de la que se realizó estudio NMR y espectrometría de masa.

Los espectros NMR se realizaron con cloroformo deuterado. Ambos espectros NMR pueden observarse a continuación.

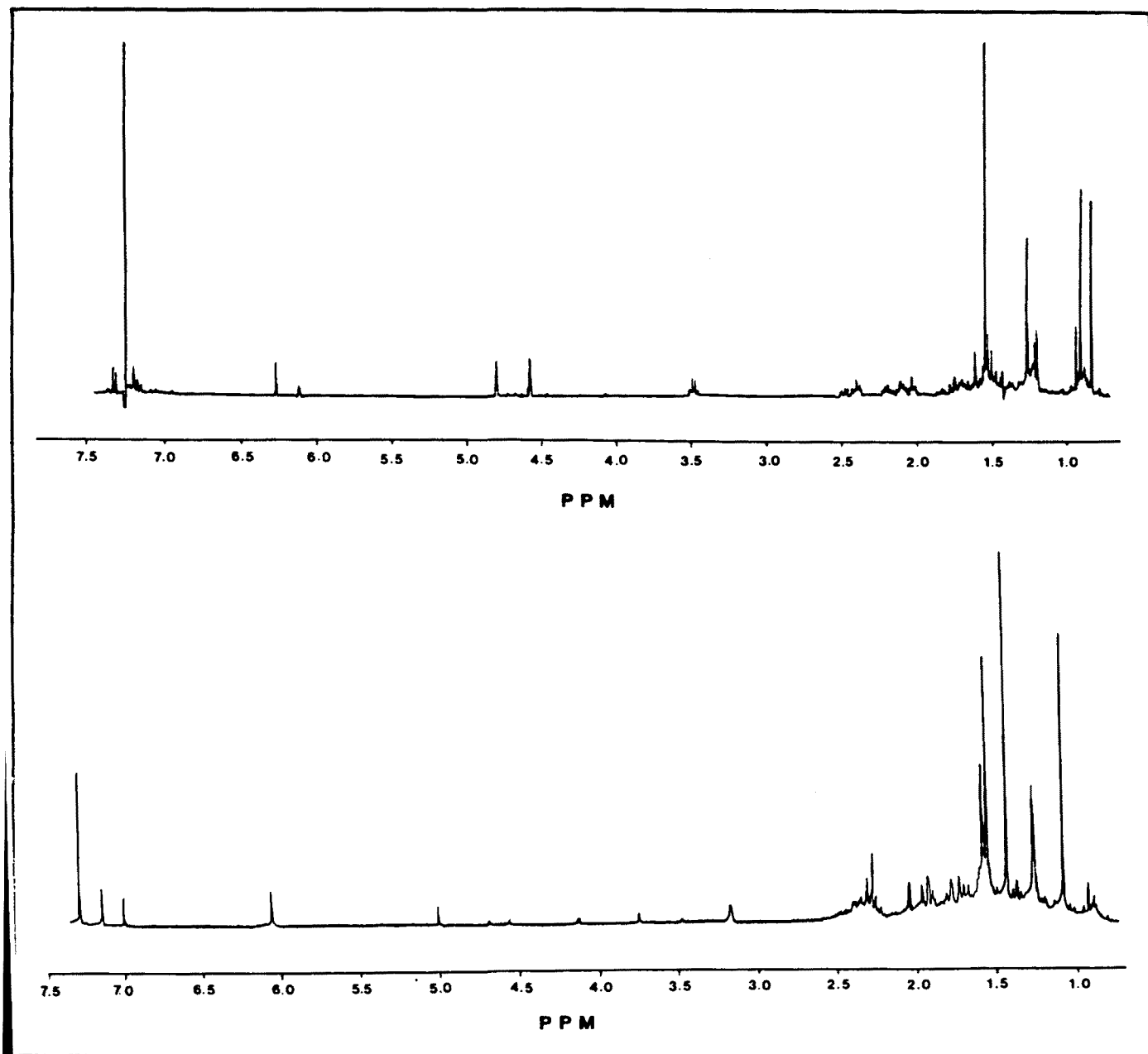


Figura 5.2. Espectros NMR de las fracciones 15-20 y 40-51.

El primero de los espectros correspondía al *iso*-nakafurano-9, mientras que el segundo es del nakafurano-9.

Las cantidades de los productos no eran suficientes para realizar el resto de análisis y tests necesarios, por lo que fue necesaria una segunda colección de ejemplares. Se extrajeron a oscuras 3 ejemplares. Se disecaron en las partes que se indican en la Tabla 5.6.

	Peso seco	Extracto acetónico
MDFs (23) y borde del manto	14.2	6.3
resto del manto y pie	31.5	4.6
glándula digestiva	38.3	8.7
resto de vísceras	11.4	2.2

Tabla 5.6. Análisis químico de los ejemplares de *H. cantabrica* de Asturias (datos en mg).

La placa cromatográfica calibrada, en éter de petróleo, y revelada con Ehrlich, mostró que el patrón era, como en la primera colección, distinto a todos los demás *Hypselodoris* analizados con anterioridad, parecido al *H. tricolor* y *H. villafranca* asturianos, y *H. tricolor* de Santander. Pero, respecto a los ejemplares de Santander, presentaban algunos productos similares o iguales y además otros distintos. Los productos furánicos que se observaron fueron: rf 0.35 azul-violeta, rf 0.4 producto muy poco abundante, rf 0.45 UV+ violeta, rf 0.6 producto rosa-fucsia (que en el extracto del hepatopáncreas al estar más concentrado se veía marrón), e inmediatamente encima (rf 0.65) otro rosa-naranja, rf 0.8 rosa-naranja. Se hizo otra placa, esta vez impregnada con AgNO<sub>3</sub>, en heptano-benceno 1-1, y se vió que uno de los productos era el nakafurano-9 (se puso una referencia del mismo en la placa), así como otro de ellos era la dendrolasina.

Con el objeto de obtener la máxima cantidad de productos posible, se extrajeron 25 animales enteros de la segunda colección de muestras de Asturias, obteniéndose un peso seco de 256 mg. Posteriormente se extrajo el resto y se unieron los extractos, de modo que se obtuvieron 772 mg de extracto etéreo de 38 animales. Los compuestos se separaron mediante una columna de SiO<sub>2</sub>-AgNO<sub>3</sub> (7.4%), usando heptano-benceno 9-1 como disolvente.

Así se obtuvieron: nakafurano-9, dendrolasina, agassizina, *ent*-furodysinina, *iso*-nakafurano-9 e *iso*-dehidro-dendrolasina. Longifolina y tavacfurano se separaron previamente mediante una columna de sílice.

Tras realizar el estudio mediante NMR de cada uno de los compuestos, se puede decir que de todo el conjunto de animales de Asturias se obtuvieron las cantidades que se indican en la Tabla 5.7

longifolina	1.47 mg/animal
tavacfurano	1.02 mg/animal
nakafurano-9	0.5 mg/animal
agassizina	0.03 mg/animal
<i>iso</i> -nakafurano-9	0.03 mg/animal
<i>ent</i> -furodysinina	trazas
dendrolasina	0.6 mg/animal
<i>iso</i> -dehidrodendrolasina	0.03 mg/animal

Tabla 5.7. Sustancias halladas en los ejemplares de *H. cantabrica* de Asturias.

Los valores numéricos, así como demás datos espectrales de los compuestos (NMR, MS, IR, UV) se hallan en el apéndice 10.I.

### Discusion general de la especie.

Se incluyen a continuación (Fig. 5.3.) las formulas de todos los compuestos mencionados para esta especie.

De entre todos los furanosesquiterpenos hallados, el *iso*-nakafurano-9 y la *iso*-dehidro-dendrolasina se han hallado por primera vez como productos naturales. El primero de ellos fue descrito como intermediario en la síntesis del nakafurano-9 (Tanis y Herrinton, 1985). Las características químicas de ambas moléculas se han descrito en Fontana *et al.*, (*en prensa*), y se detallan en el apéndice 10.I.

La *ent*-furodysinina fue descrita previamente en la esponja *Dysidea tupha* (Guella *et al.*, 1985) y es el enantiómero de un producto hallado en una especie de *Dysidea* australiana (Kazlauskas *et al.*, 1978). Por otro lado, la

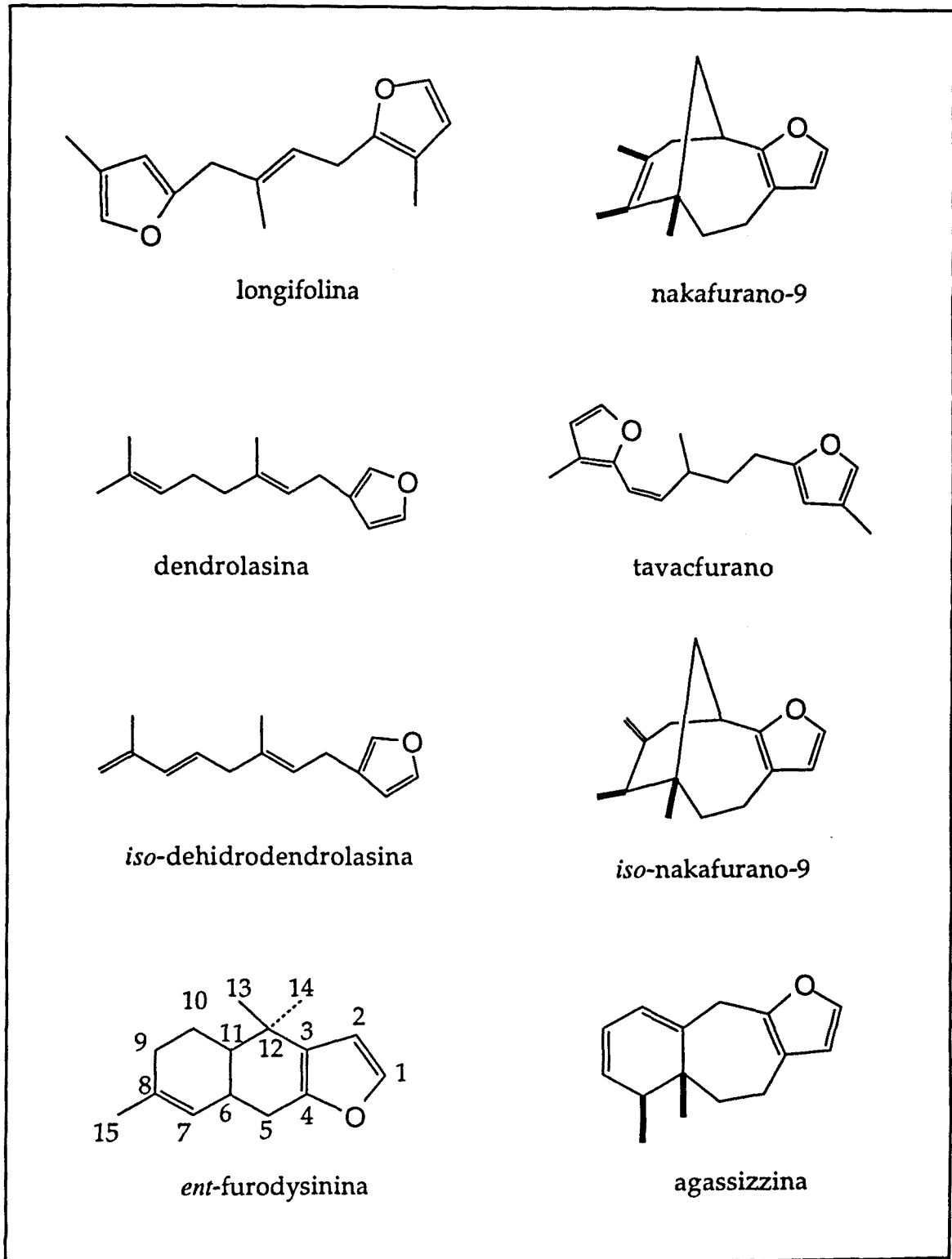


Figura 5.3. Fórmulas de las sustancias halladas en *Hypselodoris cantabrica*.



furodysinina ha sido hallada en varias especies de *Hypselodoris* y de *Dysidea* (ver apartados 6., 7.1. y 7.2.).

El nakafurano-9 se halló en *Hypselodoris godeffroyana*, *Chromodoris maridadilus* y *Dysidea fragilis* de Hawaii (Schulte *et al.*, 1980) y en el Mediterráneo en *H. webbi* y *H. villafranca* (ver los apartados 5.3. y 5.4.).

La longifolina fue descrita en una planta (*Actinodaphne longifolia*) por Hayashi *et al.* (1972), y ha sido hallada también el Mediterráneo en otras especies de *Hypselodoris* (Cimino *et al.*, 1982; García *et al.*, 1990; ver apartados 5.3. y 5.4.) y en la esponja *Dysidea fragilis* (ver apartados antes mencionados).

El tavafurano se halló previamente en *Dysidea* sp (Guella *et al.*, 1985) y hemos hallado un isómero en *H. webbi* (ver apartado 5.3.). La dendrolasina fue descrita en una hormiga (Quilico *et al.*, 1956), y posteriormente se citó para *Chromodoris lochi* y su esponja presa (Kakou *et al.*, 1987) y en algunos *Hypselodoris* (Hochlowski *et al.*, 1982) (ver apartados 6.3., 7.1.1. y 7.3.).

Los compuestos mencionados se han hallado en todos los casos presentes en las MDFs y en la glándula digestiva. Las diferencias en las sustancias según el lugar de recolección, creemos que son asimilables a la diferente variedad de esponja de la que alimentan (ver apartado siguiente). En comparación, los animales de Las Llanas (Asturias) y los de Santander presentan diferentes furanosesquiterpenoides, y los que son comunes a ambas poblaciones presentan diferencias cuantitativas.

En total, los ejemplares de Santander presentaban tan sólo 0.8 mg de furanosesquiterpenos por animal, mientras que los de Asturias presentaban unos 3.6 mg/animal. Esta variabilidad está sin duda asociada al origen dietético de los compuestos (ver apartado siguiente). Una hipotética posibilidad, sería una relación entre el mayor desarrollo de *Dysidea* en otoño (aún por demostrar), y la mayor presencia de furanosesquiterpenos en los nudibrancios de Asturias (Otoño de 1989). Los ejemplares de Santander se recogieron al inicio de la primavera. La posible relación con el tamaño de los ejemplares quedaría descartada, al medir como media 1.3 cm los ejemplares de Las Llanas y 1.9 cm los de Santander.

### Origen de los productos.

Bouchet y Ortea (1980) señalaban que el alimento de esta especie en Asturias es la esponja *Dysidea fragilis*. Varias esponjas (tipo *Dysidea*) procedentes del área de recolección de los nudibranquios fueron extraídas paralelamente a ellos. Una de ellas, identificada como *D. fragilis*, podría ser la presa de esta especie ( y también de *H. villafranca* del mismo lugar), ya que el patrón de productos furánicos resultó ser similar (ver apartado 5.4.). Los productos interesantes (rf 0.7 en éter de petróleo y rf 0.5 en éter de petróleo-éter etílico 1-1) se purificaron mediante una columna en una pipeta de 25 ml equilibrada con éter de petróleo (sílice 70-230). Se recogieron fracciones de 10 ml cada una, hasta la número 52 con éter de petróleo, luego 8-2 con éter etílico. Se obtuvieron (de 19 g de peso seco de la esponja y 180 mg de extracto):

fr. 28-35: 1 mg, compuestos furánicos de rf superior.

fr. 37-52: 10 mg, furanos.

fr. 78-85: 25 mg, esteroides y ácidos grasos.

Los productos de interés se prepararon para su estudio mediante NMR. El más abundante de ellos (fr. 37-52, 10 mg) pudo ser identificado como el nakafurano-9 mediante su espectro NMR.

Se demuestra que la esponja puede ser una de las presas del nudibranquio, si bien en vista de que sobre TLC con mezcla y comparación le faltan productos de la esponja al molusco, (que debería tener si fuera su única presa), es posible pensar que tiene como base principal de su dieta otras variedades de *Dysidea* (relacionadas con las de Guella *et al.*, 1985).

De hecho se ha comprobado (Ortea, com. pers.) que tanto *H. cantabrica* como *H. villafranca* se alimentan de *Dysidea fragilis* en Asturias y que los juveniles de ambas especies se desarrollan sobre la esponja. Ambas especies tienen el mismo tipo de armadura labial y un diseño muy similar en las formas juveniles.

En un tubo en forma de Y se realizó un intento de experimento con las esponjas *D. fragilis* y *D. avara* del Mediterráneo. El estado del animal no

permitió las réplicas, pero se observó que el animal comía la esponja *D. fragilis* de Blanes a lo largo de varias horas.

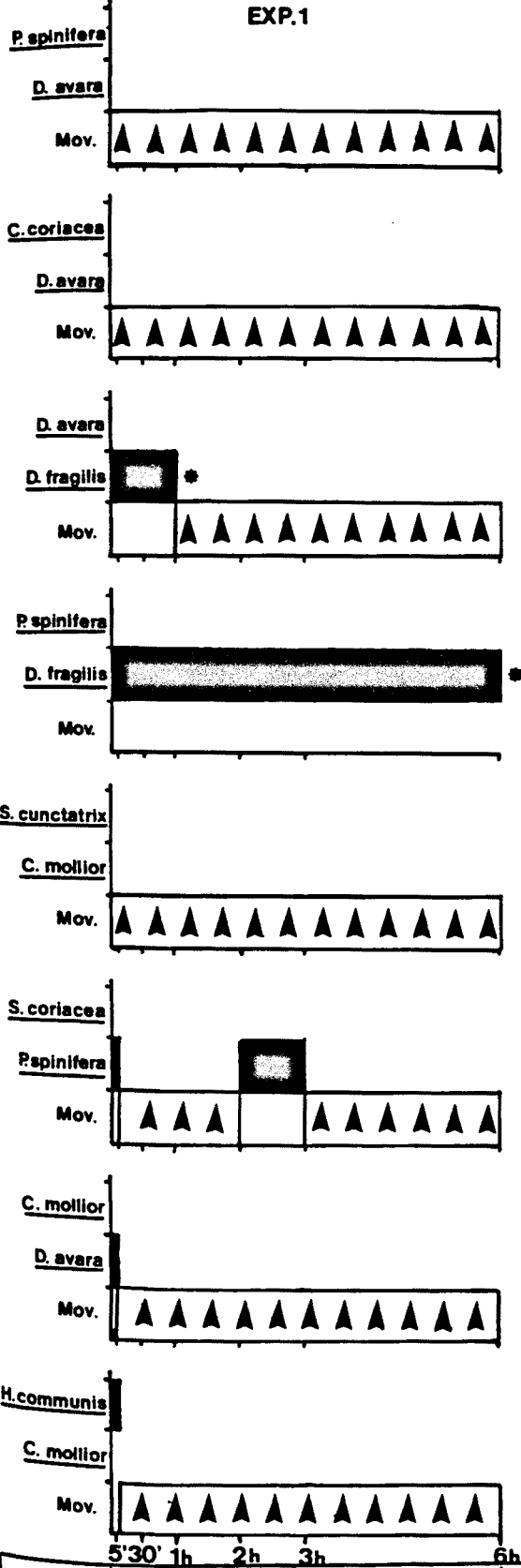
En acuario se logró mantener vivo un ejemplar desde abril de 1991 hasta agosto del mismo año. Seguramente comió *D. fragilis* del Mediterráneo, que pusimos en el mismo acuario, ya que es difícil pensar que hubiera sobrevivido 5 meses sin alimentarse (aunque hay citas de larga duración en ayuno, Ros, 1976). La dificultad para ver al animal comiendo sobre la esponja podría deberse, al igual que se sugiere para otras especies de *Hypselodoris*, a una alimentación preferentemente nocturna.

Se realizaron varios grupos de experimentos (con 8, 8 y 3 ejemplares cada uno) con ejemplares del Cantábrico, en los que se vio que los ejemplares tendían a moverse por el recipiente excepto en el caso de hallar un fragmento de *D. fragilis*. En este caso se les veía comer y permanecer sobre ella durante períodos que oscilan entre 15 minutos y 6 horas (habían estado varias semanas en ayuno). En algunos casos los ejemplares tardaron hasta 2 h 30 min en pararse sobre la esponja y comer, y solamente en 4 casos no se detuvieron teniendo esta esponja a su alcance. En todos los casos restantes (con otras esponjas) la especie *Cacospongia mollior* fue elegida por un ejemplar que se detuvo durante 1 h 45 min sobre ella, en el resto de especies de esponjas apenas estuvieron parados entre 5 minutos y 1 hora en 3 ocasiones. Estos datos se exponen en la página siguiente (Figura 5.4.), siguiendo el modelo de gráfica de Waters (1973). Cada gráfica corresponde a un ejemplar en un experimento individual (se hicieron 3 series de experimentos, como ya se ha comentado).

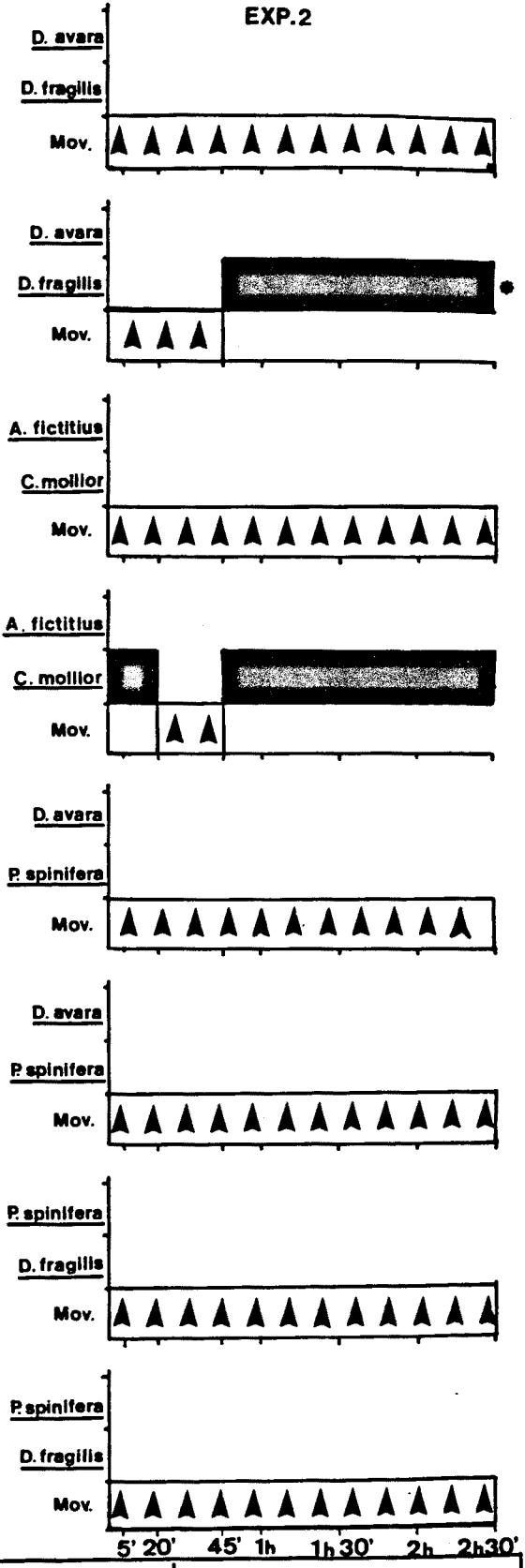
### Función.

Los resultados de los tests de ictiotoxicidad para *Gambusia affinis* y de repelencia para *Carassius auratus* realizados con los compuestos aislados de esta especie, se detallan en la Tabla 5.8. Algunos de estos datos para la longifolina fueron ya descritos por Cimino *et al.* (1982), también para la especie *Chromis chromis*. La agassizina y la iso-dehidro-dendrolasina no fueron probadas.

EXP.1



EXP.2



EXP.3

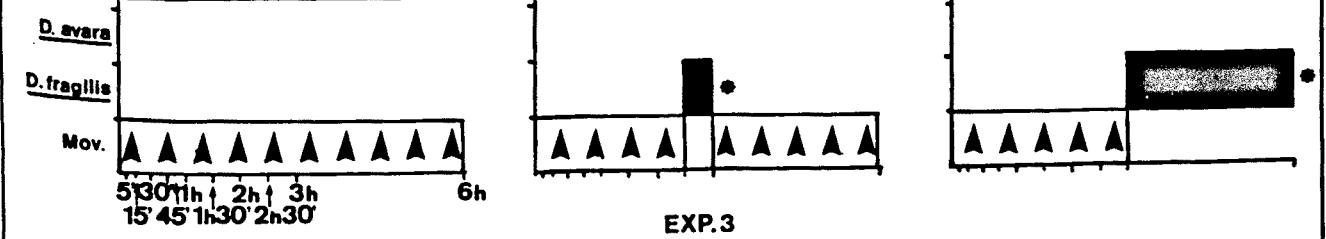


Figura 5.4. (página anterior). Resultados de los experimentos con varias especies de esponjas y el molusco *H. cantabrica* (\*= observación de que el nudibranquio comía esa esponja). Experimento 1, columna izquierda. Experimento 2, columna derecha. Experimento 3, fila inferior. Especies de esponjas utilizadas: *Pleraplysilla spinifera*, *Dysidea avara*, *D. fragilis*, *Clathrina coriacea*, *Anchinoe fictitius*, *Cacospongia mollior*, *Spirastrella cunctatrix*, *Siphonochalina coriacea* e *Hippospongia communis*.

	TOXICIDAD		REPELENCIA		
	10 ppm	1 ppm	300µg/cm <sup>2</sup>	150µg/cm <sup>2</sup>	30µg/cm <sup>2</sup>
longifolina	T	I	A	I	I
tavacfurano	I	I	A	I	I
nakafurano-9	I	I	A	I	I
dendrolasina	I	I	A	I	I
ent-furodysinina	MT	I	A	A	A
iso-nakafurano-9	NP	NP	A	I	I
MT= muy tóxico; T= tóxico; A= activo; I= inactivo; NP= no probado.					

Tabla 5.8. Resultado de los tests con los compuestos de *H. cantabrica*.

### 5.1.3.3. Resumen conclusivo.

La naturaleza química de los compuestos presentes en *H. cantabrica*, y su localización en la glándula digestiva y MDFs, apoyan una estrategia defensiva ligada a la depredación sobre esponjas (de tipo *Dysidea fragilis*). Estas sustancias son furanos ictiorrepelentes. El nudibranquio es capaz de acumular estas sustancias en las MDFs, las cuales por su situación cercana a las branquias y a los rinóforos deberían proteger estos órganos vitales de eventuales ataques de depredadores.

*H. cantabrica* presenta longifolina, tavacfurano, nakafurano-9, dendrolasina, agassizina, ent-furodysinina, iso-nakafurano-9 e iso-dehidrodendrolasina, siendo estos dos últimos citados por primera vez como productos naturales. Las diferencias en la composición son cualitativas y cuantitativas entre ejemplares de poblaciones distintas.

## 5.2. *Hypselodoris fontandraui* (Pruvot-Fol, 1951).

### 5.2.1. Introducción.

#### 5.2.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.

Esta especie ha sido citada como *Glossodoris fontandraui*, y también como *G. messinensis*, y *Chromodoris messinensis*. Siguiendo con los criterios de Ortea y García (*en prensa*), por los cuales *H. messinensis* no es sinónimo de *H. fontandraui* sino de *H. villafranca*, llamaremos a esta especie *H. fontandraui*.

*Glossodoris fontandraui*.- Pruvot-Fol (1951, 1954); Vicente (1964); Ros (1975, 1978a y b, 1981, 1985); Ortea (1977); Ros y Altimira (1977); Altimira *et al.* (1981); Ros y Gili (1985); Huelín y Ros (1984).

*Chromodoris messinensis*.- Haefelfinger (1969a y b); Ros (1975, 1978a y b, 1981, 1985).

*Glossodoris messinensis*.- Ros (1975, 1978a y b, 1981, 1985); Ortea (1977); Ros y Altimira (1977); Altimira *et al.* (1981); Huelín y Ros (1984).

*Hypselodoris messinensis*.- Templado (1982, 1983 y 1984); García (1983 y 1984); Luque (1983, 1986); Cattaneo *et al.* (1990); García *et al.* (1991).

#### 5.2.1.2. Breve descripción y características de la especie.

Esta especie, de color azul, presenta el borde del manto amarillo, con una línea media blanca o amarilla, de anchura irregular, que termina en forma de ancla por delante de los rinóforos. En la base de los rinóforos presenta una mancha amarilla o blanquecina muy característica. Generalmente presenta 6 hojas branquiales.