

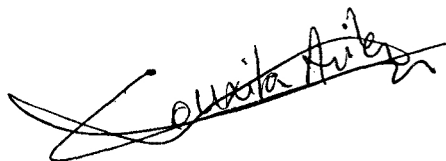
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL
FACULTAD DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

**SUSTANCIAS NATURALES DE MOLUSCOS OPISTHOBANQUIOS:
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.

5.2.1.3. Referencias comentadas.

Morfológicas o descriptivas.

En 1984, García señaló que esta especie no presentaba lo que llamaba "acúmulos glandulares" (MDFs). En 1991, García *et al.* remarcaban el mismo hecho, diciendo que esta especie representaría el estadio final en la pérdida evolutiva de las MDFs en las especies europeas de este género.

Ortea y García (*en prensa*) describen en detalle las características de esta especie y su puesta, así como las variaciones cromáticas.

Ecológicas.

Ros (1978) citó a esta especie en biocenosis de sustratos duros, concretamente en el coralígeno, y también en cuevas oscuras. Como régimen alimentario le adjudicó la categoría de zoófago: micrófago (ramoneador, suctor): de esponjas. Y como esponjas presa citaba las especies "*Cacospongia mollior* y *Spongia virgultosa* (?)".

5.2.2. Material estudiado.

Los datos se resumen en la tabla 5.9.

LOCALIDAD	FECHA	(1)	(2)	(3)
Taormina	6-4-90	6	-15 m	quím-rád
(1) Número de individuos.				
(2) Profundidad.				
(3) Utilización del material (rád= rádula, quím= química)				

Tabla 5.9. Datos de los ejemplares de *H. fontandraui* capturados.



18

Los ejemplares se capturaron en una pared esciáfila sobre la esponja *Dysidea avara*.

5.2.3. Resultados y discusión.

5.2.3.1. Datos morfológicos de nuestros ejemplares.

Esquemas anatómicos.

En la Figura 5.6. se observa la morfología de dos de los ejemplares estudiados. El primero de ellos medía 18 mm, era de color azul oscuro con el borde del manto naranja. Presentaba una línea central blanca con puntos azules a ambos lados de la misma. El segundo animal era del mismo azul intenso, medía 12 mm, y presentaba la línea alrededor del borde del manto de una coloración algo más amarilla que el resto de ejemplares. A los lados de la línea blanca central había algunas manchas de color blanco. En los flancos presentaba longitudinalmente una línea blanca alrededor de todo el cuerpo del animal, hasta unirse al final de la cola. El número de hojas branquiales oscilaba entre 5 y 7.

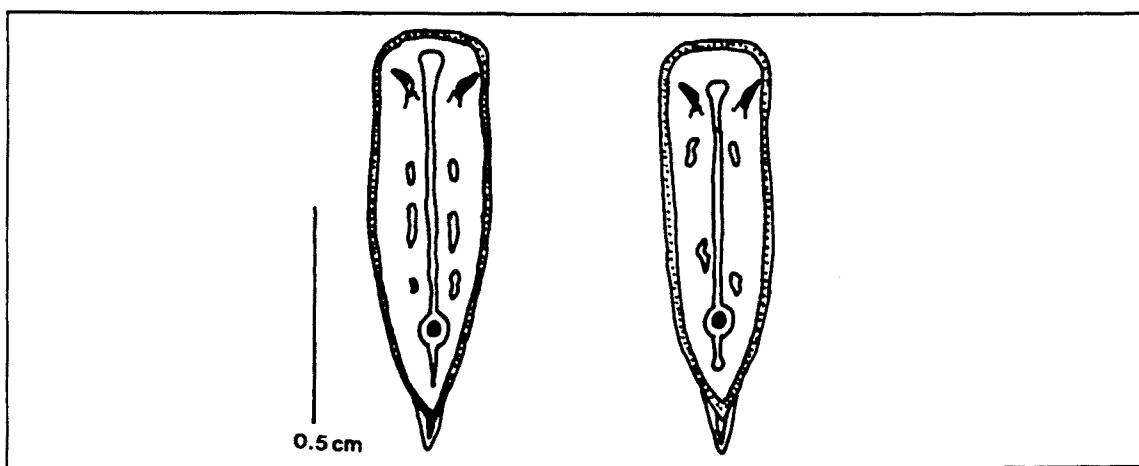


Fig. 5.5. Esquemas de dos ejemplares. Las líneas son blancas excepto las punteadas, que son naranjas en el de la derecha y amarillo-naranja en el de la izquierda.

Los otros 4 ejemplares, no dibujados, midieron entre 8 y 12 mm. Algunos presentaban líneas finas azul celeste al lado de la línea del borde del manto, tal y como se ve en la fotografía 18.

En esta especie no se observaron MDFs.

Rádula y armadura labial.

Las rádulas y armaduras labiales de cuatro ejemplares fueron extraídas para su estudio al MEB.

En los ejemplares de Taormina las fórmulas radulares eran 40x(34-0-34), 41x(40-0-40), 42x(43-0-43) y 42x(46-0-46). La armadura presenta uncinos simples de base arrugada (fotografías 19 y 20), y la fórmula radular, según Ortea y García (*en prensa*), es 57x(65-0-65)/62x(85-0-85) con 5 ó 6 dentículos en la segunda cúspide de los dientes. Las diferencias con los valores de Ortea y García podrían deberse al pequeño tamaño de los ejemplares de Taormina (de 8 a 12 mm).

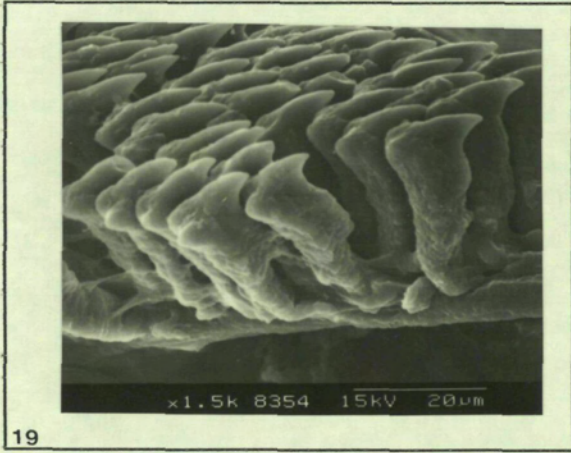
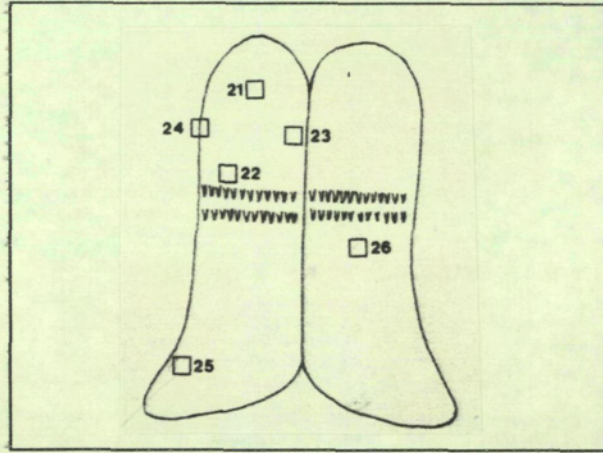
Algunas de las fotografías obtenidas en el estudio de las rádulas se exponen en la página siguiente (21 a 26). Se observaron entre 3 y 5 dentículos por diente, excepto en los laterales donde se observaron hasta 6. Se puede apreciar que los dientes son más alargados que en otras especies del género (ver las fotografías en los apartados correspondientes), y los dentículos son marcadamente digitiformes (fotografía 22).

5.2.3.2. Análisis químico.

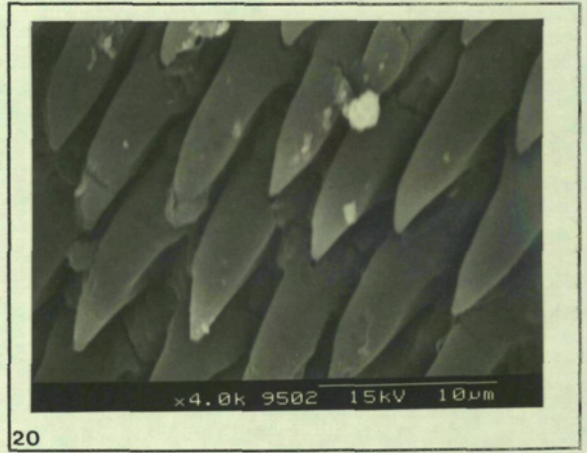
Productos obtenidos: Estructura.

Los ejemplares fueron analizados a oscuras. Los resultados que se obtuvieron fueron los que se indican en la tabla 5.10.

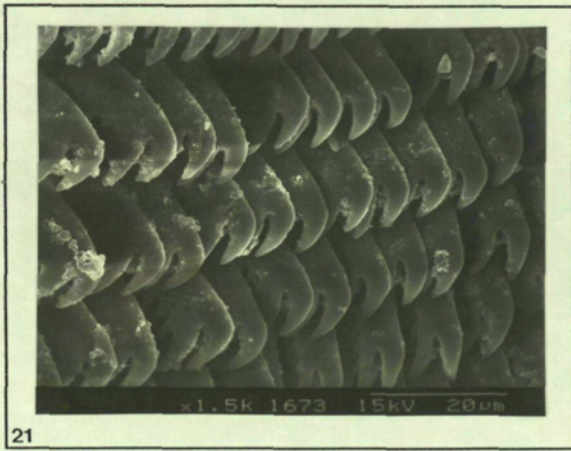
Hypselodoris fontandraui



19



20

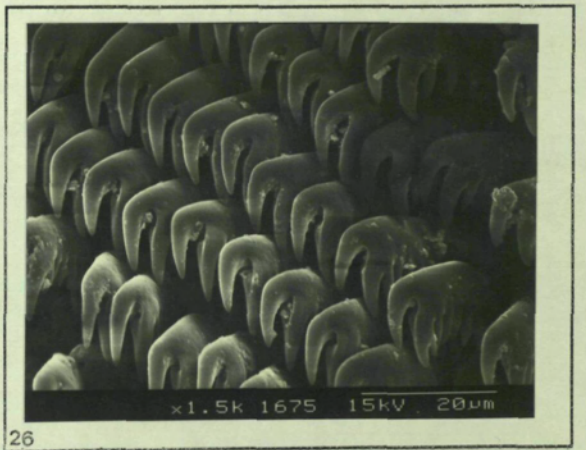
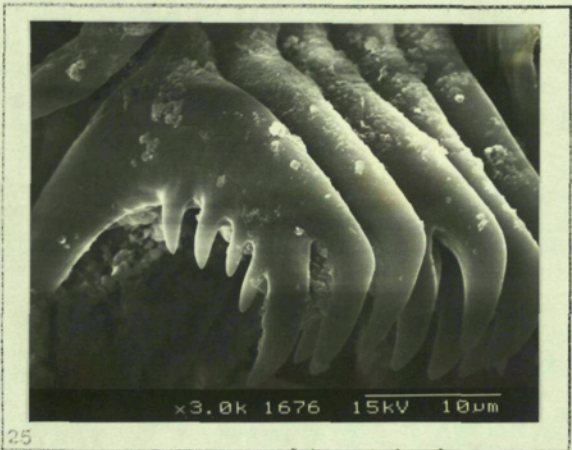
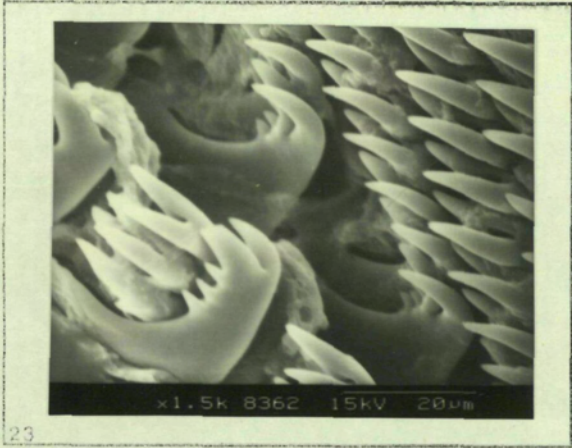


21



22

Hypselodoris fontandraui



	(1) peso seco extracto acetónico		
mucus	4	5	8.6
borde del manto	2	<0.1	0.5
resto del manto, pie, rinóforos y branquias	2	3.0	0.1
glándula digestiva	2	<0.1	2.4
resto de vísceras	2	1.2	<0.1
enteros	2	6.9	4.8
(1) Número de ejemplares.			

Tabla 5.10. Análisis químico de los ejemplares (datos en mg).

Mediante TLC se observaron 4 productos furánicos, siendo esto más claro en el extracto obtenido de 2 animales enteros. Los productos furánicos fueron además especialmente abundantes en el extracto de la secreción mucosa. El extracto del borde del manto contenía poca cantidad de furanos, al igual que la glándula digestiva, mientras que el resto de extractos no presentaban furanos. No se identificaron las sustancias mediante NMR porque era una cantidad demasiado pequeña. Estos furanos eran: rf 0.5 en éter de petróleo, color azul; rf 0.6, color azul; rf 0.7, color rosa (poco abundante); rf 0.75, color rosa. Se hizo también una placa en heptano-benceno 1-1, impregnada con AgNO_3 , que dió análogos resultados.

Los ejemplares estudiados segregaron una sustancia mucosa transparente al ser molestados, que fue analizada químicamente, y cuyos resultados han sido ya comentados.

Origen de los productos.

La placa cromatográfica realizada, en éter de petróleo, del extracto acetónico de la esponja capturada junto a los opistobranquios (*D. avara*), presentó idéntico patrón metabólico de furanos, por lo que se puede considerar que es la presa de este molusco. Los productos hallados no parecen ser los mismos que describieron para *D. avara* Minale *et al.* (1974) y De Rosa

et al. (1976). Esto podría deberse a la variabilidad existente en estas esponjas (*Dysidea*), como se comenta en el apartado 7.1.

Los datos cuantitativos de la esponja son los siguientes: el peso seco del fragmento de esponja extraído fue de 165.6 mg, y el extracto acetónico obtenido de 63.9 mg.

Función.

Al no haber suficiente cantidad de productos, no se pudieron realizar los tests pertinentes, aunque es de suponer que, por analogía con las demás especies, algunos de los furanos jugarán un papel importante en la defensa del animal.

5.2.3.3. Resumen conclusivo.

Esta especie posee sustancias de naturaleza furánica presentes en el borde del manto y especialmente abundantes en el muco, las cuales probablemente jugarán un papel importante en la defensa del animal, a pesar de que no presenta MDFs. Estos metabolitos, todavía no identificados, deben tener un origen dietético, de su presa *Dysidea avara*.

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

5.3.1. Introducción.

5.3.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias más frecuentes.

En la mayoría de casos esta especie ha sido citada con nombres específicos distintos al aquí empleado. Siguiendo el origen histórico del nombre de esta especie (ver Ortea y Templado (1984), y Ortea y García (*en prensa*)), coincidimos en que el nombre correcto de nuestros ejemplares debería ser *Hypselodoris webbi* (D'Orbigny, 1839).

Polycera webbi.- D'Orbigny (1839).

Doris elegans.- Cantraine (1841).

Doris valenciennesi.- Cantraine (1841).

Doris scacchiana.- Delle Chiaje (1841).

Doris villafranca.- Delle Chiaje (1841).

Chromodoris elegans.- Bergh (1878); Ihering (1880); Rho (1883); Vayssière (1901, 1913).

Chromodoris valenciennesi.- Odhner (1932).

Glossodoris valenciennesi.- Pruvot-Fol (1951, 1953); Haefelfinger (1960, 1969a y b); Gantés (1962); Vicente (1967); Schmekel (1968b); Haefelfinger y Kress (1970); Barash y Danin (1971); Ros (1975, 1978a y b, 1981, 1985); Ros y Altimira (1977); Altimira y Ros (1979); Barletta (1980); Altimira *et al.* (1981); Ballesteros (1981); Cimino *et al.* (1982).

Hypselodoris edenticulata.- Anderson y Lane (1963); Marcus y Marcus (1967).

Hypselodoris valenciennesi.- Pereira (1980); Templado (1982, 1983); Mienis y Gat (1982); Perrone (1984); Ramos (1985); Ballesteros (1980); Ballesteros *et al.* (1986a y b); Cattaneo *et al.* (1990).

Hypselodoris elegans.- Schmekel y Portmann (1982); Ros y Gili (1985); Mienis y Gat (1986); Marín y Ros (1987); Perrone (1991).

Hypselodoris webbi.- Bouchet y Ortea (1980); García (1982, 1983); Thompson y Turner (1983); Luque (1983, 1986); Salas y Luque (1986); Ortea y Templado (1984); Templado (1984); Ballesteros *et al.* (1986b); Cimino y Sodano (1989); Perrone (1990, 1991); García *et al.* (1990, 1991); Avila *et al.* (1991b); Avila y Durfort (1992).

5.3.1.2. Breve descripción y características de la especie.

Descrita en los trabajos de Bouchet y Ortea (1980), y Ortea y Templado (1984), así como en Schmekel y Portmann (1982), esta especie presenta un gran tamaño, hasta 13 cm de longitud, con tres líneas amarillas dorsales principales que acaban en el orificio branquial (sin anillo amarillo alrededor). El orificio rinofórico está rodeado por un círculo amarillo, y es más elevado en su parte posterior. En los ejemplares de mayor tamaño las líneas amarillas se fragmentan en numerosas manchas, y el borde del manto también es amarillo. Las branquias tienen el raquis amarillo. La coloración general puede ser azul oscuro o bien decolorarse hasta gris o blanco presentando una gran variabilidad.

5.3.1.3. Referencias comentadas.

Morfológicas o descriptivas.

Ortea y Templado (1984) describieron la variación cromática y radular en los juveniles.

García (1984) estudió 2 ejemplares en los que trató de detectar la presencia de "acúmulos glandulares" (MDFs). En uno de sus dos ejemplares no los halló. Sin embargo, en su segundo ejemplar describió entre 10 y 15 "acúmulos glandulares esféricos" en el extremo posterior del manto, y otros pequeños por los lados y en la zona de los rinóforos.

García *et al.* (1991) estudiaron 8 especímenes de los cuales obtuvieron fotos de cortes semifinos y realizaron un esquema de la localización de las MDFs en el cuerpo del animal. Sus resultados serán comentados más adelante.

Las primeras fases del desarrollo embrionario hasta la formación de la larva velígera, fueron descritas por Rho (1884).

Ecológicas.

En cuanto al habitat, Bouchet y Ortea (1980) encuentran esta especie en el intermareal e infralitoral de las Islas Canarias hasta -10 metros durante todo el año. Ortea y Templado (1984) indican su hallazgo en intermareales, rizomas de *Posidonia* a -5m, y paredes rocosas esciáfilas a -9 y -15m. Los ejemplares recolectados por Schmekel y Portmann (1982) fueron hallados entre 0 y -50 m de profundidad. Ros (1978a) lo cita en comunidades de praderas de fanerógamas marinas (hojas y rizomas con epibiontes), así como en biocenosis de substratos duros de todas las zonas (excepto en cuevas oscuras), y por último, en sustratos duros de ambientes portuarios y contaminados en general.

Curiosamente, y a pesar de ser una especie de amplia distribución y muy citada en los listados faunísticos, no había en la bibliografía cita alguna acerca de su alimentación hasta Avila *et al.* (1990b), (y posteriormente Avila *et al.*, 1991b; Cattaneo *et al.*, 1990). Ros (1978a) lo incluyó en el grupo de los zoófagos: micrófagos (ramoneadores, suctores): de esponjas, aunque no citaba ninguna posible presa. Asimismo, señalaba también la posibilidad de que se alimentase en acuario de sus propios excrementos, y añadía: "y, quizá, sus secreciones mucosas". El mismo autor describe que tras un largo período de abstinencia se reduce sensiblemente de tamaño y presenta rasgos de degeneración.

En cuanto a otros aspectos ecológicos, Ros (1976b) citó su coloración aposemática y su posible pertenencia a círculos miméticos (al menos la "forma azul" y los juveniles) (grupo I, Ros *op. cit.*). La "forma amarilla adulta"

se incluiría, siempre según el mencionado autor, en el grupo IV. Dicho trabajo cita como especies que viven agrupadas con esta: *H. fontandraui*, *H. tricolor* y *H. villafranca*. Por todo ello, describió como un sistema de defensa en esta especie la exhibición de grupo.

Ros (1976b) constató que esta especie no era secretora de ácido. No se han encontrado otras referencias sobre la secreción de muco en *H. webbi* en la bibliografía consultada. El mismo autor (Ros, 1977) realizó algunos experimentos con peces que serán comentados en el apartado correspondiente.

Químicas.

En 1963, Anderson y Lane publicaron un trabajo sobre la naturaleza del pigmento de esta especie, dando algunas de sus características.

Cimino *et al.* (1982) analizaron químicamente 3 ejemplares de esta especie (bajo el nombre de *G. valenciennesi*). Obtuvieron algo más de 40 mg de longifolina, tanto en los extractos de la parte externa como de las vísceras. Comprobaron asimismo que este compuesto era activo (a 300 µg/cm² de comida para peces) para *Carassius auratus* y para *Chromis chromis* en el test de repelencia y tóxico a 10 ppm para *Gambusia affinis*. Anteriormente Cimino *et al.* (1975b) habían aislado dicho producto de la esponja *Pleraplysilla spinifera* (siendo en ella un producto minoritario), y, por tanto, supusieron un origen dietético para el mismo ("eating a different (probably encrusting) sponge species").

García *et al.* (1990), analizando el contenido de las MDFs de 3 animales hallaron 8 mg de longifolina y un segundo compuesto que no pudo ser identificado, y obtuvieron también otros 2 mg de longifolina del resto del manto.

5.3.2. Material estudiado.

Los datos de los animales capturados se incluyen en la Tabla 5.11.

LOCALIDAD	FECHA	(1)	(2)	(3)
Castellammare di St.	12-12-88	2	-6 m	q+r
Pta. Pedrera (Formentera)	27-10-89	1	-10 m	q+r
Sibari (Taranto)	Julio 89	1	-3 m	q+r
Blanes	27-3-90	1	-15 m	q+r
	Agosto 91	2	-10 m	q+r
Palamós	15-10-90	8	-20 m	q+r
	1-5-91	1	-25 m	q+r
	Abril 1992	1	-20 m	m+e
Tossa de Mar	27-2-91	1	-16 m	-
Cadaqués	25-7-91	1	-6 m	q+e
TOTAL		19		
(1)= Número de ejemplares. (2)= Profundidad. (3)= Utilización (q= química; r= rádula; m= microscopía; e= experimentos).				

Tabla 5.11. Datos de los ejemplares capturados.

En el acuario, el ejemplar de Cadaqués realizó una puesta a los 5 días de su captura.

El ejemplar de Formentera se encontró sobre *Posidonia oceanica*, y se recogió junto a él una puesta. El ejemplar de Sibari se hallaba en una pared rocosa. Los especímenes de Blanes y Tossa se hallaron en paredes mayoritariamente esciáfilas, mientras que el de Cadaqués se hallaba en una pared rocosa fotófila.

5.3.3. Resultados y discusión.

5.3.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

Esquemas anatómicos.

El tamaño de los ejemplares viene indicado en la tabla 5.12. del apartado siguiente.

A continuación se incluyen dos esquemas de la morfología externa e interna, con el patrón de dibujos y manchas dorsales (Figura 5.6.).

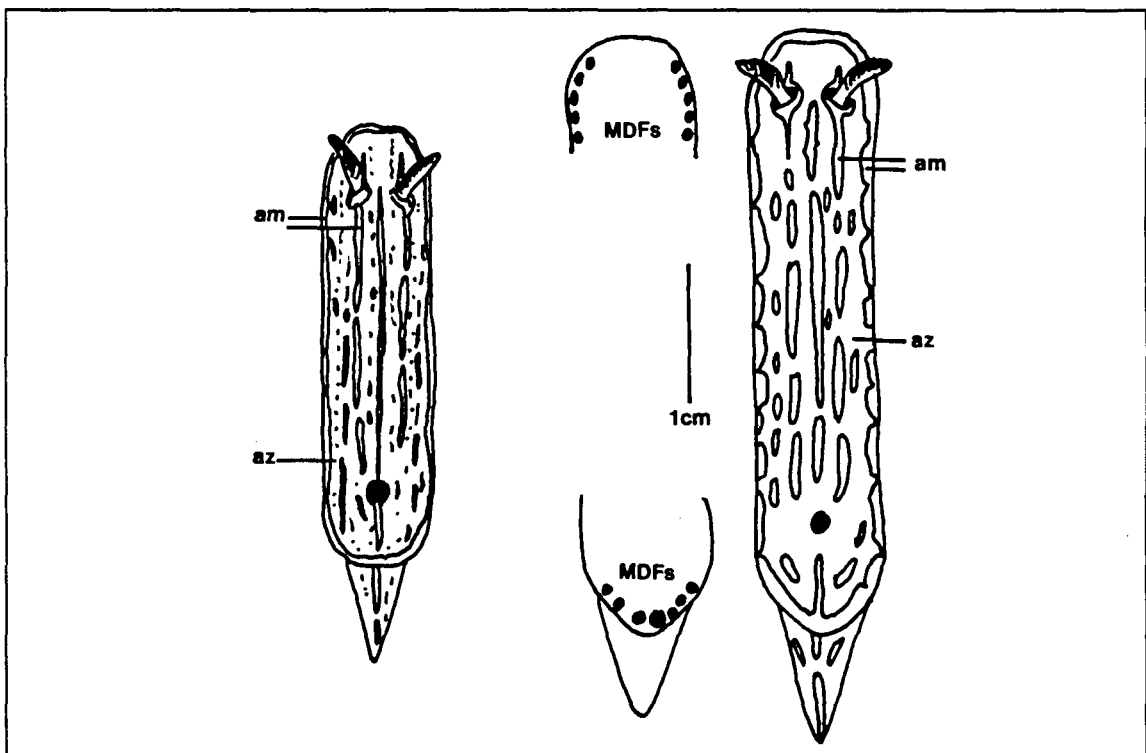


Figura 5.6. Esquemas anatómicos de *H. webbi*. (am= amarillo; az= azul).

Un animal capturado en Castellammare di Stabia presentaba el pie blanquecino, siendo dorsalmente amarillento, con muchas manchas amarillas punteadas pequeñas y los rinóforos algo más oscuros. Los ejemplares de

Palamós eran maduros sexualmente, observándose la glándula hermafrodita bien desarrollada.

Formaciones dérmicas del manto.

El número de MDFs de los ejemplares capturados se expone en la Tabla 5.12.

PROCEDENCIA	TAMAÑO (cm)	MDFs anteriores	MDFs posteriores	COLOR
Castellammare	7.5	>25+25	10	amarillo
Formentera	4	>50	8	amarillo
Sibari	10	n.c.	n.c.	amarillo
Blanes	4.5	>25+25	6	azul/amarillo
Palamos	4	>10+10	8	azul/amarillo
Tossa	7	n.c.	n.c.	amarillo
Cabo Verde*	5.2	----	5	azul

n.c.= no contadas.
 *= contado tras una larga fijación.

Tabla 5.12. Número de MDFs, tamaño y coloración en los ejemplares capturados.

En la Tabla anterior se menciona además la coloración de los ejemplares, observándose que existe variación cromática entre ejemplares capturados en el mismo lugar.

Odhner (1932) fue probablemente el primero en mencionar las MDFs en esta especie. Según éste autor, en la parte trasera del manto sobresalían tres lóbulos debido a la presencia de papilas glandulares de las cuales la mayor estaba situada medianamente. Citó también este autor la posible variación de los lóbulos según el grado de formación de las glándulas, que en algunos de sus ejemplares se hallaban también alrededor del manto. D'Orbigny (1839) describía 2 lóbulos en la parte trasera del manto. Según García *et al.* (1991), en ejemplares de 60-65 mm había entre 2 y 12 MDFs

anteriores de unas 450 μm , y entre 7 y 24 posteriores de 1300 μm . En ejemplares mayores (110-130 mm) hallaron entre 15 y 18 MDFs anteriores de unas 1000 μm y de 14 a 20 posteriores de unas 2000 μm . Hicieron un estudio histológico e histoquímico que comentaremos en el apartado correspondiente.

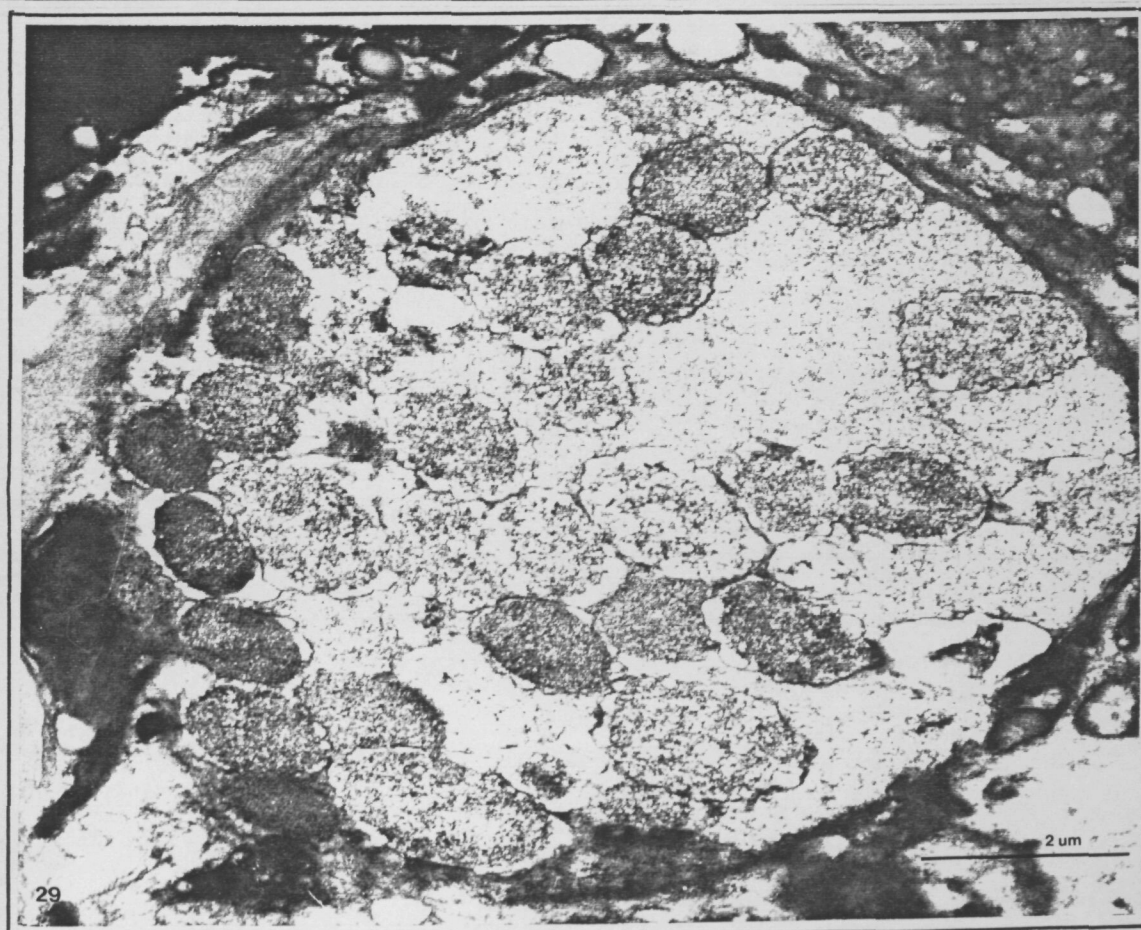
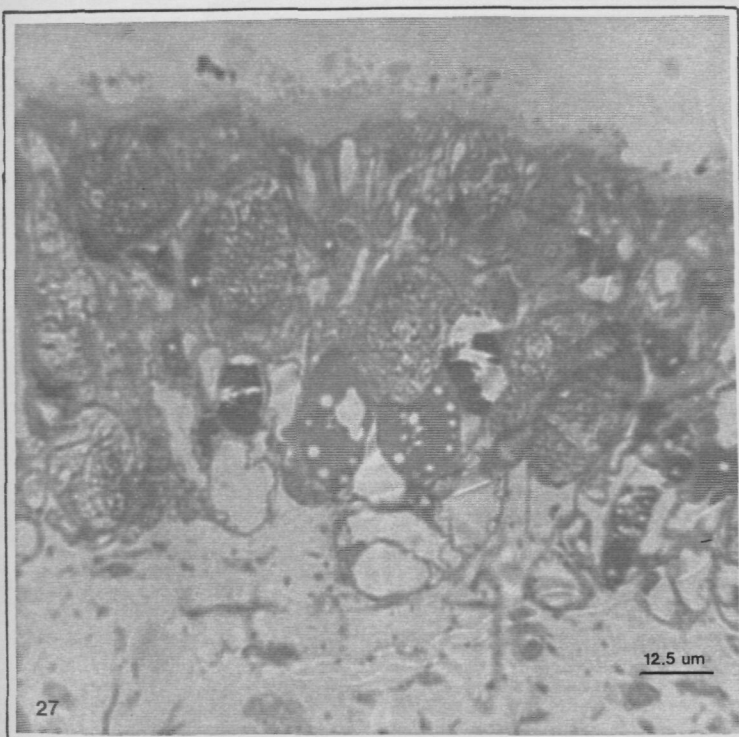
La no coincidencia en el número de MDFs expuesto en la Tabla 5.12 respecto a los valores mencionados por García *et al.* (1991) debe ser seguramente causado por un diferente criterio al contarlas, ya que, al situarse de forma continua en el borde del manto, es difícil delimitar dónde empiezan las MDFs laterales y acaban las posteriores. Sin embargo, al sumar los valores totales estos sí coinciden.

El primer animal de Castellammare presentaba numerosas MDFs desde los rinóforos hasta la zona branquial, de alrededor de 1 mm de diámetro. En la parte branquial y posterior del manto eran incluso 2 ó 3 veces más grandes. En la parte frontal del manto, delante de los rinóforos, no aparecían MDFs. Se contaron 10 MDFs posteriores, como se ha indicado en la tabla anterior.

En el esquema de las Figura 5.6. se detalla la situación en el animal de las MDFs. En las zonas laterales centrales de algunos ejemplares se observó que existía un pequeño espacio sin MDFs. En el lado izquierdo se contabilizaron más de 25 MDFs pequeñas.

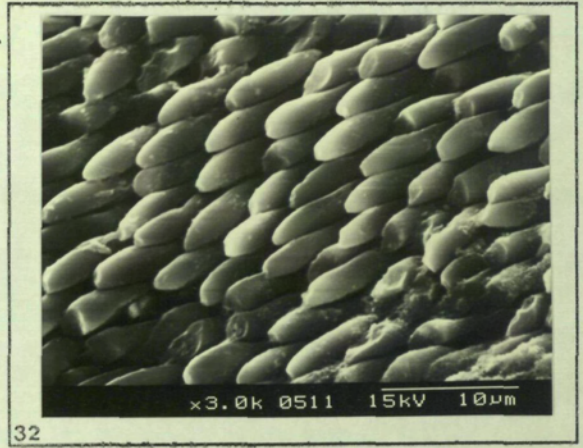
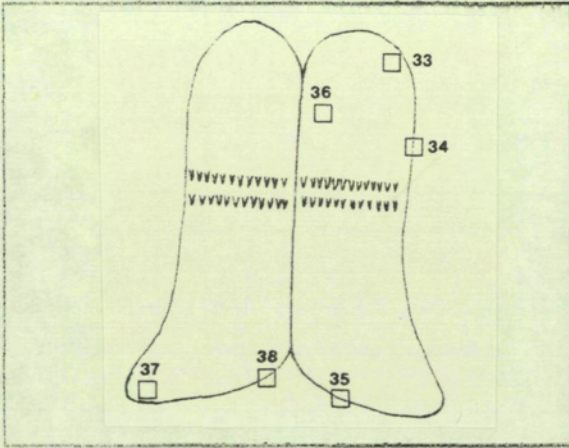
En el ejemplar de Formentera se observaron 5 MDFs grandes posteriormente, 3 de tamaño mediano y más de 50 a ambos lados muy pequeñas de manera continua.

Se ha realizado un estudio microscópico del ejemplar capturado en Cadaqués. Dado que las MDFs de esta especie, casi idénticas a las de *H. cantabrica*, fueron estudiadas por García *et al.* (1990, 1991), se exponen algunos comentarios y fotografías del epitelio, que no había sido descrito hasta ahora. Este epitelio (similar al que se verá para *H. orsini*) presenta células ciliadas y gránulos de secreción mucosa, como se puede observar en las fotografías (27-30). En el subepitelio se observan agregados de pocas células que contienen una macrovesícula. Esta macrovesícula está formada

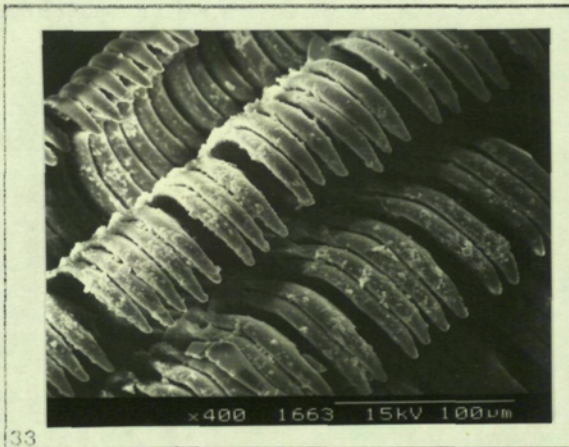




Hypselodoris webbi



32

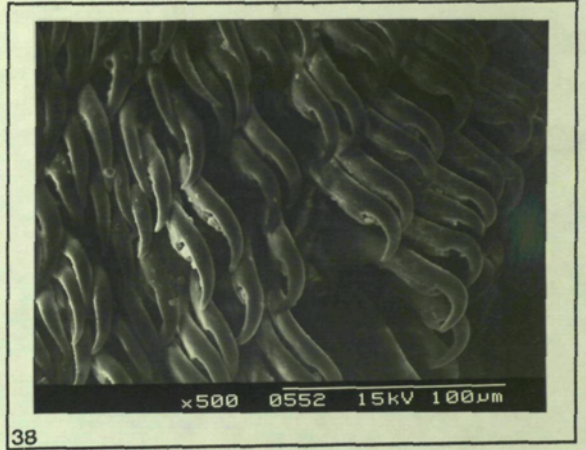
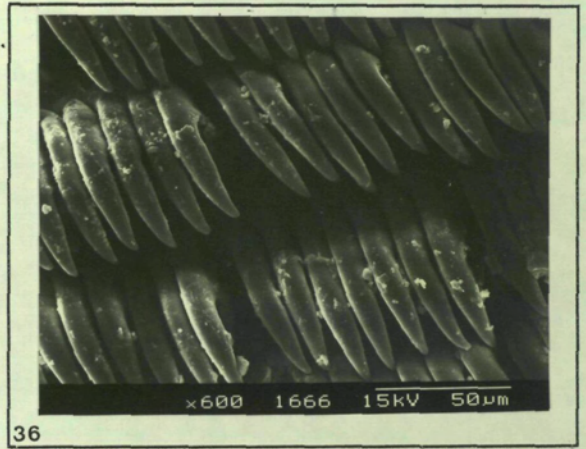
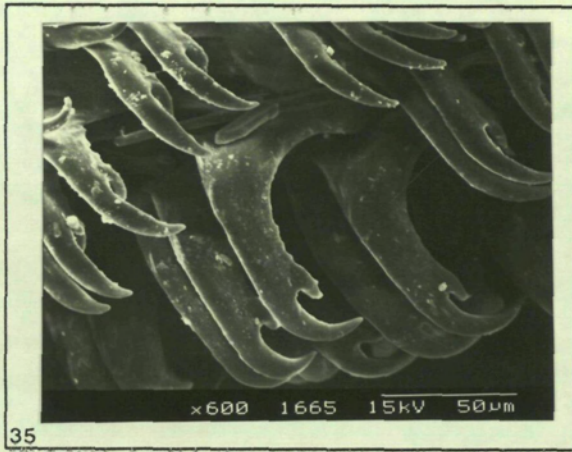


33

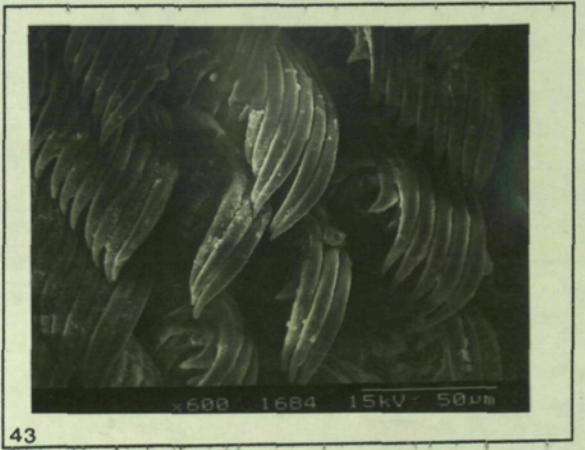
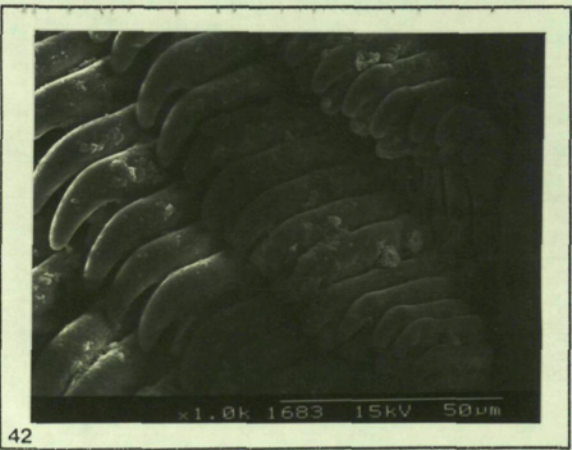
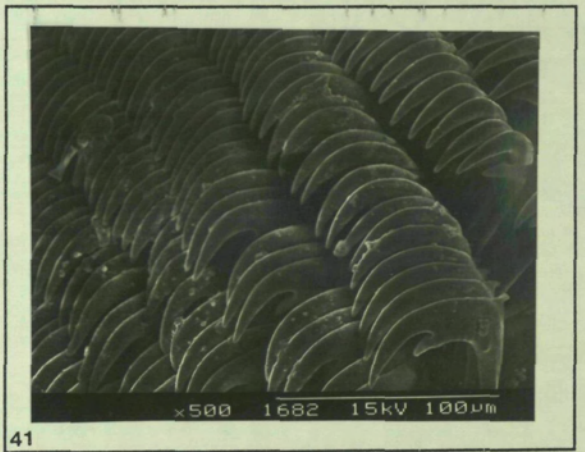
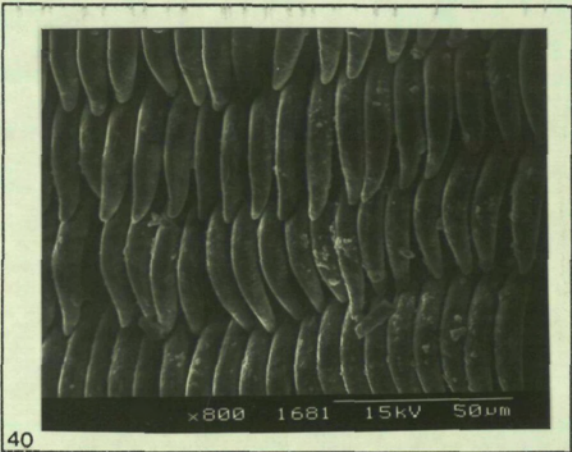
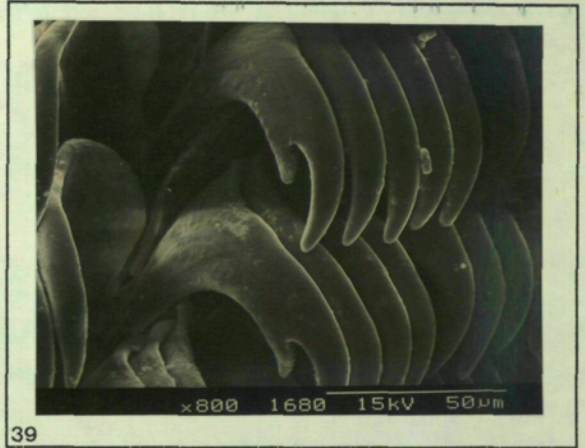
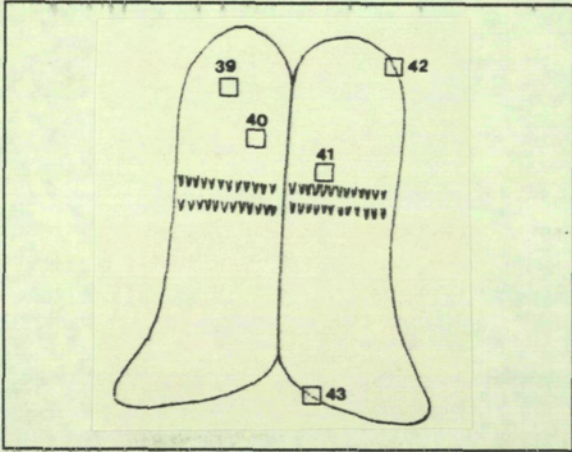


34

Hypselodoris webbi



Hypselodoris webbi



por dos fracciones: la más desarrollada está compuesta por un material altamente electrodenso, y en su periferia se observan vesículas no recubiertas de membrana de baja electrodensidad (fotografía 31). Este tipo de estructuras podrían ser productos de degradación y/o acumulación de tipo no lisosomal.

Radula y armadura labial.

Se detallan a continuación algunos datos sobre las rádulas de los distintos ejemplares. En la Tabla 5.13. se exponen las rádulas estudiadas y sus fórmulas radulares.

Número de filas	Número de dientes	Localidad	Referencia
66	166-0-166	Castellammare	esta
98	192-0-192	Sibari	esta
68	164-0-164	Cabo Verde	esta
86	140-0-140	Cabo Verde	esta
68	182-0-182	Formentera	esta
72	180-0-180	Canarias	Bouchet
		y Ortea (1980)	
75	163-0-163	Mediterráneo	Ortea y
		García	(<i>en prensa</i>)
72	160-0-160	Canarias	Ortea y
		García	(<i>en prensa</i>)
70	154-0-154	Cabo Verde	Ortea y
		García	(<i>en prensa</i>)

Tabla 5.13. Fórmulas radulares de algunos ejemplares de *H. webbi*.

El tamaño de algunos de estos ejemplares ha sido expuesto en la Tabla 5.12. En cuanto a la morfología de los dientes, se han fotografiado los detalles más característicos, y se exponen en las páginas siguientes (fotografías 32 a 43). Se pueden contar hasta 5 denticulos en la segunda cúspide de los dientes, si bien estos denticulos son mucho menos marcados que en otras especies del género (ver el resto de especies, y por ejemplo, *H. fontandraui*). Los montajes fotográficos corresponden a ejemplares del Mediterráneo (32 a 38) y de Cabo Verde (39 a 43). Es destacable el hecho de que en estos últimos se observan únicamente denticulaciones incipientes.

Se observa que, coincidiendo con Ortea y García (*en prensa*), la armadura labial presenta uncinos simples, cortos y gruesos (ver fotografía 32).

Desarrollo larvario.

La puesta obtenida en acuario era de color naranja con el borde externo ondulado y de tamaño grande (3.56 g de peso húmedo). Si bien Bouchet y Ortea (1980) dan valores de unas 195 μm para el tamaño medio de los huevos, en este caso estos eran más pequeños, midiendo a los tres días 140 μm , a los 15 días 179.2 μm , y a los 20 días, ya en regresión, 173.3 μm . No aparecieron larvas, a pesar de que la puesta fue cultivada con algas y con un pequeño fragmento de *Dysidea fragilis*. Con el paso de los días tan solo se observaron cápsulas vacías que medían 211 μm de media.

Al quinceavo día se congelaron 360 mg de la puesta para su estudio químico.

5.3.3.2. Análisis químico.

Productos obtenidos: Estructura.

A partir de los datos existentes (ver referencias comentadas), se pretendía averiguar básicamente dos cosas: la localización de la longifolina en el animal y su origen.

Secreciones y pH. La extracción del mucus se realizó provocando la expulsión (ver secuencia de fotos 44 a 47) molestando al animal con una varilla de cristal y se recogió la secreción con una pipeta pasteur. El animal, (capturado en Castellammare di Stabia), al poner Cl_2Mg expulsó un muco blanquecino-hialino por la parte posterior del pie. Al aumentar los efectos narcóticos el animal se iba oscureciendo dorsalmente. El análisis químico de la secreción mucosa se realizó mediante extracción normal como ya se ha



descrito, y los resultados se exponen más abajo. En los 8 ejemplares de Palamós se obtuvo la secreción mucosa también cuando estaban vivos.

El pH de la secreción externa fue medido en el animal de Cadaqués, y resultó ser neutro, coincidiendo con Ros (1976b).

Ejemplares de Castellammare di Stabia. Realizando la extracción tal y como ya se ha indicado (aunque trabajando preferentemente a oscuras para evitar la alteración de los productos), se obtuvieron los resultados (media de 2 ejemplares) que se exponen en la Tabla 5.14.

secciones (n=2)	peso seco	extracto acetónico	furanosesquiterpenos
MDFs	63.5	110	32.5 longifolina 1 mg furano superior 1 mg furano inferior
resto del manto	564.0	184.0	
glándula digestiva	446.5	92.5	20.0 longifolina
resto vísceras	265.0	61.0	
mucus (un animal)	-	25*	longifolina
(*= extracto etéreo; todos los valores son mg).			

Tabla 5.14. Análisis químico de los ejemplares de Castellammare.

Los datos numéricos se obtuvieron tras extraer 10 veces con 1 ml de acetona las muestras, filtrando y evaporando como ya se ha descrito (ver apartado 4.3.2.). Los pesos de los residuos secos se obtuvieron tras la extracción y dejándolos al vacío con KOH. El extracto se recogió con 1 ml de éter etílico y se realizó una placa calibrada.

El extracto de la secreción mucosa era casi todo longifolina (aproximadamente el 95%), pero también aparecían en la placa 2 pequeñas manchas (rf superior) que indicaban la presencia de 2 furanos, uno de color rosa (rf superior), y el otro violeta-lila (rf inferior). Se realizaron los correspondientes análisis NMR del producto de la glándula digestiva (purificado), de los 25 mg de extracto etéreo de la secreción mucosa, y de los 40 mg de extracto acetónico de las MDFs, todos ellos correspondientes al

primer ejemplar. En la secreción mucosa y las MDFs la molécula fue identificada como longifolina. El espectro NMR demostró que la secreción mucosa presentaba longifolina prácticamente pura. Se puede observar en la Figura 5.7. el espectro NMR de la longifolina de la secreción mucosa.

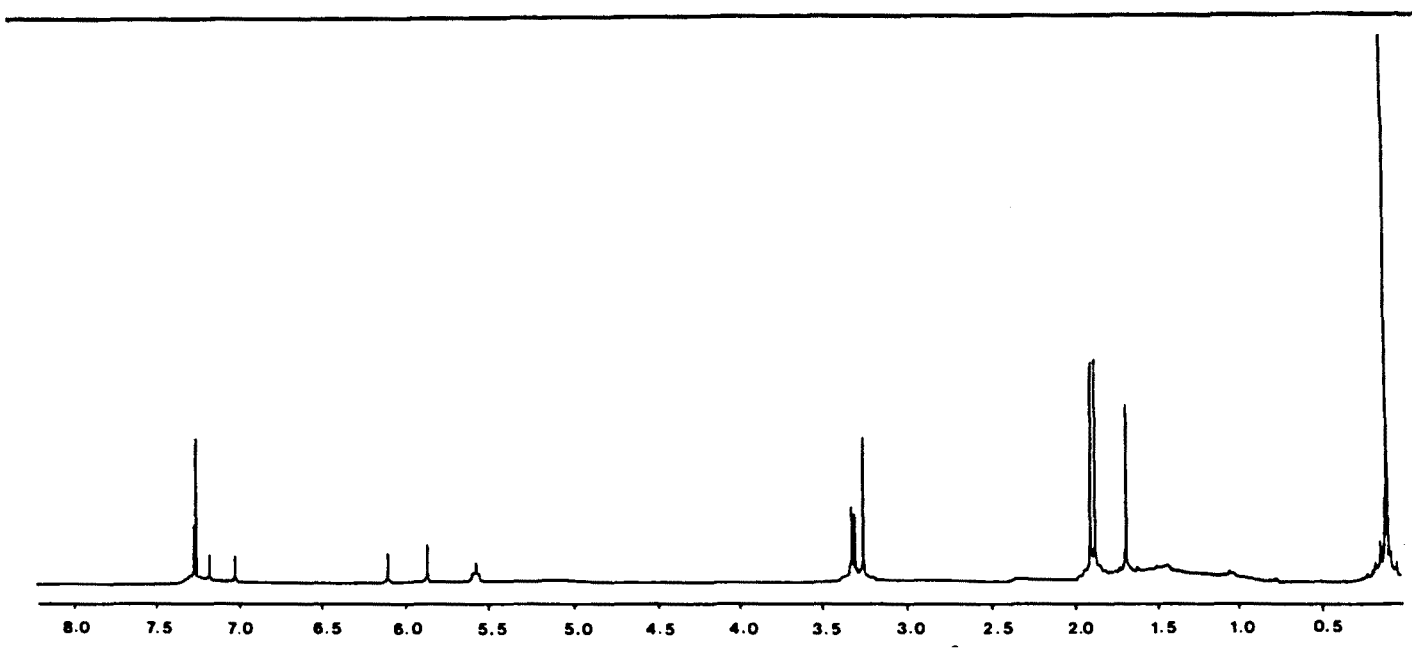


Figura 5.7. Espectro NMR de la longifolina de la secreción mucosa de *H. webbi*.

La extracción de las MDFs se realizó separando las posteriores y las laterales de ambos lados, hallándose longifolina y otros furanos con rf superiores. Los datos cuantitativos se pueden observar en la Tabla 5.15.

	peso seco	extracto acetónico
MDFs posteriores	19 mg	16 mg
MDFs lateral derecho	22 mg	11 mg
MDFs lateral izquierdo	22 mg	13 mg
Totales	63 mg	40 mg

Tabla 5.15. Análisis químico de las MDFs de *H. webbi*.

En los trozos del manto anteriores (sin MDFs) extraídos de igual forma, no apareció prácticamente nada de longifolina. El hecho de que la longifolina y los otros furanos se encontrasen en las MDFs y en la glándula digestiva apoyaba la hipótesis de que todas estas sustancias tuviesen un origen dietético.

En el segundo animal de Castellammare aparecía también la longifolina localizada en MDFs y hepatopáncreas, junto a otros furanos minoritarios. La muestra de las MDFs se pasó por una columna de sílice de unos 18 cm. Se recogieron fracciones grandes de unos 30 ml y se hicieron las placas correspondientes. El disolvente usado fue hexano. Las fracciones obtenidas fueron:

fr. 4: <1 mg furano superior.
fr. 5: < 1 mg furano inferior.
fr. 11-13: 25 mg de longifolina.

Ejemplar de Formentera. Se disecó y se extrajo del mismo modo. Los resultados se pueden observar en la Tabla 5.16.

secciones (n=1)	peso seco	extracto furanosesquiterpenos acetónico	
MDFs	13 mg	3.5 mg	2 mg longifolina 1.2 mg furanos sup.
resto del manto	77 mg	4 mg	
glándula digestiva	14 mg	7 mg	2 mg longifolina <1 mg furanos sup.
resto de vísceras	19 mg	1 mg	
puesta	54 mg	9 mg	

Tabla 5.16. Análisis químico del ejemplar de *H. webbi* de Formentera.

Se hizo un análisis NMR del extracto acetónico de la puesta, en el que se había observado un furano rosa interesante (rf 0.7 en TLC con éter de

petróleo). En la puesta también había ésteres. La longifolina era abundante en MDFs y hepatopáncreas (muy poco en los otros extractos, pudiendo en el caso del resto de las vísceras proceder de restos de la esponja presa en el tubo digestivo anterior). Apareció asimismo un producto furánico interesante (rf 0.5 en éter de petróleo) sobre la longifolina en el extracto del hepatopáncreas y un poco en el extracto de las MDFs. Se hicieron cromatografías en columna (pasteurinas) con éter de petróleo de los extractos de las MDFs y glándula digestiva para cuantificar la longifolina y el resto de productos furánicos, obteniéndose los resultados que se han expuesto en la Tabla 5.16. La longifolina de las MDFs se obtuvo en las fracciones 27-42, y la del hepatopáncreas en la 42-54 de las respectivas columnas. El resto de furanos se obtuvieron en las fracciones 1-26 del extracto de las MDFs y 14-24 de la glándula digestiva.

La escasa cantidad de furanos no permitió realizar otros análisis.

Ejemplar de Sibari. Tras disección y extracción como se ha descrito, se obtuvieron los resultados que se exponen en la Tabla 5.17.

secciones (n=1)	peso seco	extracto acetónico	furanos	quiterpenos
MDFs	152.0	98.0*	53.0 longifolina	3.8 nakafurano-9
resto del manto	647.2	156.8		
glándula digestiva	810.8	422.0	26.0 longifolina	2.0 nakafurano-9
resto de vísceras	336.5	194.0		
* = las MDFs se extrajeron con éter etílico.				

Tabla 5.17. Análisis químico del ejemplar de *H. webbi* de Sibari.

Se hizo una columna en una pipeta pasteur del extracto del hepatopáncreas con n-hexano, y se repitió con fracciones más pequeñas. Se obtuvieron los furanos más o menos separados. Se conservaron los esteroides.

Al final, tras varias purificaciones repetidas, se obtuvieron 25.9 mg de longifolina, 2 mg de furanos de rf superior limpios, y 4.6 mg de mezcla de productos.

Posteriormente se extrajo el resto del animal con acetona (se descongeló ligeramente y no se pudo ver bien la distribución de los productos). En el hepatopáncreas había esteroides, longifolina, otros furanos y sales, y en el resto de las vísceras había también sales. El producto más abundante era la longifolina y un par de furanos de rf superior. Se hizo una columna pequeña con el extracto del resto del manto y pie (sin MDFs) para extraer los productos de contaminación (furanos) presentes en estos extractos debido a su mala conservación (por ese motivo no se incluyen en la Tabla). Se usó una columna de sílice con éter de petróleo como disolvente. Se repitió para separarlos mejor. Tras varias purificaciones se obtuvieron: furanos de rf superior 0.5 mg (fr. 6-8); longifolina 24.8 mg (fr. 9-11); esteroides 2.9 mg (fr. 20-23). La longifolina se purificó con otra columna pequeña hasta conseguir 18.3 mg limpiísimos. El nakafurano-9 obtenido de las MDFs se utilizó para efectuar un test de ictiotoxicidad.

Ejemplar de Blanes. Los resultados de la disección y extracción de un ejemplar se detallan en la Tabla 5.18.

secciones (n=1)	peso seco	extracto	furanosesquiterpenos acetónico
MDFs	46.5	29.1	10.0 longifolina 14.0 <i>iso</i> -tavacfurano
resto del manto	244.6	83.4	
glándula digestiva	143.4	250.6	14.0 longifolina 14.0 <i>iso</i> -tavacfurano
resto de vísceras	56.4	21.1	

Tabla 5.18. Análisis químico del ejemplar de Blanes (datos en mg).

En las MDFS el producto más abundante es el *iso-tavacfurano*. Los furanos son especialmente abundantes en MDFs y glándula digestiva, pero también hay trazas en los otros extractos, seguramente por contaminación (se descongeló ligeramente durante el transporte). Contenía además otro producto, posible isómero del anterior en cantidades inferiores que no pudo ser analizado.

Ejemplares de Palamós. El resultado preliminar del análisis de los 8 animales, que fueron disecados sin luz para no alterar los furanos, se encuentra detallado en la Tabla 5.19.

secciones (n=8)	extracto	furanosesquiterpenos
MDFs*	0.8mg ¹	5 productos n.i.
resto manto	n.p.	2 productos n.i.
glándula dig. y herm.	n.p.	5 productos n.i.
resto de vísceras	223mg ⁰ , 76mg ¹	6 productos n.i.
secreción mucosa	429mg ²	6 productos n.i.
*= análisis de una pequeña fracción. (n.p.= no pesado; ¹ = extracto etéreo; ² = extracto con cloroformo/metanol; n.i.= no identificados).		

Tabla 5.19. Análisis químico de los ejemplares de *H. webbi* de Palamós.

Este análisis no ha sido finalizado, y los extractos se encuentran en fase de estudio en el I.C.M.I.B.. La secreción mucosa fue recogida mientras los animales estaban vivos. De entre los varios productos furánicos presentes en estos ejemplares, uno es probablemente el mismo isómero del tavacfurano del ejemplar de Blanes (*iso-tavacfurano*).

Otro análisis que resta por finalizar es el de los 360 mg de la puesta obtenida en acuario, en la cual, de todos modos, no se han detectado productos furánicos.

Discusión química.

En la Tabla 5.20. se encuentran todos los productos hallados en esta especie, así como la media de cada producto en cada grupo estudiado.

Producto	Cantidad/animal	Procedencia
Longifolina	26.25 mg	Castellammare
	4 mg	Formentera
	97.3 mg	Sibari
	24 mg	Blanes
<i>iso</i> -tavacfurano	28 mg	Blanes
nakafurano-9	5.8 mg	Sibari
furanos no identificados	1 mg	Castellammare
	2.2 mg	Formentera
	9.5 mg	Palamós

Tabla 5.20. Productos hallados en *H. webbi* según la localidad de procedencia.

La cantidad total de furanos por animal se detalla en la Tabla 5.21.

Procedencia	Furanos	Mes del año
Castellammare	27.25 mg	Diciembre
Formentera	6.2 mg	Octubre
Sibari	103.6 mg	Julio
Blanes	52 mg	Marzo y Agosto
Palamós	9.5 mg	Octubre

Tabla 5.21. Cantidad total de furanosesquiterpenoides por animal, procedencia y época de recolección.

Las fórmulas de estos compuestos han sido ya expuestas en la Figura 5.3., excepto el *iso*-tavacfurano, que se puede ver en la Figura 5.8.

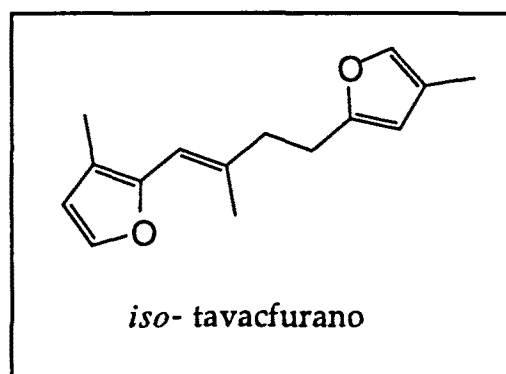


Figura 5.8. Fórmula del *iso-tavacfurano*.

Este producto, *iso-tavacfurano*, no había sido hallado nunca como producto natural, aunque fue descrito como un isómero en la síntesis del *tavacfurano*, metabolito de una esponja (Guella *et al.*, 1985b).

Es de destacar que en todos los ejemplares analizados de esta especie se ha detectado la presencia de *longifolina* (exceptuando los de Palamós en los que no lo hemos confirmado todavía). En los ejemplares de Taranto la proporción respecto al *nakafurano-9* es de 1 a 13. Las diferencias en las cantidades podrían ser explicadas por motivos diversos, tales como la alimentación (días que llevan sin comer), la época del año, su estado reproductivo o no, e incluso la edad del animal. Nos parece probable que todos estos factores influyan, aunque sin duda la época del año, e indirectamente, la esponja disponible, puede ser uno de los más importantes, como ya hemos comentado para *H. cantabrica*.

La diferencia en las cantidades respecto al trabajo previo de García *et al.* (1990), se explicaría al haber sido disecados de modo que, al parecer, no analizaron todas las MDFs pequeñas de los laterales. Sumando los valores que hallaron en el resto del manto, estos son similares a los mínimos aquí expuestos (ver, por ejemplo, los ejemplares de Formentera), si bien no indicaron en qué época del año fueron capturados sus ejemplares.

El estudio químico de los ejemplares disecados ha demostrado que la presencia de los productos furánicos en el manto se limita a las MDFs. Estos compuestos se hallan también en la glándula digestiva y en las secreciones mucosas. La secreción mucosa, pues, tendría además de una función mecánica, una función defensiva.

Origen de los productos.

Tras observar las placas de TLC y el espectro NMR de la esponja *Dysidea fragilis* de Taranto, la idea de que la longifolina procedía de una esponja quedaba claramente reforzada (ver apartado 5.4., *H. villafranca*). Esta esponja presentaba longifolina y resultó ser la presa de *H. villafranca* en Taranto. Por otro lado, (ver el apartado 5.4.) se halló nakafurano-9 en *D. fragilis* de Asturias. Todo esto confirmaba la idea de que también en *H. webbi* los furanos debían proceder de una esponja similar. Sin embargo, nunca se había visto ningún ejemplar de *H. webbi* comiendo *D. fragilis*. Una posibilidad era que se alimentara de noche. Sin embargo, tras mantenerlo en acuario se observó que se alimentaba de *D. fragilis* (Mollo, resultados no publicados).

El ejemplar de Tossa se mantuvo en acuario vivo hasta mayo-91, con la esponja *Dysidea avara* de Blanes. Se observaba generalmente a diario, y nunca se le vió comer, ni una sola vez. El último ejemplar capturado, procedente de Palamós, fue mantenido en ayuno durante varias semanas, tras lo cual se puso en el acuario un fragmento de la esponja *D. fragilis* y se observó como comía, sin moverse de las cercanías de la esponja durante varios días seguidos. Los restos de esponja fueron consumidos (presumiblemente de noche) durante la semana siguiente. Es de destacar, sin embargo, la gran capacidad de esta especie para sobrevivir en acuario sin alimento, a pesar de disminuir mucho de tamaño, como ya describió Ros (1978a).

Función.

Para las sustancias que habían sido descritas previamente para *H. cantabrica* los resultados de los tests han sido ya expuestos (ver apartado 5.1., *H. cantabrica*). El iso-tavacfurano no fue probado debido a su escasez.

Del nakafurano-9 obtenido de las MDFs (3.8 mg) se usaron 3.1 mg para el test de ictiotoxicidad. Resultó ser muy ligeramente tóxico, los peces se volvieron negros (a las 6 h, 10ppm) y vomitaban a los 45' en 10 ppm y 1 ppm (no en el blanco). Sin embargo, se recuperaron y solo murió uno (10 ppm).

Se realizó un experimento de predación con la especie *Pleurobranchaea meckeli*. El supuesto depredador se mantuvo a dieta durante varias semanas. Al ser puestos en el mismo acuario, *P. meckeli* atacó rápidamente al doridaáceo, mordiéndolo en la zona posterior del manto (al parecer ataca siempre por detrás o lateralmente). El nudibranquio escondió las branquias y se encogió velozmente, quedando como una bola redonda, con el borde del manto (con las MDFs) en la parte más externa. Tras un segundo mordisco, a los pocos segundos, el depredador se alejó rápidamente en una dirección perpendicular a la que llevaba. Al volvérselo a encontrar en el acuario cambió otra vez de dirección. A los pocos minutos el doridaáceo recuperó su forma normal y siguió su camino. Se comprobó que había perdido un pequeño fragmento del manto, posiblemente con un par de MDFs de la zona posterior del borde del manto.

Al cabo de 5 días se repitió el experimento con los mismos ejemplares. *P. meckeli* mordió con ansiedad un trozo, esta vez lateral, del borde del manto. Esto significa que no conservaba memoria del "olor" de *H. webbi*. Sin embargo, lo abandonó en seguida, a pesar de estar hambriento, y se alejó. El ejemplar de *H. webbi* sobrevivió a los dos ataques.

Es poco probable que un ejemplar de *P. meckeli* se encuentre con uno de *H. webbi* en la naturaleza, ya que viven en ambientes distintos (el primero en sustratos blandos y el segundo en zonas rocosas). La idea de que

solamente los opistobranquios macrocarnívoros podrían alimentarse de estos otros opistobranquios químicamente protegidos, en este caso no parece posible. No solamente viven en hábitats distintos sino que, al menos en este caso, no son capaces de resistir su "sabor".

5.3.3.3. Resumen conclusivo.

H. webbi es capaz de seleccionar, en distintas áreas geográficas, esponjas ricas en longifolina (*D. fragilis*), de las que obtiene los furanosesquiterpenos con actividades tóxicas y repelentes, que utiliza para su propia defensa. 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.

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

5.4.1. Introducción.

5.4.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias más frecuentes.

Como se indica en Cervera *et al.* (1988), el nombre actualmente aceptado de esta especie es *H. villafranca* (Risso, 1818).

Doris villafranca.- Risso (1818, 1826).

Doris gracilis.- Delle Chiaje (1822); Rapp (1827); Philippi (1844); Cantraine (1841).

Doris schultzi.- Delle Chiaje (1841).

Doris gracile.- Delle Chiaje (1841).

Doris pulcherrima.- Cantraine (1841).

Chromodoris villafranca.- Bergh (1878); Oliveira (1895); Vayssière (1901); Nobre (1932).

Chromodoris gracilis.- Ihering (1880); Oliveira (1895).

Glossodoris gracilis.- Pruvot-Fol (1951, 1953, 1954); Sordi y Majidi (1957); Haefelfinger (1960, 1969a y b); Gantés (1962); Vicente (1967); Schmekel (1968); Fez (1974); Margalef (1982); Ros (1975, 1977, 1978a y b, 1981); Ros y Altimira (1977); Ortea (1977); Pereira (1980); Altimira *et al.* (1981); García (1982).

Hypselodoris gracilis.- Ballesteros (1980, 1981); Templado (1982, 1983 y 1984); Urgorri y Besteiro (1983); Perrone (1983); Rolán (1983); Luque (1983 y 1986); Huelin y Ros (1984); Ros (1985); Ballesteros *et al.* (1986a); Salas y Luque (1986); Riedl (1986); Otero y Trigo (1987); Trigo y Otero (1987).

Hypselodoris villafranca.- Schmekel y Portmann (1982); Ros (1985); Cervera y García (1986); Dekker (1986); Marín y Ros (1987); Cattaneo *et al.* (1990); García *et al.* (1991); Avila *et al.* (1991b); Avila y Durfort (1992); Fontana *et al.* (en prensa).

5.4.1.2. Breve descripción y características de la especie.

Esta especie presenta un complejo dibujo de líneas amarillas en el dorso. El raquis de las hojas branquiales es blanco. El hiponoto presenta líneas blancas o amarillas, y los rinóforos presentan pigmentación blanca en la parte posterior de las láminas.

5.4.1.3. Referencias comentadas.

Morfológicas o descriptivas.

García (1984) indicó que tras las branquias se observaban 3-4 acúmulos glandulares esféricos subepidérmicos. García *et al.* (1991) estudiaron 26 ejemplares y describieron sus MDFs, mencionando que estos animales al ser molestados segregaban una sustancia opaca del manto que probablemente se mezclaba con el muco.

Ecológicas.

En cuanto al hábitat, Ros (1978a) lo cita en biocenosis de praderas de fanerógamas marinas y en sustratos duros (tanto mediolitoral como infralitoral y circalitoral precoralígeno y coralígeno). Schmekel y Portmann (1982) lo mencionan también en praderas de *Posidonia*.

Ros (1978a) citó como alimento para esta especie la esponja *Ircinia fasciculata* y otra *Ircinia* sp, y como consecuencia, en su clasificación de regímenes alimentarios, la incluyó en el grupo 5 [zoófagos: micrófagos (ramoneadores, suctores): de esponjas]. A su vez citó que sus puestas no eran depredadas en acuario por *Favorinus branchialis* (de régimen oófago).

Ros (1976b) discutió su forma "aplastada" (en comparación con otras especies del mismo género) como método críptico (de camuflaje), y citó por primera vez círculos de mimetismo que supuso müllerianos (no se había demostrado su carácter repulsivo o desagradable). Según esto esta especie

entraría en el grupo I (Ros, 1976b), (grupo A, Ros, 1977). En el mismo trabajo (1976b), se comprobó que no presentaba secreción ácida. Por otro lado, mencionó la exhibición de grupo con motivo reproductor, aunque también postuló un efecto advertidor. Este mismo autor utilizó esta especie (1976b y 1977) en experimentos con peces que comentaremos en la discusión.

Ros (1977) comenta asimismo la dificultad para identificar los ejemplares juveniles y su fácil confusión con otras especies del mismo género. Una descripción detallada de la puesta se puede hallar en Gantés (1962) y Haefelfinger (1969a y b).

Químicas.

Cimino *et al.*, (1980b) analizaron químicamente esta especie, bajo el nombre de *Glossodoris gracilis*, hallando longifolina. Por ello dedujeron que el animal se alimentaría seguramente de alguna esponja relacionada con *Pleraplysilla spinifera*, de la que Cimino *et al.* (1975b) aislaron por primera vez este metabolito en un organismo marino (aunque esta esponja no podía ser su presa ya que presentaba otros compuestos más abundantes que no se hallaban en el molusco).

5.4.2. Material estudiado.

Se detalla en la Tabla 5.22. Se analizó también una puesta realizada en acuario por los animales capturados en Taranto.

Los ejemplares asturianos se recogieron en intermareales rocosos, en los que están citadas las especies de esponjas *Dysidea fragilis* y *D. avara* (ver 5.1., *H. cantabrica*). Todos los ejemplares se capturaron en sustratos rocosos. No se poseen datos de los ejemplares de Portugal.

LOCALIDAD	FECHA	(1)	(2)	(3)
Blanes	Dic. 1987	1	-10 m	m
Blanes	17-7-91	1	-12 m	exp
Sagres	Mayo-88	7	-	rád*
Taranto	16-6-88	1	-4 m	quím
Taranto	11-10-88	15	-4 m	quím-rád
Las Llanas	10/11-12-88	30	IT/IM	quím-rád
Las Llanas	7-1-89	2	IT/IM	quím
Taranto	29-3-89	70	-4 m	quím-rád
Formentera	29-10-89	3	-3 m	quím-rád
Las Llanas	2-12-89	29	IT/IM	quím
Santander	27-3-90	2	IT	quím-rád
TOTAL		161		
<p>(1) Número de individuos. (2) Profundidad. IT= Intermareal rocoso. IM= Inmersión en litoral rocoso entre 1 y 10 m. (3) Utilización del material (rád= rádula, quím= química, m= microscopía, exp= experimentos). * = Este material fue analizado químicamente, pero debido a su larga conservación en alcohol no se obtuvieron resultados positivos, ya que los productos se alteraron.</p>				

Tabla 5.22. Datos de los ejemplares de *H. villafranca* estudiados.

Los ejemplares de Taranto se recogieron en una escollera compuesta de rocas sueltas entre 0 y 6 m. Se observó y fotografió un animal en las proximidades de una esponja blanquecina que fue también recogida y analizada (ver fotografía 59).

5.4.3. Resultados y discusión.

5.4.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

Esquemas anatómicos.

El tamaño de algunos de los ejemplares puede verse en la Tabla 5.23. La coloración en el adulto presenta líneas amarillas anastomosadas amarillo y azul fuerte.

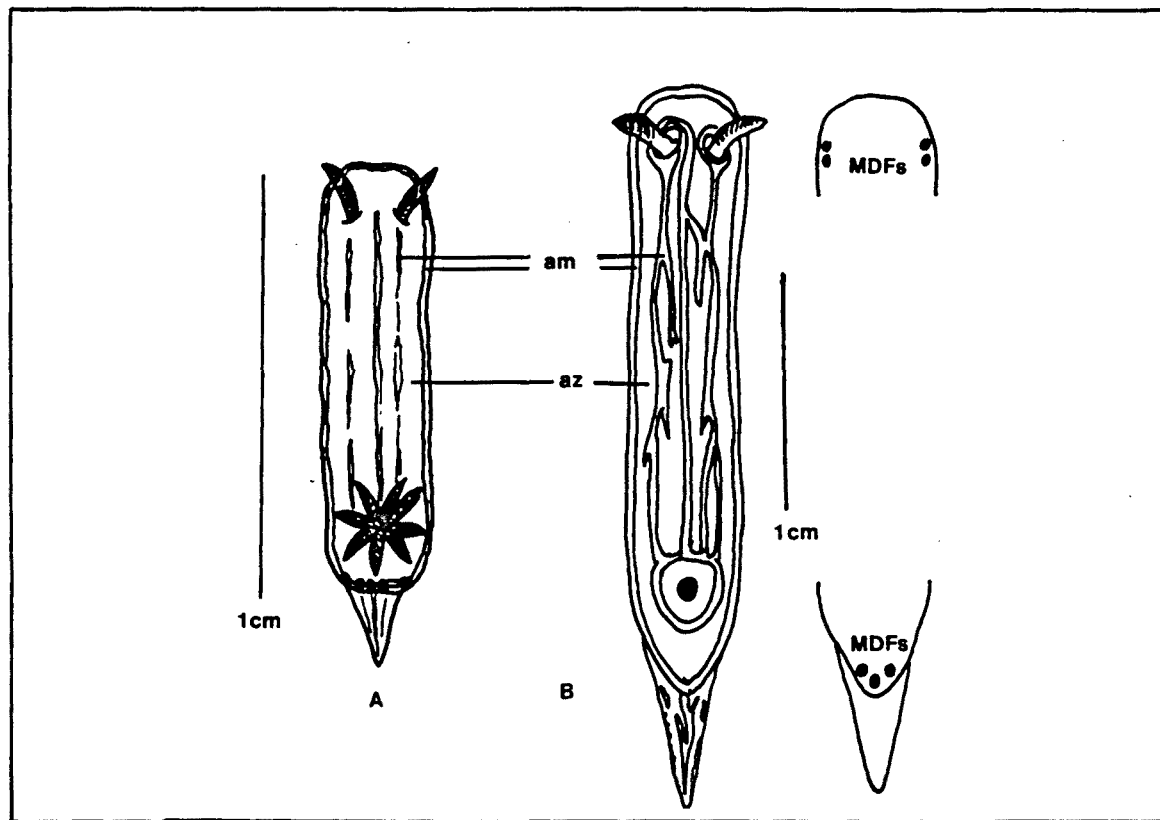


Figura 5.9. Morfología externa de *H. villafranca*. A. Ejemplar juvenil. B. Ejemplar adulto de Las Llanas. (am= amarillo; az= azul).

En los ejemplares más jóvenes existen menos líneas amarillas, que además no se anastomosan (ver el ejemplar de la fotografía 59).

En la Figura 5.9.B se puede observar la localización de las MDFs en el animal.

Formaciones dérmicas del manto.

La Tabla 5.23. incluye el número de MDFs anteriores y posteriores, y el tamaño de los ejemplares estudiados.

PROCEDENCIA	TAMAÑO*	MDFs ant.	MDFs post.
Taranto (16-6-88)	1.7	2+2	4
(11-10-88)	1	2+2	4
Las Llanas (Dic. 1988)	1	1	5
	0.8	0	5
	n.m.	0	5
	n.m.	2+0	5
(7-1-89)	n.m.	0	4
(2-12-89)	1.5	0	4
	1.5	2	5
	1	0	3
	1	0	5
	n.m.	0	4
	n.m.	1+1	3

* = El tamaño se expresa en cm. (n.m. = no medido).

Tabla 5.23. Número de MDFs en los ejemplares de *H. villafranca* estudiados.

Uno de los ejemplares asturianos presentaba 5 MDFs posteriores y solo 1 anterior visible, situada a la derecha. De los animales restantes de Asturias se pudo observar que 5 de ellos eran maduros sexualmente. Uno de los ejemplares de Las Llanas presentaba, visto bajo la lupa, pequeñas espículas en el borde del manto, en la zona anterior, donde no había MDFs.

García *et al.* (1991) describieron en los ejemplares pequeños (4-5 mm) de 1 a 4 MDFs anteriores de unas 50 μm , y 4 MDFs posteriores de unas 250 μm , y en ejemplares mayores (15-25 mm) de 1 a 4 MDFs anteriores de unas 300 μm y de 4 a 8 posteriores de unas 700 μm . Los datos de la Tabla 5.23. se acercan más a los ejemplares de García *et al.* (*op. cit.*) de pequeño tamaño, aunque algunos de ellos medían hasta 1.5-2 cm. Esta variabilidad geográfica queda reflejada en la Figura 5.10. En dicho trabajo, García *et al.* no incluían fotografías de estas MDFs.

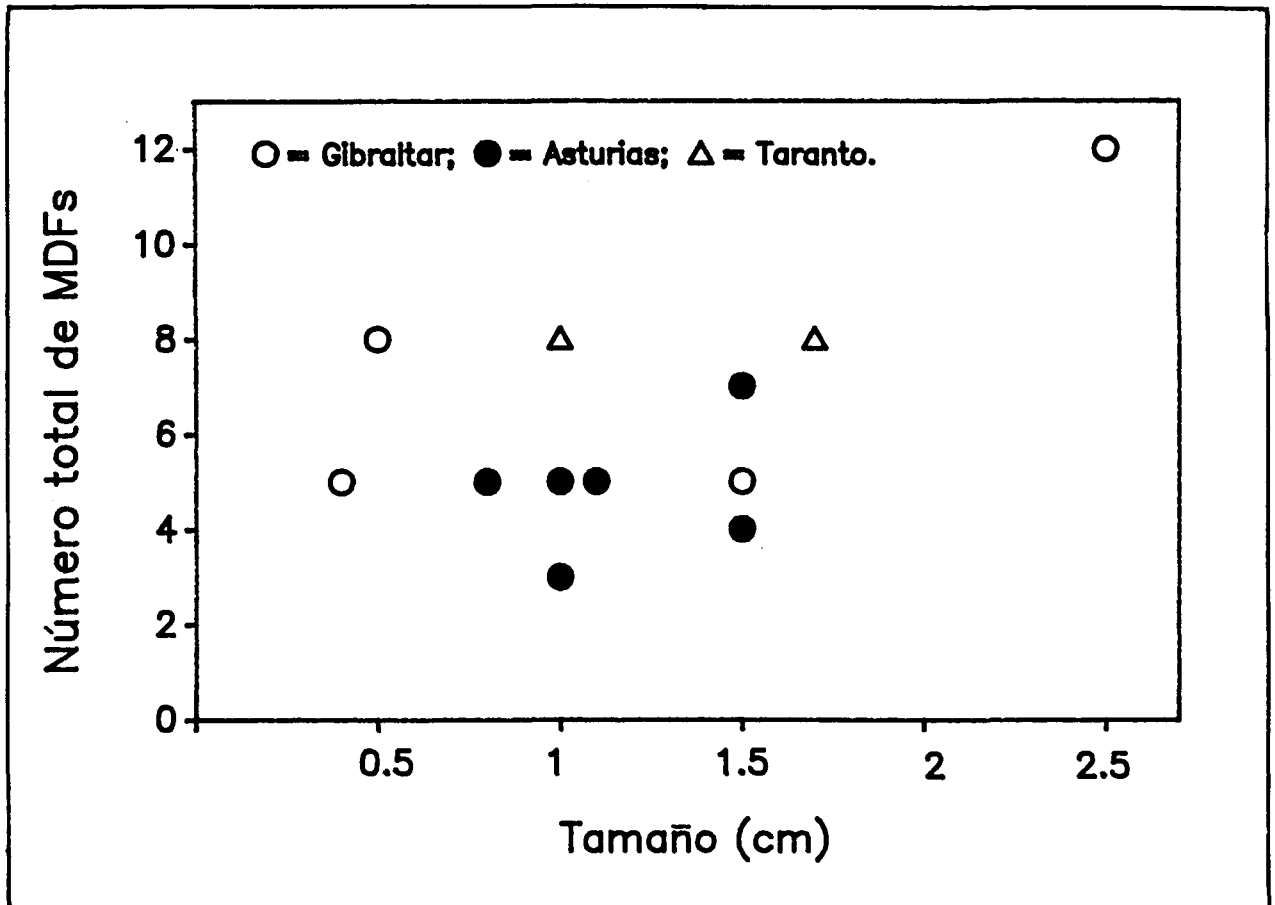
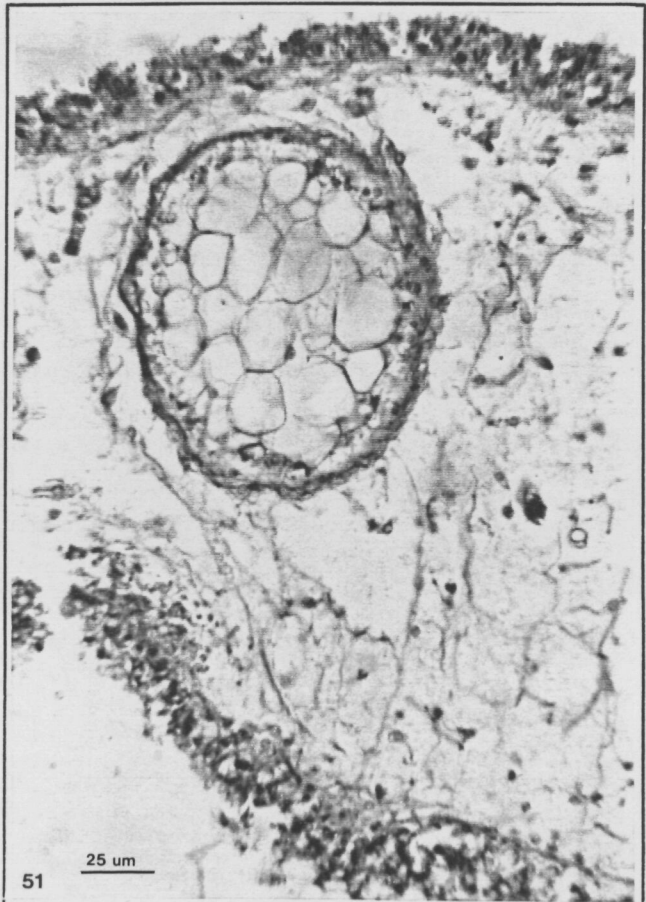
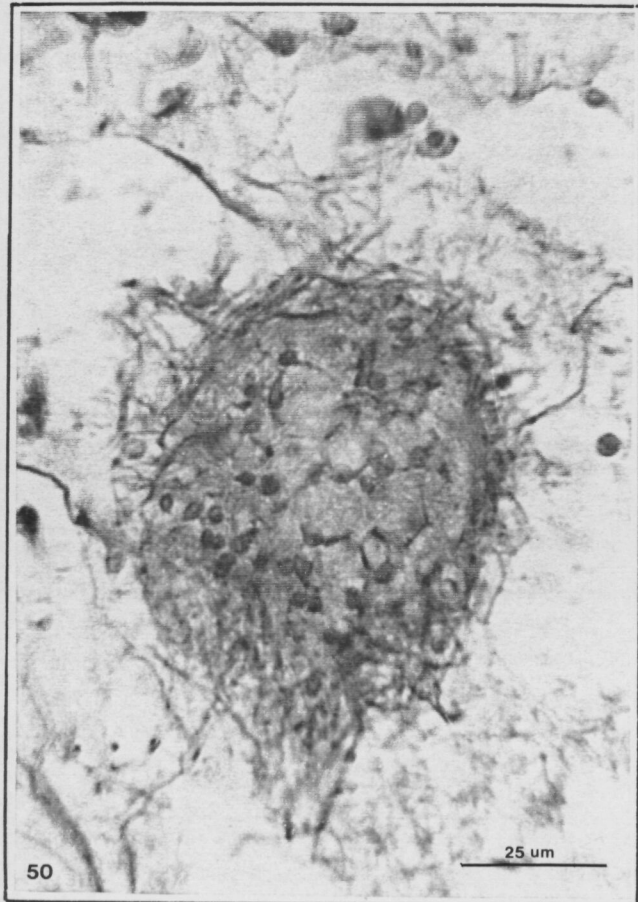
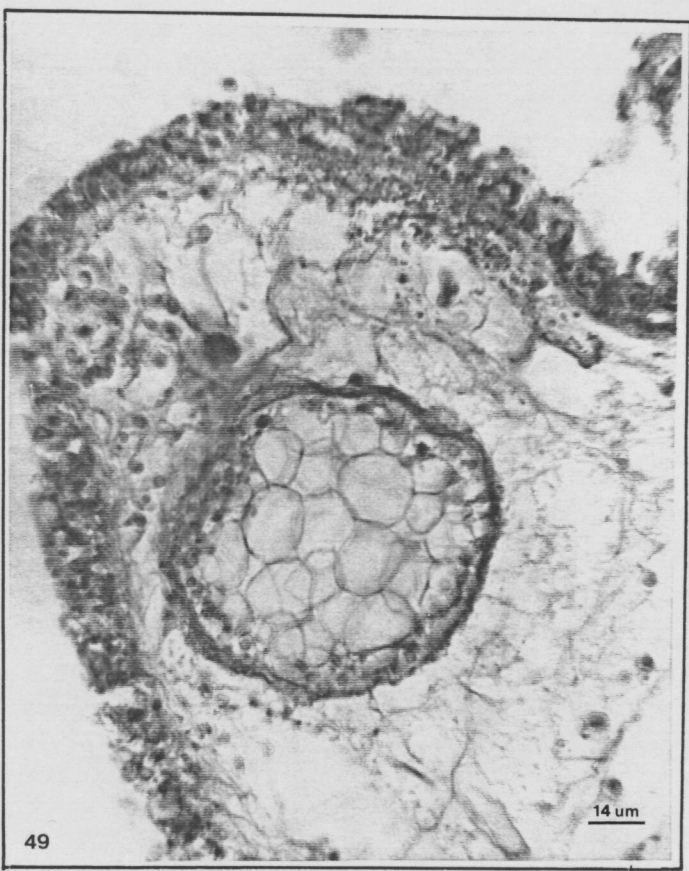
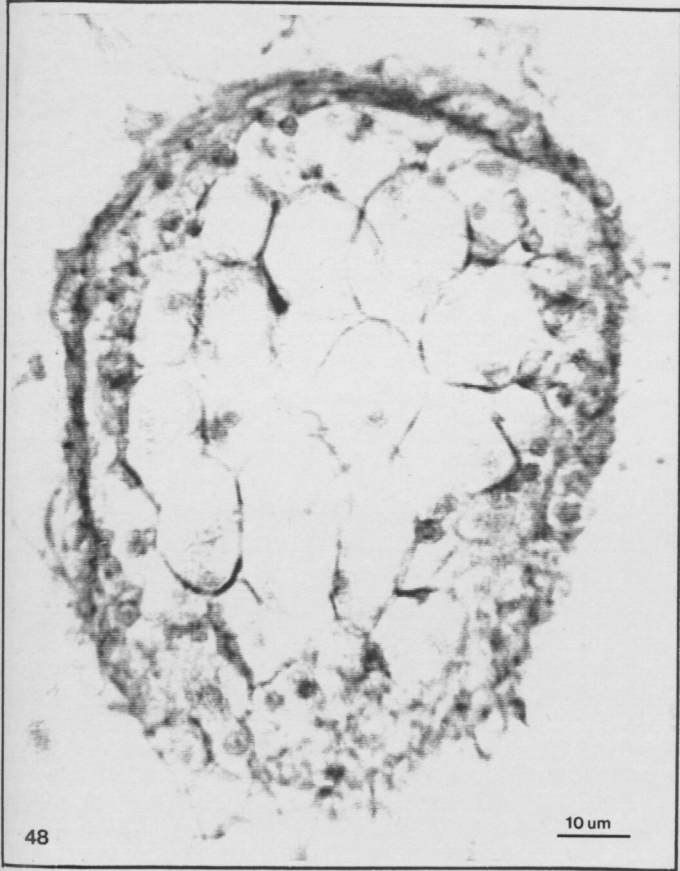


Figura 5.10. Número de MDFs en ejemplares de distintas poblaciones de *H. villafranca* (datos de Gibraltar de García *et al.*, 1991).

Para su estudio microscópico un ejemplar capturado en Blanes fue procesado del modo descrito en el apartado 4.3.1., e incluido en parafina. Los cortes, de 12 μm , se tiñeron con el reactivo de Mallory y se montaron con bálamo del Canadá. Se fotografiaron los detalles de las MDFs, como se puede observar en las fotografías 48 a 51.

Las MDFs situadas en la zona posterior del borde del manto son agregados multivesiculares, envueltos por un conjunto de células mononucleadas (ocasionalmente binucleadas). Estas células forman una cubierta que de alguna manera aísla el conjunto interno de vesículas. Al microscopio óptico, se observa que estas vesículas están delimitadas por una



cubierta que tiene una cierta afinidad con los colorantes básicos. El contorno de las vesículas es entre esférico y poligonal, siendo más irregulares que las descritas para *H. cantabrica*, p. ej. Estas estructuras podrían presentar un contenido lipídico. No se observó ningún sistema de apertura en las MDFs.

Rádula y armadura labial.

Se detallan en la Tabla 5.24. las fórmulas radulares de los ejemplares estudiados.

Número de filas	Número de dientes	Localidad	Referencia
52	52-0-52	Las Llanas	esta
62	48-0-48	Las Llanas	esta
26*	40-0-40	Formentera	esta
47	50-0-50	Santander	esta
54	38-0-38	Santander	esta
40	36-0-36	Taranto	esta
38	40-0-40	Taranto	esta
60	72-0-72	Sagres	esta
51	45-0-45	Sicilia	Ortea y García (en prensa)
58	94-0-94	Asturias	Ortea y García (en prensa)

* = incompleta.

Tabla 5.24. Fórmulas radulares de algunos ejemplares de *H. villafranca*.

Se han observado un total de 9 rádulas de esta especie (3 de Taranto, 2 de Asturias, 2 de Santander, 1 de Formentera y 1 de Sagres), así como 8 armaduras labiales (2 de Taranto, 2 de Asturias, 2 de Santander, 1 de Formentera y 1 de Sagres). El tamaño de algunos de estos ejemplares ha sido expuesto en la Tabla 5.23. La armadura era bastante uniforme en todos los casos, presentando algunos uncinos dobles (ver fotografía 52). Las rádulas eran muy parecidas en todos los ejemplares, por lo que se han seleccionado algunas de las fotografías que mejor muestran sus características (53 a 58). Los dientes son bicúspides y presentan dentículos en la segunda cúspide, de

forma bastante marcada (según la posición del diente en la rádula), y en número de hasta 4. Los dentículos, muy agudos, se suavizan hacia los dientes marginales (ver fotografías 53 y 56).

5.4.3.2. Análisis químico.

Productos obtenidos: Estructura.

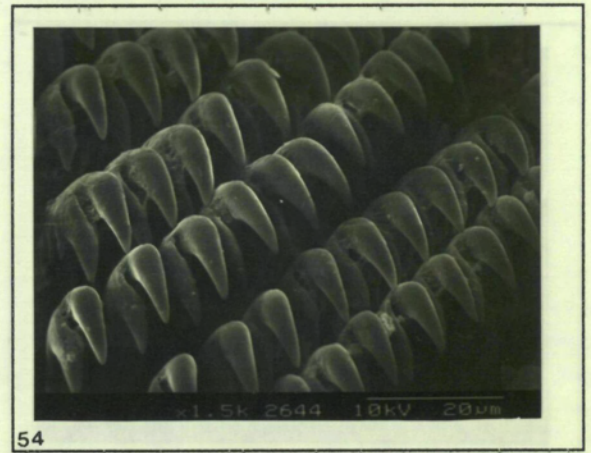
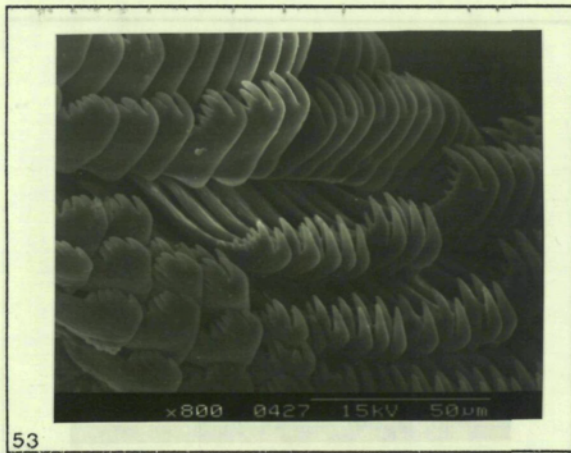
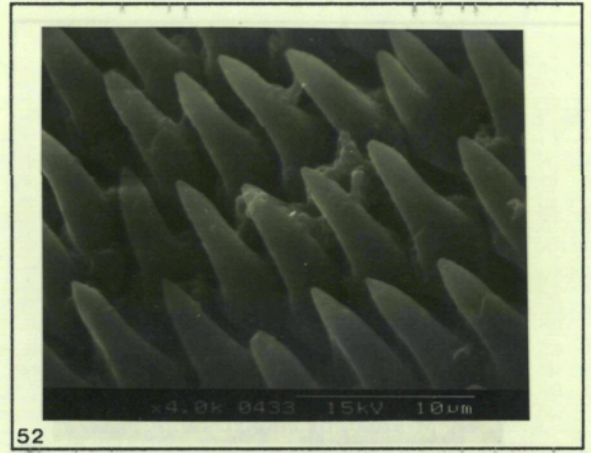
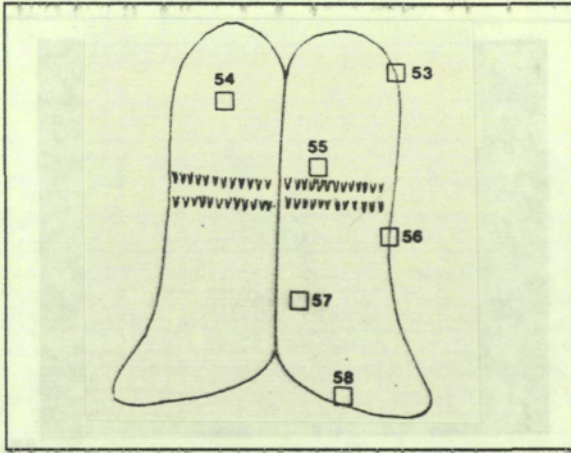
Ejemplares de Taranto. Se pueden ver los resultados en la Tabla 5.25.

Ejemplares (número y fecha)	Secciones	peso seco	extracto acetónico	productos obtenidos
12 11-10-88	enteros	25.7	6.9	longifolina otros 4 furanos
30 30-3-89	enteros		15*	longifolina furanos sup.
12 30-3-89	branquias	5	1	
	MDFs	24	27	13 longifolina otros furanos
	resto manto y pie	48	17	
	glándula digestiva	89	28	10 longifolina otros furanos
	resto de vísceras	52	13	
* = extracto etéreo.				

Tabla 5.25. Análisis químico de los ejemplares de Taranto (datos en mg).

En un primer análisis cualitativo, se localizó longifolina y otros furanos en MDFs y glándula digestiva de 4 animales de Taranto (3 del 11-X-88 y 1 del 16-VI-88) separadamente, mientras que en el resto del manto y en el resto de las vísceras no aparecieron. En uno de estos ejemplares no se observó longifolina en la glándula digestiva, posiblemente porque estuvo muchos días en el acuario sin comer (34 días). El producto fluorescente que se encontró la primera vez a rf 0.8 no apareció posteriormente, por lo que podría ser que sólo

Hypselodoris villafranca



se detecte en vivo (estos animales fueron congelados), y que al congelar se degrade, o simplemente sea debido a la luz, o a la ingestión de alguna sustancia desconocida durante el mes que pasó en el acuario. En todas las ocasiones en que se buscó este producto posteriormente, se obtuvo un resultado negativo.

Fue extraída al mismo tiempo una puesta hecha en acuario por los animales de Taranto, pero no apareció nada especialmente interesante, observándose en éter de petróleo-éter etílico 9-1 una sustancia fluorescente desconocida.

Se obtuvo a oscuras el extracto acetónico de 12 animales de Taranto (11-X-88). El análisis cromatográfico en TLC mediante una placa calibrada en éter de petróleo revelada con Ehrlich mostró que la longifolina era el producto más abundante (violeta rf 0.3), y además aparecía otro producto lila a rf 0.55, uno rosa rf 0.65, otro azul-violeta a rf 0.70, y por último, uno muy poco abundante a rf 0.75. Se hizo una placa también en heptano-benceno 1-1, impregnada con AgNO_3 , en la que se observaban mejor todos estos diferentes productos.

De otros 70 ejemplares, algunos se conservaron fijados y otros se congelaron, manteniéndose el resto vivos en el acuario. De 30 de los ejemplares congelados extraídos enteros, se obtuvo un extracto etéreo de 15 mg. Mediante TLC se detectó la presencia de varios furanos de rf superior y sobre todo longifolina.

En los 12 animales del 30-III-89 apareció longifolina y otros furanos superiores, aunque más concentrados en MDFs y glándula digestiva. La longifolina pudo ser separada del resto e identificada mediante NMR, obteniéndose 13 y 10 mg de las MDFs y glándula digestiva respectivamente. El resto de furanos no pudo ser identificado debido a su escasa cantidad.

Ejemplares de Asturias. En los análisis cualitativos previos, en MDFs y glándula digestiva se localizaron longifolina y otros furanos en 4 ejemplares

(Diciembre de 1988) extraídos separadamente, mientras que en el resto del manto y en el resto de las vísceras no aparecieron.

Posteriormente se extrajo otro ejemplar entero, comparándolo con *H. cantabrica* procedente del mismo lugar, y se observó que presentaba diferencias en número y *r_f* de los furanos. Estos ejemplares presentaban poca longifolina, dos furanos superiores más abundantes, y varios furanos más.

Fueron extraídos separadamente en acetona varios ejemplares más, y se obtuvieron resultados análogos. En los extractos de las MDFs posteriores aparecían los furanos como en los animales anteriores y en las glándulas digestivas aparecían furanos en gran cantidad. En las placas se pusieron referencias auténticas de longifolina y de extractos de otras especies para comparar. Se observó que uno de los furanos era la longifolina.

En cuanto a los resultados cuantitativos, se obtuvo un extracto etéreo de 3 mg (de los tres primeros animales analizados enteros). Con este extracto se realizó una pequeña columna cromatográfica de separación con éter de petróleo, de la que se obtuvieron:

fr. 7-15: productos furánicos escalados (al menos 4). NMR.

fr. 53-54: longifolina más otros productos. NMR.

Como no se obtuvieron los productos limpios, no se pesaron las fracciones y se decidió usar más animales para obtener un extracto mayor.

El resto de datos cuantitativos se puede ver en la Tabla 5.26.

Los 24 ejemplares siguientes (2-XII-89) fueron extraídos enteros para no perder productos. Se obtuvieron 30 mg de extracto acetónico, con los que se realizó una columna con sílice. Se comparó con los animales anteriores y se observó que en estos la longifolina había casi desaparecido. La columna nos proporcionó separadamente la longifolina y el tavacfurano, mientras que la mezcla restante (12 mg) tuvo que ser analizada mediante GC-MS.

Ejemplares (número y fecha)	Secciones	Peso Seco	Extracto acetónico	Productos obtenidos
3 10/11-12-88	enteros		3*	longifolina furanos sup.
24 10/11-12-88	MDFs	4.0	11.5	6 mg longifolina 4 mg nakafurano-9 1 mg tavacfurano
	resto manto	115.0	35.0	
	glándula dig.	58.0	30.0	4 mg longifolina 2 mg nakafurano-9 0.8mg tavacfurano
	resto vísceras	95.0	13.0	
5 2-12-89	MDFs (n=22)	0.8	2.3	longifolina otros furanos
	resto manto	23	7	
	gl.dig.+hermafr.	11.5	6	longif.+ fur.
	resto gland.	19	2.6	
24 2-12-89	enteros	79	30	longifolina mezcla furanos.
* = extracto etéreo.				

Tabla 5.26. Análisis químico de los ejemplares de Asturias (datos en mg).

Los espectros NMR y, sobre todo, el análisis de las mezclas mediante GC-MS confirmaron la presencia de longifolina (0.3 mg de media por animal), tavacfurano (0.04 mg por animal), y la mezcla siguiente (0.5 mg por animal): nakafurano-9, dendrolasina (estos dos más abundantes), *iso*-nakafurano-9, *ent*-furodysinina, agassizina, y por ultimo, *iso*-dehidro-dendrolasina. Esto puede observarse en la Figura 5.11.

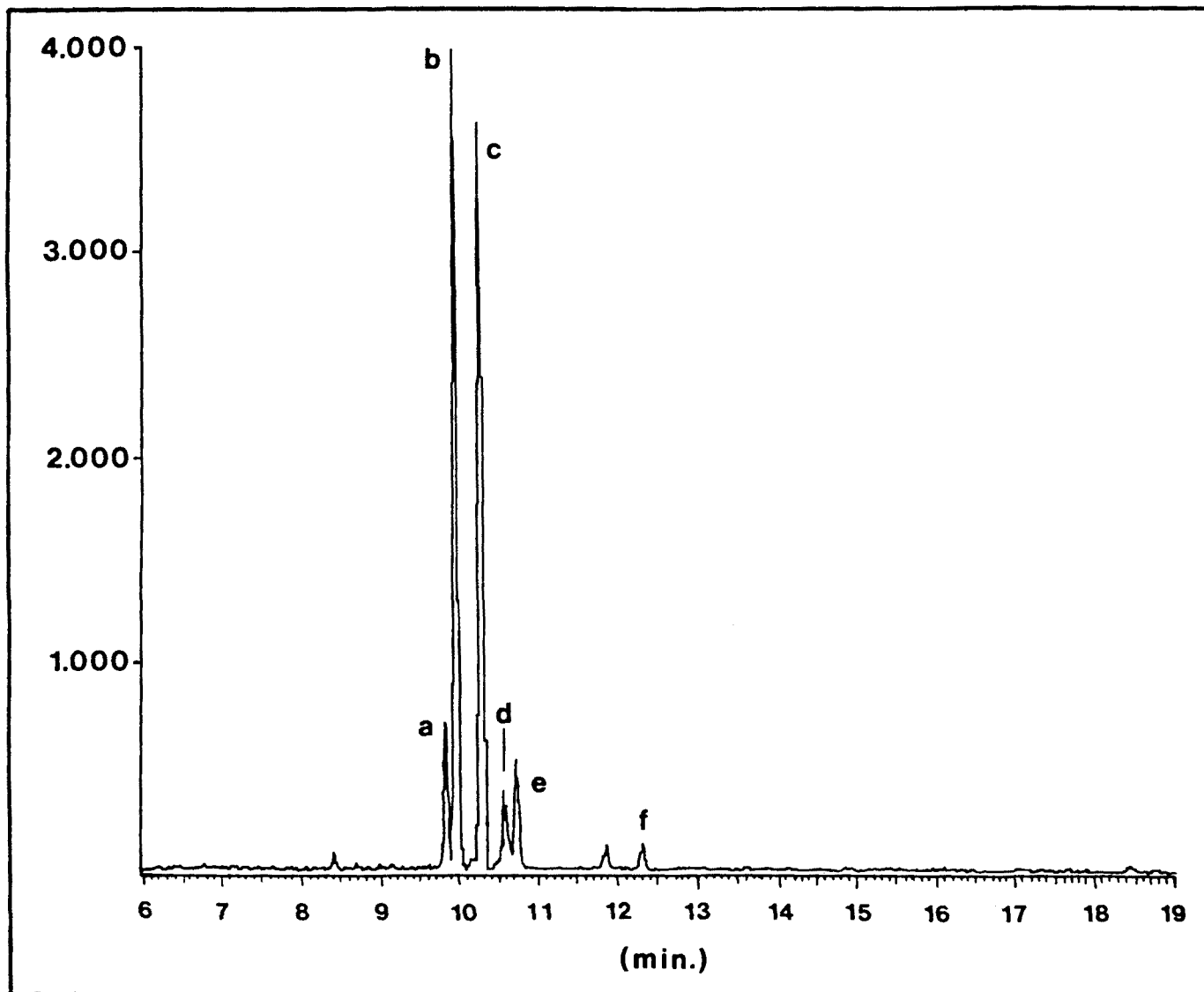


Figura 5.11. Perfil GC de la mezcla de furanos de *H. villafranca* de Asturias (a= *iso*-nakafurano-9; b= dendrolasina; c= nakafurano-9; d= *iso*-dehidrodendrolasina; e= *ent*-furodysinina; f= agassizina).

Ejemplares de Formentera. Tres animales fueron extraídos a oscuras enteros procedentes de la Platja de Llevant (29-X-89). Los datos cuantitativos del análisis químico se detallan en la Tabla 5.27. Las placas calibradas en éter de petróleo (reveladas con Ehrlich) mostraron que había longifolina, aunque ésta no era el producto más abundante (rf 0.30), había otro producto (color azul) poco abundante a rf 0.60, otro azul (el más abundante) a rf 0.65, y otro poco abundante a rf 0.70. Se hizo también una placa en heptano-benceno 1-1, con impregnación de AgNO_3 , y se demostró que uno de los productos era la dendrolasina (se puso producto auténtico de referencia en la placa).

Ejemplares (número y fecha)	Secciones	Peso Seco	Extracto acetónico	Productos obtenidos
3	enteros	6.6	0.4	dendrolasina longifolina otros 3 furanos

Tabla 5.27. Análisis químico de los ejemplares de Formentera (datos en mg).

El resto de furanos está siendo aún estudiado en el I.C.M.I.B.

Ejemplares de Santander. Dos ejemplares fueron extraídos enteros, obteniéndose 26 mg de peso seco y 7 mg de extracto acetónico. Mediante TLC en éter de petróleo, se observó que presentaban al menos 5 furanos: cuatro de ellos con un r_f entre 0.6 y 0.7 (colores violeta, lila y rosa), y otro a r_f 0.8. Uno de los primeros podría ser el nakafurano-9, aunque no pudo ser identificado debido a la escasez de material. Sin embargo el patrón era similar a *H. cantabrica* de Asturias, ya comentado.

Secreciones externas. Se realizó un experimento para provocar la secreción de muco de un animal capturado en Taranto y que había sido mantenido en acuario durante 4 días. Se puso al animal en un tubo de ensayo con poca agua, se le molestó de forma continuada, agitando primero con suavidad y después bruscamente, para forzar la expulsión de secreción mucosa. No se observó secreción alguna. Se analizó cromatográficamente el agua y no fue detectado ningún compuesto de interés. Posiblemente el movimiento no debía ser suficiente estímulo. Al cabo de 48 horas se repitió el experimento añadiendo al agua un poco de Cl_2Mg (menos del 4%). El animal segregó una secreción transparente hialina (no blanca como en otras especies, ni opaca como describieron García *et al.*, 1991). Se realizó el estudio cromatográfico pero no se detectó la presencia de longifolina, ni de ningún otro furano. Podría explicarse si el animal llevase muchos días sin comer y no

tuviera longifolina acumulada. De todas formas es el resultado de un solo animal, y por tanto no es concluyente.

Discusión química.

Las fórmulas de todas las sustancias citadas se han expuesto ya en el apartado 5.1., junto a las citas previas de algunas de estas moléculas.

En la Tabla 5.28. se resumen los productos hallados en esta especie y su procedencia.

Producto	Cantidad en mg/Animal	Procedencia
longifolina	1.91	Taranto
	0.42	Asturias (Dic. 1988)
	0.3	Asturias (Dic. 1989)
nakafurano-9	0.25	Asturias (Dic. 1988)
tavacfurano	0.075	Asturias (Dic. 1988)
	0.04	Asturias (Dic. 1989)
mezcla de furanos	0.5	Asturias (Dic. 1989)
(nakafurano-9, dendrolasina, iso-nakafurano-9, ent-furodysinina, agassizina, iso-dehidro-dendrolasina)		

Tabla 5. 28. Productos hallados en *H. villafranca* según la localidad de procedencia.

Se observa que en los ejemplares de Taranto es más abundante la longifolina que en los ejemplares asturianos. El hecho de que estos últimos presenten poca longifolina, en comparación con ejemplares procedentes del Mediterráneo es posible que sea debido a la alimentación a base de otra esponja (distinta especie o la misma especie con distintas características). Al no haber sido identificados el resto de furanos de los ejemplares de Taranto, no se puede hacer más comparaciones, si bien es cierto que en ellos no aparecían tantos furanos distintos. En los ejemplares de Formentera el patrón era parecido a *H. tricolor* asturiano (que se verá más adelante), sin algunos productos.

En animales que han estado un cierto tiempo en acuario (sin esponjas a su alcance) apenas hay longifolina y otros furanos en la glándula digestiva (datos observados mediante TLC). Se aprecia que los animales del Atlántico presentan poca longifolina y en cambio muchos otros furanos en MDFs y hepatopáncreas. Esto está directamente relacionado con el origen dietético de estos productos, que se expone en el apartado siguiente.

Procedencia	Furanos (mg)	Mes del año
Taranto	2	Marzo
Asturias	0.74	Diciembre 1988
	0.84	Diciembre 1989

Tabla 5.29. Cantidad total de furanosesquiterpenos por animal en *H. villafranca*, procedencia y época de recolección.

Los resultados expuestos en la Tabla 5.29. indican que en Diciembre la cantidad total de furanos es bastante pequeña, en contraste con lo visto hasta ahora para *H. cantabrica* y *H. webbi*.

Con todo ello se confirma que los ejemplares de esta especie, tanto en el Atlántico como en el Mediterráneo presentan productos furánicos con idéntica distribución en MDFs y hepatopáncreas.

Origen de los productos.

Como ya hemos comentado previamente, la longifolina, descrita inicialmente en una planta (Hayashi *et al.*, 1972) había sido hallada solamente en la esponja *Pleraplysilla spinifera* por Cimino *et al.* (1975b), y en el nudibranquio. Esta esponja contenía a su vez otros metabolitos mayoritarios que, al no aparecer en el nudibranquio, la descartaban ya de entrada como posible presa.

La idea de que esta especie se alimentaba de *Ircinia* (Ros , 1976b) es altamente improbable, ya que presentarían ircininas, fasciculatinas u otros

productos (Cimino *et al.*, 1972a, b, c, d; Minale *et al.*, 1976) al menos en el aparato digestivo y hepatopáncreas.

Esponja de Taranto. Se recogió en Taranto una esponja blanquecina (ver fotografía 59). Se analizó químicamente, y tras TLC, separación mediante columna cromatográfica y posterior NMR (ver Fig. 5.12.) se demostró que contenía longifolina. De un peso seco de 1 g se obtuvieron 6 mg de longifolina pura. Quedó pues demostrado que es la presa de *H. villafranca* en Taranto, que también presenta longifolina. Un fragmento fijado para su identificación posterior sirvió para determinarla como *Dysidea fragilis*.

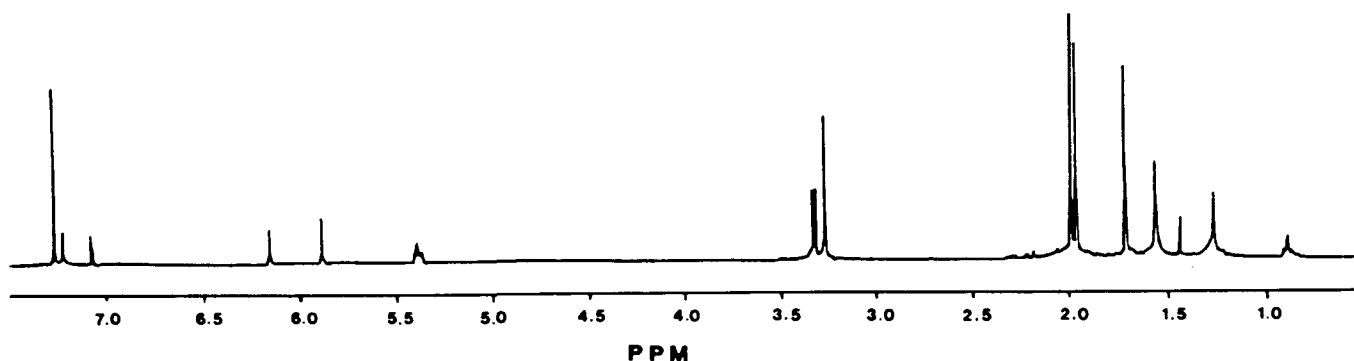
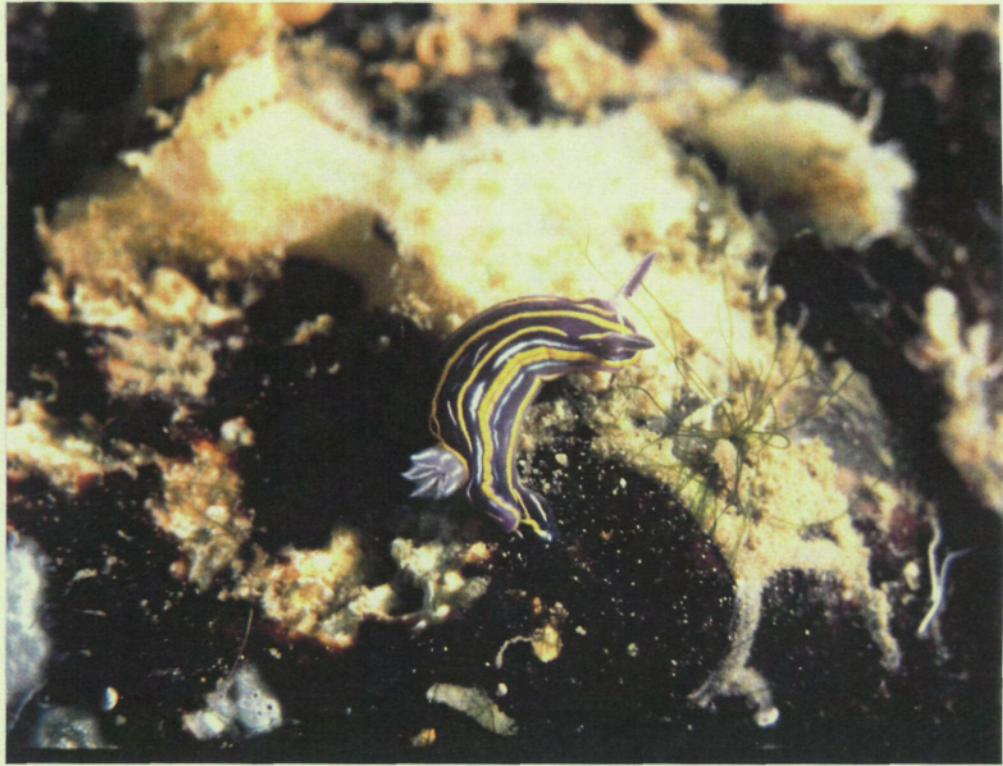


Figura 5.12. Espectro ^1H -NMR de la longifolina de *Dysidea fragilis* de Taranto.

El hecho de que animales mantenidos en acuario durante más de un mes sin alimento presenten pocos furanos, confirmaría el origen dietético de los mismos.

Análisis de las esponjas de Asturias. De entre las varias esponjas recogidas en las proximidades de los nudibranquios que fueron analizadas por ser susceptibles de ser la presa de los mismos, solo una de ellas, identificada como *D. fragilis*, dió resultado positivo. Mediante TLC se observó que dicha esponja, procedente de Asturias (Las Llanas) presentaba un patrón



59

de furanos idéntico al del molusco. Los productos interesantes (rf 0.7 en éter de petróleo y rf 0.5 en éter de petróleo-éter etílico 1-1) se analizaron mediante NMR tras purificar el extracto etéreo (180 mg). La purificación de dicho extracto se realizó mediante una columna cromatográfica en pipeta de 25 ml equilibrada con éter de petróleo. Se recogieron las siguientes fracciones de 10 ml cada una:

fr. 28-35: 1 mg furanos (NMR).

fr. 37-52: 10 mg furano (NMR).

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

(Cambios de disolvente: del inicio hasta la fr. 52 con éter de petróleo, y el resto éter de petróleo-éter etílico 8-2.)

El peso seco era de 19 mg. El espectro NMR demostró que la muestra de 10 mg era nakafurano-9, mientras que el resto no pudo ser identificado. Esto confirma, pues, el origen dietético del nakafurano-9 en *H. villafranca*.

Como ya hemos comentado, Ortea (com. pers.) observó que ejemplares de esta especie del Cantábrico se alimentaban de *D. fragilis*, como *H. cantabrica*, y que los juveniles de ambas especies se desarrollan sobre la esponja.

Para confirmar esta relación depredador-presa se propuso el diseño de experimentos con un tubo Y. Un experimento inicial con un animal de Blanes y un fragmento de *D. fragilis*, dió resultado positivo al acercarse el animal al tubo conteniendo la esponja y, al menos aparentemente, mordisquearla. Sin embargo, este resultado único no es suficiente para concluir nada.

Se realizó otro experimento en una placa de Petri, colocando al mismo animal con varias esponjas (*Pleraplysilla spinifera*, *Dysidea fragilis*, *D. avara*) y otros (*Cystodites dellechiajei*). El resultado fue que el nudibranquio estuvo durante más de 5 minutos sobre *D. fragilis*, y a partir del minuto 15 se le vió en movimiento por la placa, sin detenerse en ningún otro sustrato.

Un hecho concluyente es la observación directa en acuario del ejemplar de Blanes comiendo *D. fragilis*. Esta relación depredador-presa no había sido

propuesta hasta Avila *et al.* (1990b), y fue recogida posteriormente por Avila *et al.* (1991b).

Función.

Los resultados de los tests realizados con las sustancias mencionadas han sido ya expuestos en la Tabla 5.8. para *H. cantabrica* (apartado 5.1.3.2.). Se asume que la función en *H. villafranca* es similar o igual a la descrita para *H. cantabrica*.

5.4.3.3. Resumen conclusivo.

A modo de resumen podemos decir que tanto la longifolina como los demás furanos se localizan en MDFs y glándula digestiva. Esto último, junto con la observación directa, apoyan su origen dietético a partir de la especie *D. fragilis* (u otras similares).

H. villafranca presenta longifolina y nakafurano-9 en el Mediterráneo, mientras que en el Cantábrico presenta longifolina, tavacfurano, nakafurano-9, dendrolasina, agassizina, *ent*-furodysinina, *iso*-nakafurano-9 e *iso*-dehidrodendrolasina.