

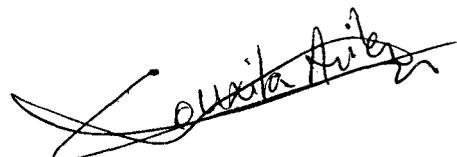
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL
FACULTAD DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

**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.

18 MARÇ 1993



12 1032

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.

Origen de los productos.

En uno de los primeros trabajos químicos sobre esta especie (Cimino *et al.*, 1982) se indicaba que se habían analizado varias esponjas (*Suberites domuncula*, *Ircinia* sp., *Spongia* sp.) recogidas en la misma zona que *D. limbata*, pero en ninguna de ellas se hallaron productos iguales o similares a los descritos para el nudibranquio. Estos autores sugirieron la posibilidad de que los metabolitos procediesen de una dieta sobre otros organismos, mencionando las algas, o bien que fuesen elaborados por el propio animal. La relación de depredación con la esponja *Suberites domuncula* (Riedl, 1976) fue descartada por razones químicas (Cimino *et al.*, 1980). Sin embargo, teniendo en cuenta la similitud de los compuestos de *D. limbata* con otros terpenoides de esponjas, estos autores sugerían que se alimentaba de una esponja no identificada. Fue en 1983 cuando Cimino *et al.* demostraron que el nudibranquio es capaz de sintetizar *de novo* estos terpenoides, ya que al inyectar precursores radioactivos, se formaban polygodial y ésteres marcados. Se sugirió que los ésteres debían ser el resultado de los mecanismos de detoxificación del polygodial, siendo los metabolitos normales de excreción. Esto se apoyaba, en parte, en el hecho de que estos autores creían que los ésteres se hallaban en el hepatopáncreas (analizaron todas las vísceras conjuntamente).

Cimino *et al.* (1985d) estudiaron la posibilidad de que los ésteres y el polygodial se sintetizaran en sitios diferentes por dos vías independientes, y demostraron que podía ser así. Sugirieron que el hecho de que se sintetizaran cantidades variables de estos productos según los animales utilizados (y la fecha de recolección) podía ser debido a un diferente estado de desarrollo de los animales y su necesidad, mayor o menor, de sustancias defensivas en un momento dado.

Los resultados aquí expuestos han permitido localizar con mayor precisión los metabolitos, concretamente el polygodial (resultado de la transformación de la olepupuana) en el borde del manto y los ésteres en la glándula hermafrodita y en la puesta. Por otro lado, la 7-deacetoxy-olepupuana se ha localizado en las branquias. Todos estos datos, y teniendo en cuenta todo lo explicado anteriormente, sugieren que hay una vía

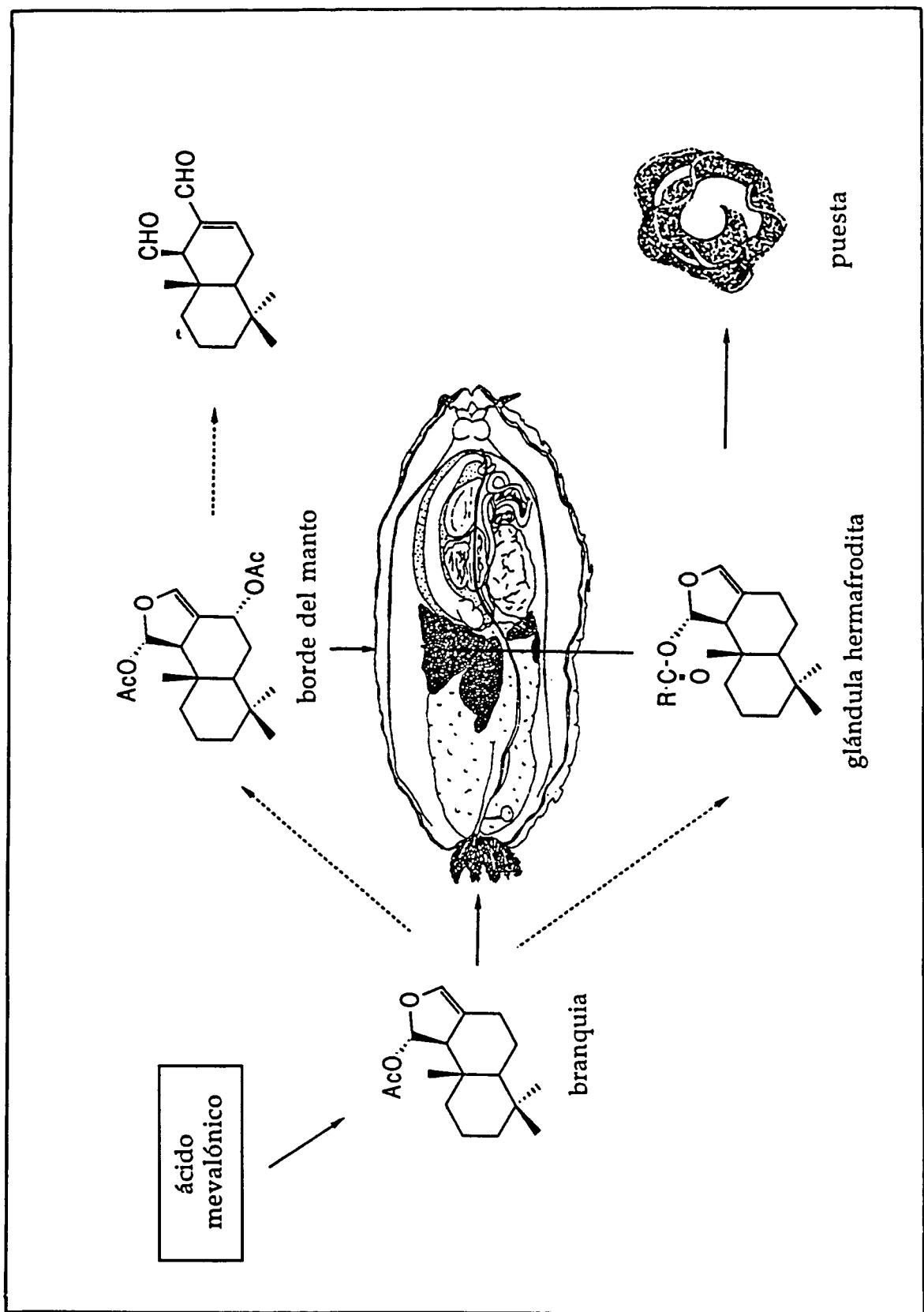


Figura 5.40. Distribución multifuncional de los sesquiterpenos en *D. limbata*.

biosintética dominante (a partir del ácido mevalónico), mediante la cual se forman compuestos estructuralmente relacionados, los cuales se localizan en diferentes órganos del animal y desarrollan diferentes funciones biológicas (ver Figura 5.40.). La 7-deacetoxy-olepupuana, como ya hemos comentado anteriormente, podría ser el precursor de la olepupuana (y el polygodial). Esto vendría apoyado por la presencia en los ejemplares juveniles de dicho producto.

Los ejemplares juveniles obtenidos en cultivo fueron sometidos a un experimento con detrito algal, explicado anteriormente (ver Figura 5.37.), del cual no puede descartarse la posibilidad de que *D. limbata* sea capaz de alimentarse de detritos y/o microorganismos. Otra posibilidad es que pueda alimentarse de esto y de esponjas a la vez.

Función.

La actividad de algunos de los metabolitos de *D. limbata* fue ya descrita por Cimino y sus colaboradores. En 1982, Cimino *et al.*, mencionaban que el polygodial era fuertemente repelente para *Chromis chromis* y *Carassius auratus* a una concentración de 30 µg/cm², mientras que los ésteres resultaron inactivos. La toxicidad del polygodial para el propio nudibranquio fue determinada por Cimino *et al.* en 1985c. En trabajos posteriores (Cimino *et al.*, 1987d; Caprioli *et al.*, 1987) se analizó la actividad del polygodial en relación a su estructura química. Por su parte, la olepupuana presentaría una actividad repelente similar a la del polygodial (Okuda *et al.*, 1983), aunque según Cimino *et al.* (1988b) esto podría ser debido a su transformación en polygodial *in situ*. La 6-β-acetoxy-olepupuana es repelente a 40 µg/cm² (Cimino *et al.*, 1985d).

La función de los ésteres drimánicos, al localizarse éstos en la glándula hermafrodita y en la puesta de *D. limbata*, parece relacionada claramente con la reproducción. El diferente estado de madurez de los ejemplares explicaría los resultados obtenidos por Cimino *et al.* (1985d), ya que en los ejemplares inmaduros no hay ésteres drimánicos, al no haberse desarrollado la glándula

hermafrodita. Según esto, se sintetizaría una mayor cantidad de oleopupuana/polygodial o ésteres en función del estado fisiológico del animal, y de la importancia relativa de las funciones defensiva o reproductora en un momento determinado.

Tratando de averiguar la función que en el ecosistema pueden tener estas sustancias, se han realizado algunos tests de forma similar a lo expuesto para otras especies. En la Figura 5.41. se pueden observar los resultados del test con embriones de erizos. Se probó el polygodial (de un extracto del borde del manto de un ejemplar, con algo de oleopupuana sin transformar) y la mezcla de ésteres (obtenida a partir de una puesta) a concentraciones de 20 y 40 ug/ml en ambos casos. Puede verse claramente que el polygodial tiene un fuerte efecto en la formación de las larvas pluteus, ya que estas no se forman en ningún caso. En la mayor concentración puede notarse también un efecto negativo sobre pregástrulas y gástrulas. En cuanto a los ésteres, se observa que se forman larvas pluteus en el caso de mayor concentración, y en cambio no se forman en el menos concentrado; sin embargo, hasta la fase de gástrula los dos casos eran similares. Esto podría deberse a algún error metodológico.

En cuanto a los experimentos de depredación, se ofrecieron tres ejemplares de *D. limbata* vivos a tres cangrejos (*Dardanus arrosor*). Los cangrejos advirtieron rápidamente la presencia de los moluscos en el acuario, ya que los tres cogieron inmediatamente al nudibranquio y lo retuvieron con sus pinzas. Uno de ellos fue comido en parte, ya que el cangrejo, usando sus pinzas, consiguió desgarrar el manto; las partes comidas fueron la glándula digestiva y algunos fragmentos del aparato reproductor anterior. Al cabo de tres horas, el cangrejo había dejado (a modo de disección) el manto, el pie, la glándula ptialina y la glándula hermafrodita. El segundo cangrejo mordió únicamente el pie del nudibranquio, que al cabo de 6 horas seguía vivo. El tercer cangrejo mordió al molusco en el borde del manto, pero tampoco se lo comió.

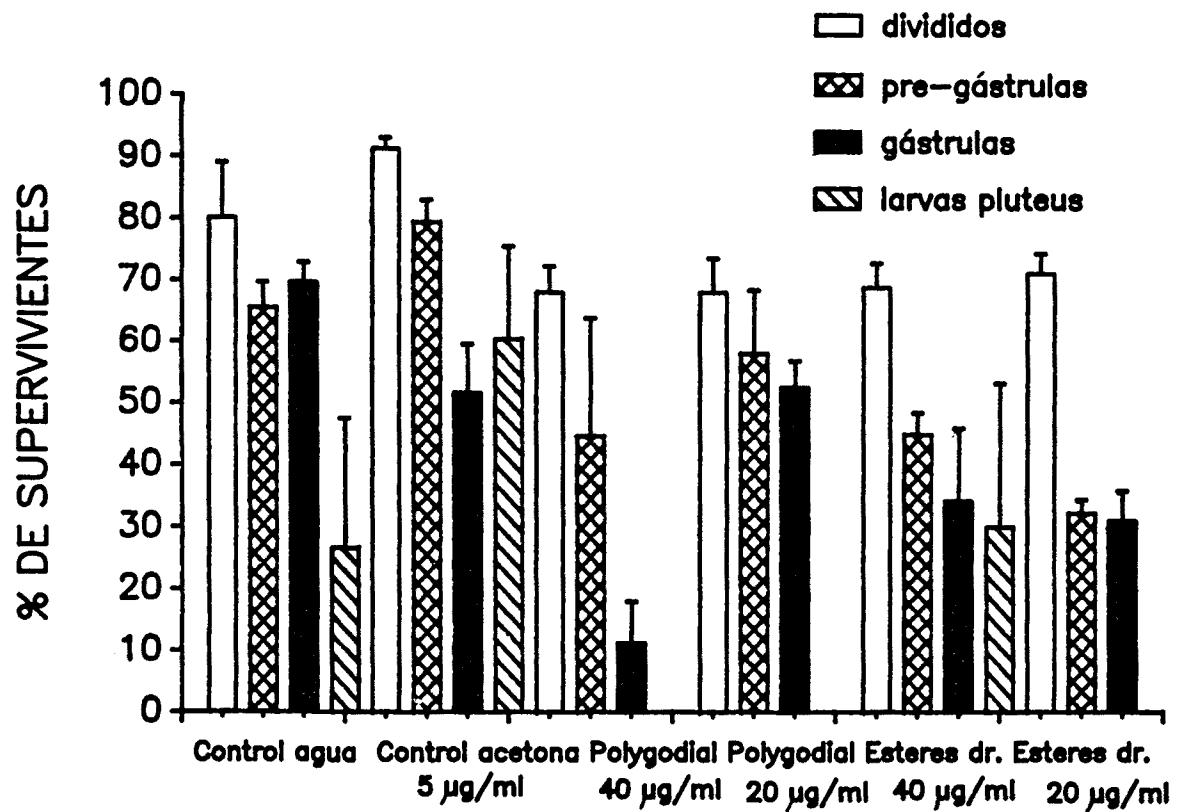


Figura 5.41. Efecto de los metabolitos de *D. limbata* en el desarrollo de los embriones del erizo *P. lividus*.

En otro experimento, se ofrecieron trozos de calamar con extractos inyectados a 9 cangrejos (uno solo con acetona y otro sin nada). El fragmento de calamar no tratado fue comido (3/4 partes), al igual que el fragmento con acetona (1/2). Los trozos con extractos de la glándula hermafrodita, branquias (2 réplicas), puesta y borde del manto fueron probados por los cangrejos, pero ninguno de ellos fue comido en más de 1/4. Una de las réplicas con extracto del borde del manto y otra de la puesta no fueron ni siquiera probadas por el cangrejo.

Otro experimento similar fue realizado con 8 cangrejos a los que se les ofreció una parte de un ejemplar previamente disecado. El hepatopáncreas, la glándula ptialina, las branquias (no totalmente) y el resto de vísceras fueron

comidas inmediatamente por los cangrejos. La glándula hermafrodita fue comida, pero el cangrejo tardó unos 20 minutos en comérsela. El manto y pie (ofrecidos conjuntamente) recibieron algún mordisco, pero el cangrejo no se los comió. La puesta fue mordida pero no comida. Estos cangrejos seguían vivos 24 horas después del experimento.

Tras todos estos experimentos nos parece claro que *Dardanus arrosor* es capaz de alimentarse de ejemplares vivos de *D. limbata* a los que mata por desgarro, detectándose sin embargo una preferencia por las zonas del cuerpo que no poseen oleopupuana/polygodial ni ésteres. El borde del manto y la puesta no son comidos por los cangrejos, y otros fragmentos como las branquias y la glándula hermafrodita no siempre son comidos.

A 5 cangrejos se les inyectó un extracto acetónico de distintas partes de *D. limbata* (excepto uno usado de control, al cual se inyectó únicamente acetona). Los extractos eran del borde del manto, branquias, glándula hermafrodita y puesta. Ninguno de los cangrejos dió muestras de sufrimiento, y al cabo de 24 horas seguían todos vivos.

Los experimentos con el cefalaspídeo *Aglaja tricolorata* dieron resultados negativos, ya que ambos ejemplares rechazaron los fragmentos de calamar con extracto del borde del manto de *D. limbata* y con los ésteres de la puesta (a 30 y 40 ug respectivamente), pero rechazaron también los controles sin nada y con acetona, en todos los casos. Algo similar sucedió con la anémona *Aiptasia mutabilis*, que rechazó los fragmentos de calamar con los extractos ya mencionados, comiendo únicamente una de las réplicas del calamar sin tratar.

Se realizó también el experimento con cuerdas y trozos de calamar, obteniéndose los resultados que se exponen en la Tabla 5.77., que, como en el caso de *D. verrucosa*, no nos parecen significativos.

Número de mordiscos por réplica (4)				
calamar sin nada	0	0	0	1
con acetona	2	0	0	2
con extracto del borde del manto (30 µg)	0	0	0	1
con ésteres de la puesta (40 µg)	2	0	0	0

Tabla 5.77. Resultados del experimento de cuerdas con calamar.

A continuación se realizó el experimento de cuerdas con trozos del poliqueto *Marpysa sanguinea*, y se obtuvieron los resultados que se detallan en la Tabla 5.78. De estos resultados parece deducirse que el extracto del borde del manto (que contenía polygodial y algo de oleopupuana) tiene un efecto negativo sobre la depredación del gusano por parte de los peces, mientras que no se observa un efecto claro de los ésteres.

Réplicas	1	2	3	4
gusano sin nada	-	+	+	-
con acetona	-	+	+	-
con extracto del borde del manto (40 µg)	-	-	*	*
con ésteres de la puesta (40 µg)	+	-	*	-

--= no comido; += comido; *= mordido pero no comido.

Tabla 5.78. Resultados del experimento de cuerdas con *M. sanguinea*.

5.14.3.3. Resumen conclusivo.

D. limbata presenta potentes sustancias de defensa situadas específicamente en el borde del manto, y ésteres drimánicos localizados en la glándula hermafrodita y en las puestas, así como 7-deacetoxy-oleopupuana en las branquias. Estos compuestos se originan mediante vías independientes y desarrollan funciones distintas, si bien la 7-deacetoxy-oleopupuana podría ser

el precursor de la olepupuana y el polygodial (que a su vez sería el resultado de la transformación de la olepupuana). Los metabolitos de *D. limbata* se han hallado en los ejemplares de las distintas poblaciones analizadas.

Además de la actividad repelente anteriormente descrita para el polygodial este tiene efectos sobre el desarrollo de los embriones del erizo *P. lividus*, y es repelente para el cangrejo *D. arrosor*, así como lo son los ésteres. La olepupuana podría localizarse, en el epitelio del borde del manto, en las células macrovacuoladas.

La función de la secreción mucosa, al no contener alomonas defensivas, quedaría reducida a aspectos mecánicos, ya que normalmente no contiene polygodial, aunque en caso de contacto con la superficie del borde del manto podría favorecer su distribución.

Esta estrategia defensiva basada en la biosíntesis de terpenos drimáticos es una de las defensas más sofisticadas elaboradas por un gasterópodo marino. El estudio de *D. limbata* ha revelado un extraordinario paralelismo con organismos vegetales que utilizan el mismo sistema para protegerse del ataque de algunos insectos. Hay que señalar que el polygodial presenta una analogía estructural con el scalaradial, ya que ambos presentan el mismo grupo funcional (1,4-dialdehidos conjugados), si bien debido a las mayores dimensiones del scalaradial, éste presenta diferente actividad biológica, a pesar de que la reactividad química es la misma.

5.15. *Dendrodoris grandiflora* (Rapp, 1827).

5.15.1. Introducción.

5.15.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.

?*Doris guttata*.- Risso (1826).

Doris grandiflora.- Rapp (1827); Delle Chiaje (1841); Cantraine (1841).

Doriopsis grandiflora.- Bergh (1880); Oliveira (1895); Nobre (1932); Fez (1974).

Doriopsis limbata.- Odhner (1932); Fez (1974).

Dendrodoris limbata.- White (1955).

Dendrodoris longula.- Pruvot-Fol (1951, 1953).

Dendrodoris pseudorubra.- Pruvot-Fol (1951).

Dendrodoris temarana.- Pruvot-Fol (1953).

Dendrodoris grandiflora.- Pruvot-Fol (1954); Haefelfinger (1960); Swennen (1961); Schmekel (1968b); Barash y Danin (1971); Nordsieck (1972); Ros (1975, 1985); Templado (1982, 1983 y 1984); Ballesteros (1980, 1981); Barletta (1980); Pereira (1980); Cimino *et al.* (1980b, 1985d); Altimira *et al.* (1981); Schmekel y Portmann (1982); García (1982 y 1984); Luque (1983, 1984 y 1986); Huelín y Ros (1984); Ros y Gili (1985); Ballesteros *et al.* (1986a); Marín y Ros (1987); Cervera (1988); Cattaneo *et al.* (1990); Avila *et al.* (1991a); Valdés *et al.* (1992 y *en acept.*).

5.15.1.2. Breve descripción y características de la especie.

El color general del cuerpo es muy variable, aunque la mayoría de los ejemplares presentan un color de fondo claro, con manchas oscuras de color marrón o negro. El borde del manto es amplio y estriado. Los rinóforos son oscuros con el ápice blanco, al igual que las branquias. Los juveniles son rojizos o amarillentos, sin manchas.

5.15.1.3. Referencias comentadas.

Morfológicas o descriptivas.

La gran variación cromática que se observa en esta especie, junto a su amplia distribución, han causado numerosos errores de identificación (Odhner, 1932; Pruvot-Fol, 1951, 1953; White, 1955; Fez, 1974). Una descripción detallada se puede hallar en Schmekel y Portmann (1982), y en Valdés *et al.* (1992 y *en acept.*).

Ecológicas.

Ros (1978b) cita esta especie en biocenosis de sustratos duros de la zona circalitoral (coralígeno). Y en el mismo trabajo lo incluye en el grupo de régimen alimenticio zoófago: micrófago (ramoneador, suctor): de esponjas, sin citar ninguna posible especie presa. Una revisión sobre los hábitats en que se ha hallado se puede encontrar en Luque (1984).

Químicas.

Cimino *et al.* (1980b) hallaron fasciculatina en *D. grandiflora*, un metabolito aislado previamente de la esponja *Ircinia fasciculata* (Cafieri *et al.*, 1972), sugiriendo una relación depredador-presa.

Por otro lado, Cimino *et al.* (1985d) encontraron polygodial y 6-β-acetoxy-olepupuana en la parte externa, y en las vísceras hallaron: microcionina-1, -2, -3 y -4, fasciculatina, los mismos ésteres drimánicos descritos para *D. limbata*, y además una mezcla de cromanoles prenilados, un derivado de la furospingina-1 y un furanoterpeno C-21. Experimentos de biosíntesis radiactiva demostraron que polygodial, 6-β-acetoxy-olepupuana y los ésteres eran fabricados por el propio animal, mientras que el resto de productos de las vísceras eran de origen dietético a partir de esponjas varias (Cimino *et al.*, *op cit.*). Posteriormente, Cimino *et al.* (1988b) sugirieron que la

oleopupuana podía ser la forma protegida del polygodial en el animal, al igual que en *D. limbata*.

5.15.2. Material estudiado.

Los datos del material estudiado se detallan en la Tabla 5.79.

LOCALIDAD	FECHA	(1)	(2)	(3)
Cubelles	18-5-87	4	0.5m	anat
	22-6-87	8	0.5m	m+anat
	6-7-87	4	0.5m	m+anat
	19-7-87	2	0.5m	m+anat
	26-7-87	1	0.5m	anat
	9-8-87	2	0.5m	m+anat
	11-1-89	1	0.5m	quím
	17-1-89	10	0.5m	quím
	10-8-91	8	0.5m	exp
	8-3-89	9	4m	quím+anat
Miseno	27-3-89	1	4m	anat
	14-4-89	2	4m	quím
	21-4-89	1	5m	quím
	19-5-89	9	4m	quím
	23-5-89	3	7m	quím
	26-5-89	2	4m	quím
	TOTAL	67		
(1) = Número de individuos.				
(2) = Profundidad.				
(3) = Utilización del material (quím= química, anat=anatomía interna).				

Tabla 5.79. Datos de los ejemplares capturados.

Se recogieron dos puestas con los ejemplares de Miseno de Mayo-89 y tres puestas en Marzo-90, y se obtuvieron otras en acuario. También se obtuvieron abundantes puestas de los ejemplares de Cubelles en Agosto-91. En el lugar de captura, paredes esciáfilas, había gran cantidad de esponjas (*Spongia*, *Ircinia*, *Cacospongia*, *Dysidea*,...). Estos datos amplían el hábitat

descrito por Ros (1978a), y que hemos mencionado anteriormente. Los ejemplares de Cubelles se hallaban a escasa profundidad (0-1 m) y bajo piedras con poco recubrimiento o prácticamente peladas.

5.15.3. Resultados y discusión.

5.15.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

Esquemas anatómicos.

En la Figura 5.42. se observa la morfología externa y la anatomía interna de esta especie. Se midieron algunos ejemplares, que presentaron una longitud máxima de 11 cm, 8 cm y 7 cm. Se contaron 7 hojas branquiales, de las cuales las posteriores eran bi o tripinnadas.

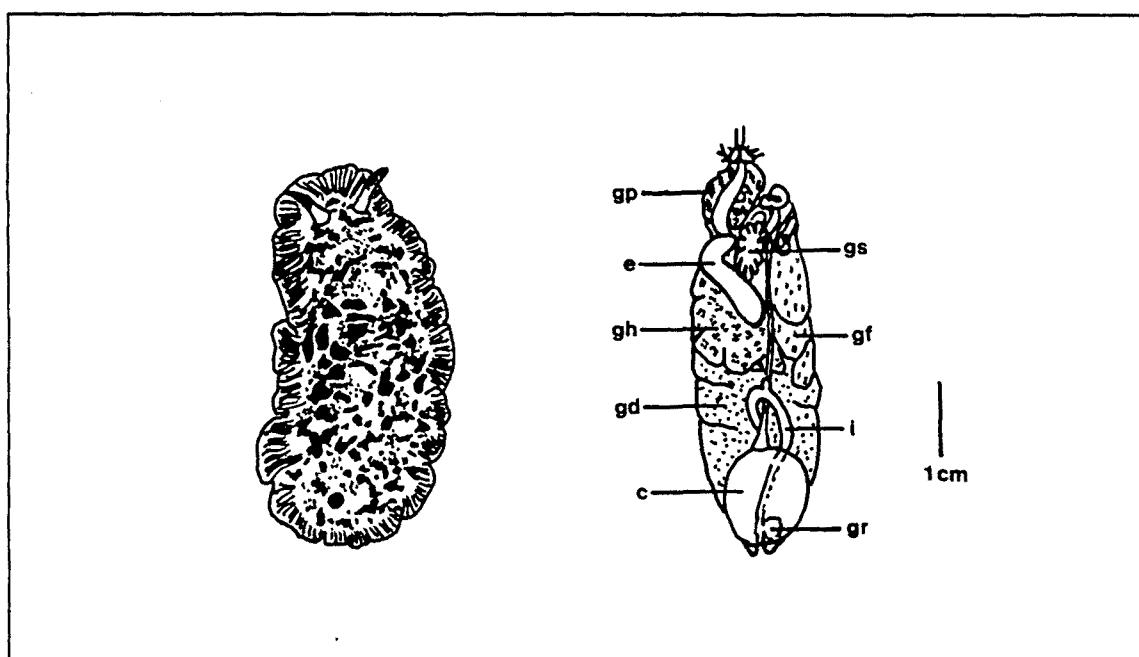
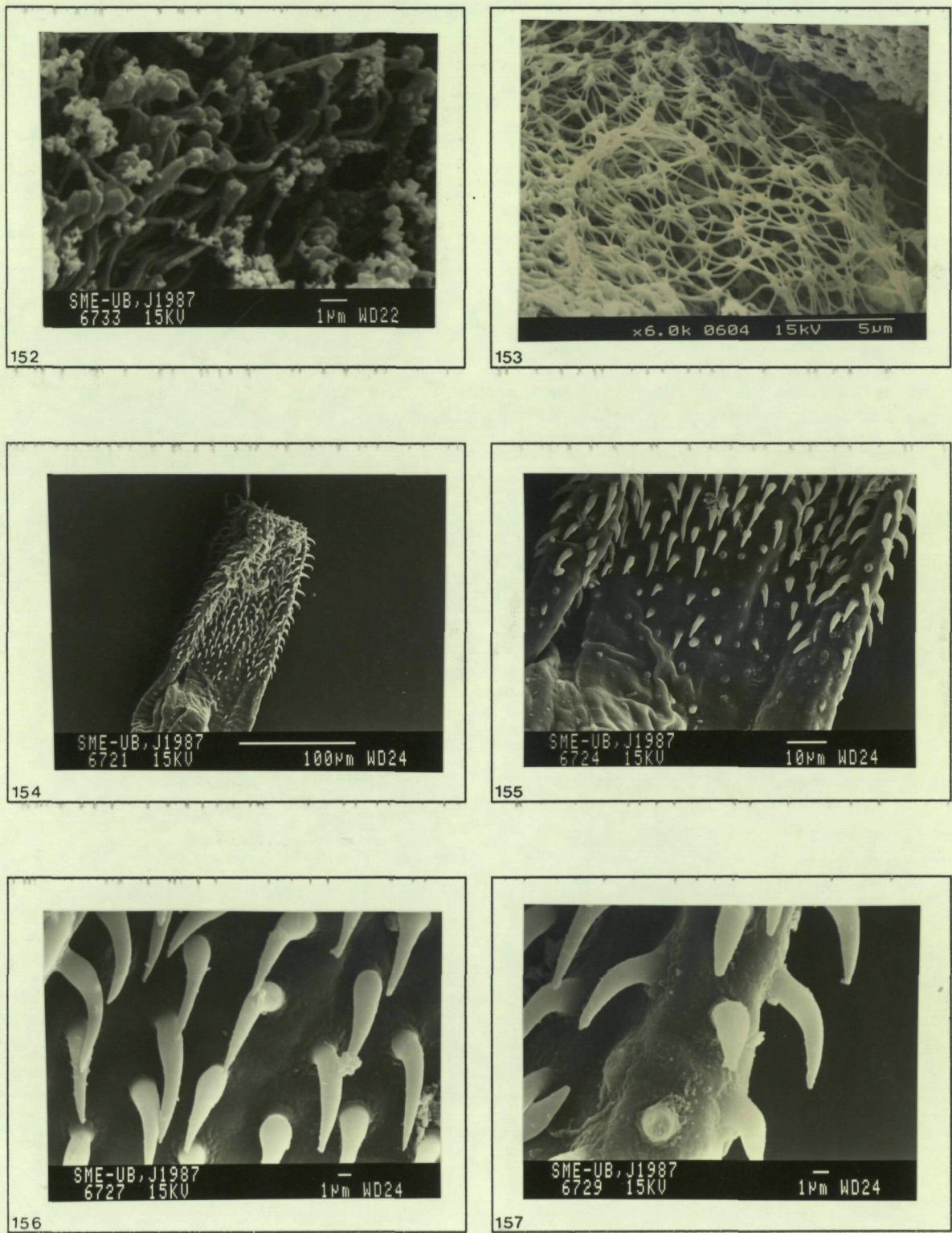


Figura 5.42. Morfología externa y anatomía interna de *D. grandiflora* (de Schmekel y Portmann, 1982, y Valdés *et al.*, 1992, respectivamente). (gp= glándula ptialina; e= esófago; gh= glándula hermafrodita; gd= glándula digestiva; c= corazón; gs= glándula sanguínea; gf= glándula femenina; i= intestino; gr= glándula rectal).

Dendrodoris grandiflora



Otras características de la especie.

Se realizó un estudio al microscopio electrónico de barrido del manto (diversas zonas), pie, rinóforos y branquias. En la fotografía 152 se pueden observar con detalle los cilios de los rinóforos, que se ensanchan en su zona apical. En la fotografía 153 se aprecia la magnitud y complejidad de la red mucosa que recubre el borde del manto.

Debido a la gran variabilidad externa de las especies del género *Dendrodoris*, ha sido necesario el estudio de otros caracteres con valor taxonómico. Entre estos hemos destacado la importancia de las espinas peniales. En las fotografías 154 a 157 se pueden ver dichas espinas de un ejemplar procedente de Cubelles (19-VII-87). Puede observarse como cambia la morfología según su situación, siendo más curvadas en la parte basal y más alargadas en la parte distal. Se han estudiado también al microscopio óptico las espinas peniales de otros ejemplares de Cubelles, con idéntica morfología. De esta forma, ha podido observarse que en la zona más distal del pene las espinas se convierten en tachuelas con una espina muy pequeña. Esto no se observa en las fotografías de microscopía de barrido debido a que no estaba completamente evaginado.

En esta especie no se han efectuado estudios de microscopía electrónica de transmisión, ni de desarrollo de las puestas. La puesta es una espiral de color amarillo claro o blanquecina. Los huevos miden unas 80 µm, y las cápsulas unas 160 µm de media.

5.15.3.2. Análisis químico.

Productos obtenidos; Estructura.

Ejemplares de Cubelles. Los primeros datos cualitativos obtenidos confirmaron que estos ejemplares presentaban el mismo patrón que los de Miseno, es decir, presentaban polygodial. Además se detectaba la presencia de olepupuana y de euryfurano. El análisis detallado de un ejemplar disecado indicaba la presencia de polygodial en el manto (tanto en la zona anterior,

como laterales y posterior), así como en el extracto de la secreción mucosa, y su ausencia en rinóforos, branquia y pie. El estado de los animales y su escasez no permitieron análisis posteriores.

Ejemplares de Miseno. Varios ejemplares fueron sometidos a estudios cualitativos para localizar los metabolitos en las distintas partes del cuerpo del animal. La observación de las placas cromatográficas (en benceno-éter etílico 9-1 y otros disolventes) indicaba que el polygodial se hallaba en los extractos del borde del manto (y un poco en el borde del pie), mientras que en la glándula digestiva se localizaban los productos de origen dietético y en la glándula hermafrodita se hallaban los ésteres drimánicos. En la glándula sanguínea se detectó un producto interesante (rf 0.4 en benceno-éter etílico 8-2) que no pudo ser aislado debido a su escasa cantidad.

En la Tabla 5.80. se resumen los datos obtenidos analizando cuantitativamente 14 ejemplares y 3 puestas, expresados como cantidad por animal.

	Peso seco	extr. acetónico	extr. etéreo
Branquias	23.0	5.4	1.7
Borde del manto	141.0	48.9	2.3
Resto del manto	781.1	152.6	2.6
Glándula ptialina	12.5	3.3	-
Glándula hermafrodita	54.3	14.3	6.0
Glándula digestiva	293.1	80.0	58.9
Resto de vísceras	224.7	95.0	27.7
Puestas	220.9	41.0	5.0

Todos los valores son mg/animal o mg/puesta.

Tabla 5.80. Análisis químico de 14 ejemplares de *D. grandiflora* procedentes de Miseno.

Del estudio cromatográfico detallado de estos extractos se deduce que, además de la distribución de metabolitos ya descrita y expuesta en la Tabla 5.81., se detecta en el extracto de las branquias un producto similar (sobre placa) al hallado en las branquias de *D. limbata* (7-deacetoxy-oleopupuana), y

un segundo producto (rf 0.4 en benceno-éter etílico 95-5). Además del polygodial, en el borde del manto y del pie aparecía olepupuana. Otra diferencia respecto a *D. limbata* es la presencia de dos productos en el extracto de la puesta.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Borde del manto	++	+			
Borde del pie	+	+			
Branquias			+		
Glándula hermafrodita				+++	+
Puestas				+++	+
(1)= polygodial; (2)= olepupuana; (3)= 7-deacetoxy-olepupuana; (4)= ésteres drimánicos; (5)= euryfurano.					
+= presente; ++= abundante; +++= muy abundante. La ausencia se indica sin signos.					

Tabla 5.81. Localización de los sesquiterpenoides drimánicos en *D. grandiflora*.

En el extracto de las secreciones mucosas no se detectaron productos de interés.

Productos de las branquias. El extracto etéreo de las branquias se cargó en una columna (pasteurina) con sílice, para intentar separar los dos productos de interés. El disolvente empleado fue éter de petróleo-éter etílico 98:2. Se obtuvieron las fracciones siguientes:

fr. 11-16: producto de rf superior, <1 mg.
fr. 17-27: producto de rf inferior, 3 mg.

El espectro ¹H-NMR de la fracción 17-27 (ver Figura 5.43.) coincidía con el de la 7-deacetoxy-olepupuane descrita en *D. limbata*. El espectro de la otra fracción no pudo ser identificado ya que era poco producto.

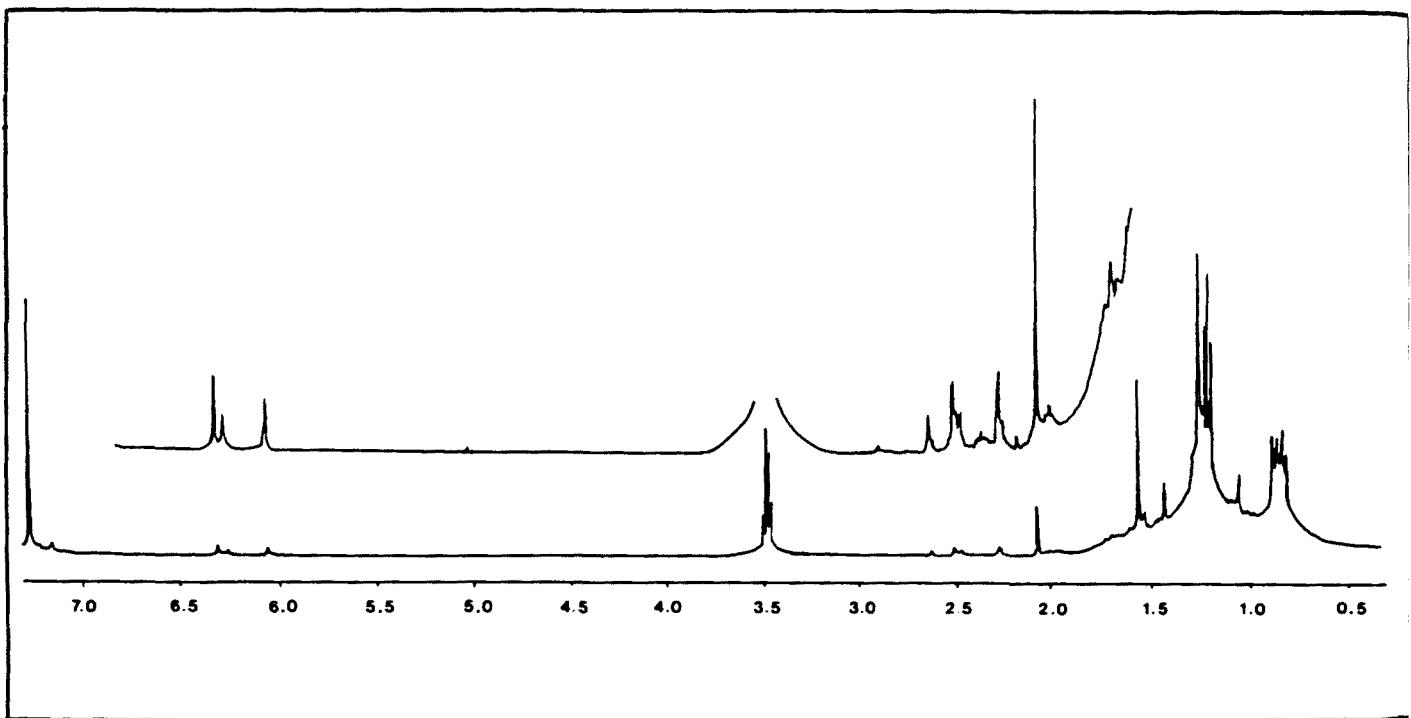


Figura 5.43. Espectro ^1H -NMR de la fracción 17-27 del extracto de las branquias de *D. grandiflora*.

Productos de la puesta. Mediante una columna como la utilizada para separar los productos de las branquias, se obtuvieron las fracciones siguientes del extracto de las puestas:

fr. 7-14: 1 mg.
fr. 21-29: <1 mg.

La fracción 7-14 contenía el producto común a *D. limbata*, es decir los ésteres drimánicos, tal y como reveló el estudio NMR de la misma (el espectro se expone en la Figura 5.44.). La fracción 21-29 fue analizada también mediante NMR pero no pudo ser identificada debido a la escasez de producto.

Las fórmulas de los productos mencionados han sido expuestas en la Figura 5.38. para *D. limbata*.

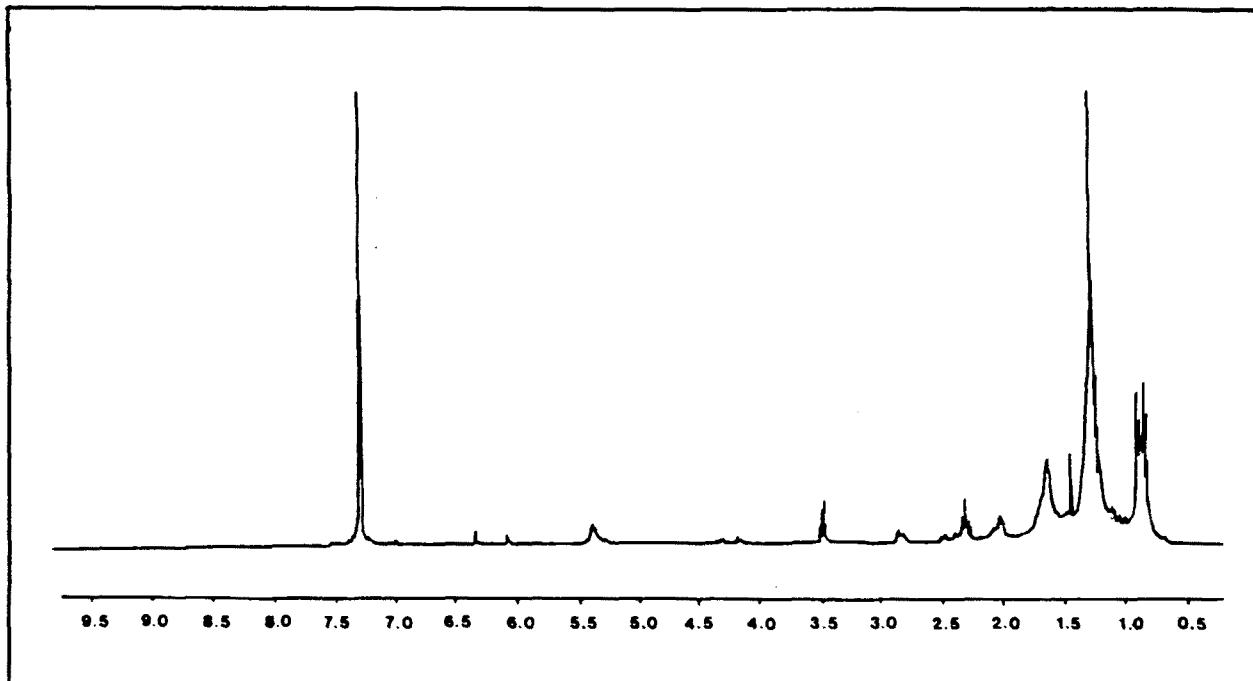


Figura 5.44. Espectro ^1H -NMR de la fracción 7-14 del extracto de las puestas de *D. grandiflora*.

Productos del resto de vísceras. Los productos del aparato digestivo anterior y reproductor se separaron mediante una columna de sílice, usando como disolvente éter de petróleo-éter etílico 99:1, hasta llegar a 1:1 al final de la columna. De entre las distintas fracciones obtenidas, destacaremos solamente la fracción 4-9 (4 mg) de la que su espectro NMR recordaba la pallescensina de *Dysidea pallescens* (Cimino *et al.*, 1975d, e, f), si bien se necesitarán otros análisis (espectrometría de masa) para confirmarlo. Lógicamente se supone que este producto se hallaba en el aparato digestivo anterior y procedía de la dieta. En cambio, se detectaron en las fracciones 45-49 posibles ésteres drimánicos, que se supone procederían del aparato reproductor anterior. Del resto de productos aislados se obtuvieron también los espectros NMR pero no pudieron ser identificados.

Esteroles del manto. De dos ejemplares de Miseno (8-III-89) se obtuvieron 58 y 91 mg respectivamente de extracto acetónico del manto. Se separaron los esteroles mediante una placa preparativa (2 mm de espesor) en benceno-éter etílico 8:2, rascando la zona en la que se encuentra el colesterol (que se puso al lado y se reveló con sulfato de cerio). Se extrajo la sílice repetidas veces con pequeños volúmenes de éter etílico sobre un filtro poroso (de 17 um de diámetro). Se evaporaron los disolventes y se pesaron 4 y 5 mg de esteroles respectivamente. Se acetilaron con anhidrida acética (1-2 gotas)

y 0.5 ml de piridina durante toda una noche a temperatura ambiente. Tras algunas placas cromatográficas de comprobación, se purificaron con una placa semipreparativa de grosor normal, rascando la zona indicada por la referencia puesta al lado (y revelada con sulfato de cerio). Trituramos esta sílice y la pusimos en una pipeta Pasteur, haciendo pasar éter de petróleo y después éter etílico. Tras evaporar el disolvente se pesó 1 mg de cada animal respectivamente. Se realizó cromatografía de gas, combinada con espectrometría de masa (GC-MS). La gráfica obtenida era muy similar a la de *D. limbata*, con una diferencia, y es que parece ser que un producto, el colesta-5,24-dien-3-ol acetato (3.β) se encuentra exclusivamente en esta especie (no aparece en *D.limbata*). Esto sugiere que el análisis de los esteroles del manto se podría utilizar, si se confirma este patrón con otros ejemplares en un futuro próximo, como un marcador específico.

Esteroles de las vísceras. Se procesaron las vísceras de los dos ejemplares anteriores del mismo modo descrito para los extractos del manto. Los extractos acetónicos pesaron 15 y 32 mg respectivamente. Las placas de comprobación en éter de petróleo-éter etílico 1:1 (reveladas con Ehrlich y sulfato) indicaron la presencia de ircininas (identificadas mediante TLC). Los 15 mg se separaron en una placa semipreparativa, mientras que para los 32 mg se usaron dos placas como la anterior. Se obtuvieron 3 mg de esteroles de cada muestra. Se acetilaron como ya se ha descrito, y a continuación se purificaron, pesando al final 1.5 mg cada una de las muestras. El estudio de GC de estas muestras, debido a la presencia de esteroles procedentes de la dieta, mostraba bastantes diferencias entre esta especie y *D. limbata*.

Secreción externa. El pH fue medido en ejemplares vivos de Cubelles resultando ser neutro (7).

Origen de los productos.

El origen dietético de algunos de los productos de las vísceras fue ya sugerido por Cimino *et al.* (1985d). Concretamente las microcioninas habían sido aisladas (Cimino *et al.*, 1975a) de la esponja *Microciona toxystila*, mientras que la fasciculatina se había hallado en 1972 (Cafieri *et al.*) en la

esponja *Ircinia fasciculata*. Por otro lado, la posible presencia de pallescensina también indicaría su origen dietético, al haber sido descrita en la esponja *Dysidea pallescens* (Cimino *et al.*, 1975d, e, f).

Junto a los ejemplares de Miseno se observó abundante *Spongia officinalis*. Los ejemplares de Cubelles se recogieron en las proximidades de la esponja *Hymeniacidon sanguinea* sobre algas calcáreas. Para tratar de averiguar si existía una cierta predilección por alguna esponja en particular, se realizaron experimentos con el tubo Y y ejemplares de Cubelles. Se utilizaron 2 ejemplares en 8 intentos. De éstos, el 62.5% de las veces se dirigieron hacia un sustrato calcáreo con incrustaciones de la esponja *Hymeniacidon sanguinea*, el 25% hacia *Spongia officinalis*, y el 12.5% hacia *Dysidea avara* (aplicando una X^2 , estos valores son significativamente distintos de lo esperado por azar). Además se observó en acuario como estos ejemplares, y otros procedentes de la misma localidad, se alimentaban sobre el sustrato calcáreo con *Hymeniacidon sanguinea*.

Por otro lado, el polygodial y los ésteres drimánicos son biosintetizados por el nudibranquio (Cimino *et al.*, 1985d). Debido a que los metabolitos son los mismos, consideramos válido para *D. grandiflora* todo lo dicho para *D. limbata* sobre la biosíntesis y en relación a la localización de los distintos metabolitos en diferentes partes del cuerpo del molusco (ver Figura 5.40.).

Función.

Como en el apartado anterior, al tratarse de los mismos metabolitos descritos para *D. limbata*, y para no repetirlo, consideramos que lo dicho es válido para ambas especies, así como los tests efectuados con extractos del borde del manto y con los ésteres de las puestas.

Añadiremos solamente que se realizó un test de toxicidad para *Gambusia affinis* con la 7-deacetoxy-olepupuana obtenida del extracto de las branquias (3 mg). Este test dió resultado negativo, no pareciendo afectar para nada a la actividad normal de los peces. El test de repelencia no pudo realizarse debido a la escasez del producto.

Cabe señalar además que los furanoterpenos de origen dietético podrían tener también efectos tóxicos o repelentes (Cimino *et al.*, 1985d), pero al hallarse exclusivamente en el aparato digestivo, no se considera que puedan desempeñar algún papel en la defensa del nudibranquio.

5.15.3.3. Resumen conclusivo.

D. grandiflora, como *D. limbata*, presenta una serie de sesquiterpenoides drimánicos localizados específicamente en algunas zonas del cuerpo. Concretamente olepupuana y polygodial se localizan en el borde del manto (y algo en el borde del pie), mientras que la 7-deacetoxy-olepupuana se localiza en las branquias (junto a un segundo producto no identificado), y los ésteres en la glándula hermafrodita y puestas (junto a otro producto no identificado). Esta situación podría ser similar a la expuesta para *D. limbata*. La 7-deacetoxy-olepupuana podría ser el precursor de la olepupuana y el polygodial, mientras que los ésteres se originan por una vía independiente.

La actividad de algunos de estos compuestos, además de su repelencia para el pez *C. auratus*, se amplía por lo expuesto para *D. limbata*, a otros efectos sobre el desarrollo de los embriones del erizo *P. lividus*, y a la repelencia para el pagúrido *D. arrosor*.

Esta estrategia defensiva se basa en la biosíntesis de terpenos drimánicos, con potentes efectos repelentes, siendo una de las defensas más sofisticadas elaboradas por un gasterópodo marino. Además, en *D. grandiflora* se detectan en su glándula digestiva una serie de terpenos de origen dietético que nos proporcionan información acerca de sus presas (*Ircinia fasciculata*, *Microciona toxystila*,...).

5.16. *Doriopsilla areolata* Bergh, 1880.

5.16.1. Introducción.

5.16.1.1. Referencias bibliográficas generales en el área de estudio. Sinonimias.

Doriopsilla areolata.- Bergh (1880); Oliveira (1895); Nobre (1932); Pruvot-Fol (1951, 1953, 1954); Ballesteros y Ortea (1980); García (1982); Urgorri y Besteiro (1983); Luque (1983 y 1986); Cervera y García (1986); Templado *et al.* (1986); Templado *et al.* (1987).

?*Doriopsilla fedalae*.- Pruvot-Fol (1953).

5.16.1.2. Breve descripción y características de la especie.

Tomando como referencia el trabajo de Ballesteros y Ortea (1980), diremos que esta especie se caracteriza por presentar un manto muy espiculoso (con las espículas formando celdillas típicas), con pigmentación blanca en el dorso formando un reticulado que rodea los tubérculos, y como el resto de especies europeas del género por: ausencia de glándula ptialina, ganglios bucales inmediatamente detrás de los cerebroides y ano a la izquierda de la branquia.

5.16.1.3. Referencias comentadas.

Morfológicas o descriptivas.

Hay poca bibliografía disponible sobre *D. areolata*. Hemos mencionado ya el trabajo de Ballesteros y Ortea (1980), en el cual la describieron con detalle. Otros trabajos se remontan a Pruvot-Fol (1951 y 1954). Más recientemente García *et al.* (1986) realizaron un amplio estudio sobre las espículas del manto de esta especie.

Ecológicas.

En Ballesteros y Ortea (1980) se describe un movimiento ondulatorio del borde del manto en los ejemplares jóvenes, al cual dichos autores dieron un significado advertidor frente a posibles enemigos (asociado con una secreción ácida que comentaremos más adelante).

Ros (1978a) citó únicamente la especie *D. pusilla*, dando datos sobre su hábitat y posible alimentación. La coloración de la especie *D. rarispinosa* fue considerada críptica por Perrone (1986). Sin embargo, no hemos hallado en la bibliografía consultada ninguna referencia a la ecología de *D. areolata*.

Hasta la fecha no se había realizado ningún trabajo sobre los productos químicos de esta especie.

5.16.2. Material estudiado.

Se resumen los datos en la Tabla 5.82.

LOCALIDAD	FECHA	NUMERO	PROFUND.	USO
Cubelles	Abril 89	1	0.2 m	quím
Las Llanas	Julio 89	2	IT	quím
Alborán	13-7-89	1	IM	quím
Santander	27-3-90	6	IT	quím
Blanes	Oct.-90	8	AR	quím
	6-5-91	6	AR	quím
	28-8-91	25	AR	quím
	19-3-92	1	AR	quím+m
Algeciras	Jul./Ago.-91	12	IM	quím
TOTAL		62		
IT= Intermareal; AR= Arrastre; IM= Inmersión. quím= química, m= microscopía.				

Tabla 5.82. Datos de los ejemplares de *D. areolata* capturados.

Los ejemplares de Blanes (Mayo-1991) realizaron una puesta en acuario. Estos ejemplares se obtuvieron de arrastres realizados entre 20 y 80 m de profundidad (no nos ha sido posible obtener datos más precisos), en su mayoría procedentes del caladero de La Planassa. Se recogieron varias esponjas junto a los nudibranquios. Esta es la primera cita de *D. areolata* para el litoral catalán.

5.16.3. Resultados y discusión.

5.16.3.1. Datos morfológicos de los ejemplares capturados.

Esquemas anatómicos.

La morfología externa de nuestros ejemplares coincide con la descripción citada anteriormente. Un esquema de la misma se puede ver en la Figura 5.45.

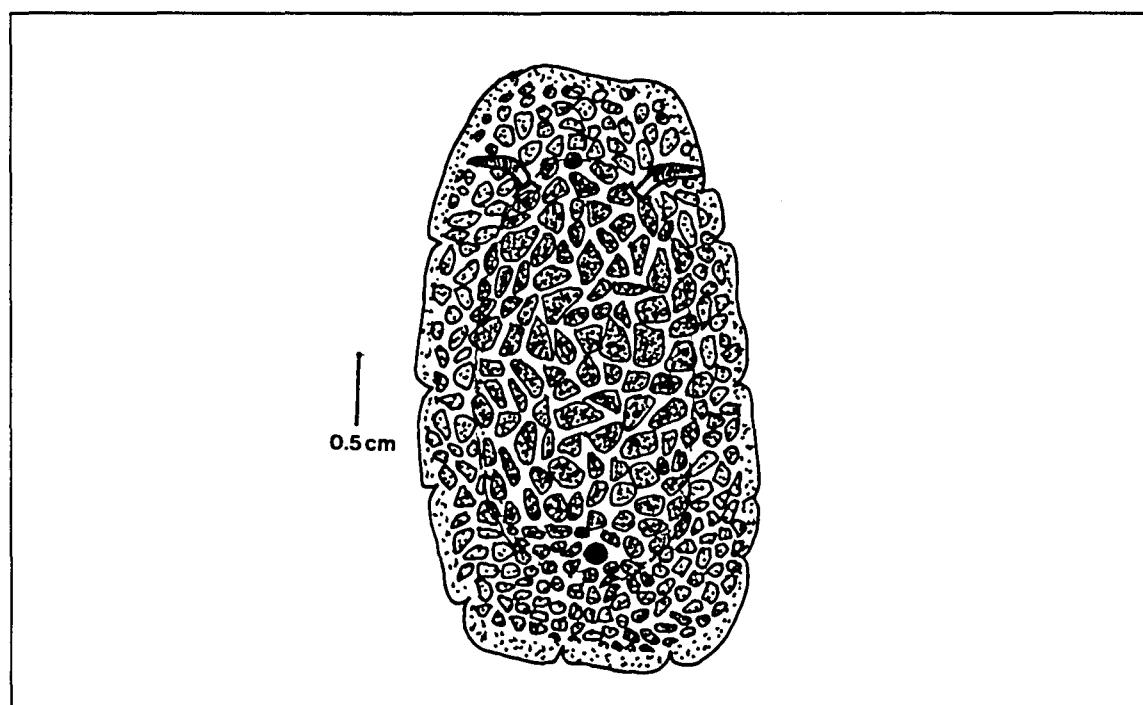


Figura 5.45. Morfología externa de *D. areolata* (modificada de Ballesteros y Ortea, 1980).

En cuanto al tamaño de nuestros ejemplares, diremos que los ejemplares de Asturias medían 1.5 y 1.8 cm respectivamente. Los ejemplares de Santander medían entre 2 y 3.5 cm. Se midieron algunos ejemplares de Algeciras: 0.8, 1, 1, 1.7 y 3 cm, y el resto entre 1 y 2 cm. Un ejemplar de Blanes midió 2.7 cm, mientras que el resto de ejemplares medían de 1 a 3 cm de longitud máxima.

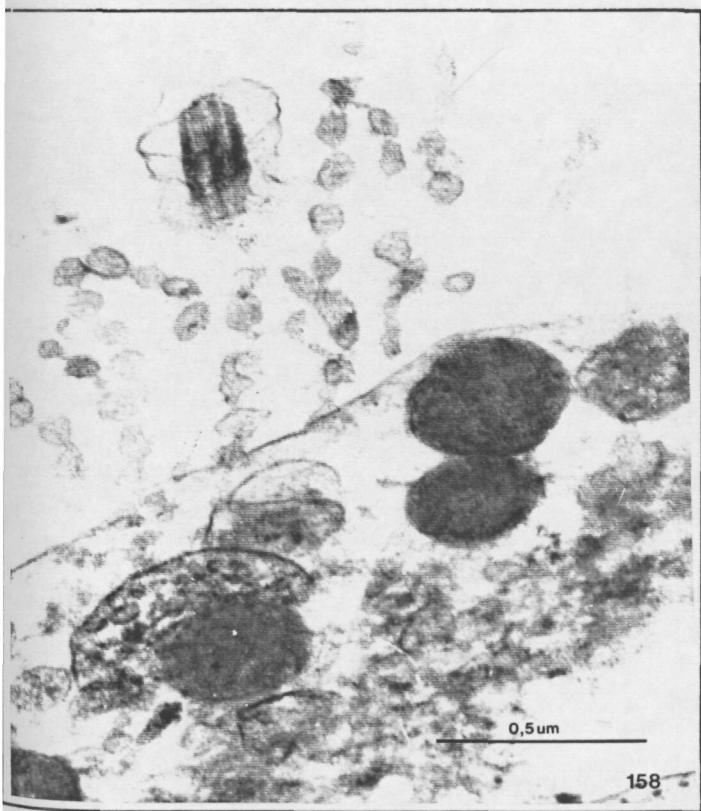
Nuestros ejemplares presentaban la típica coloración amarilla con reticulado blanco, a excepción de dos ejemplares de Santander que tenían una coloración naranja.

Características del manto.

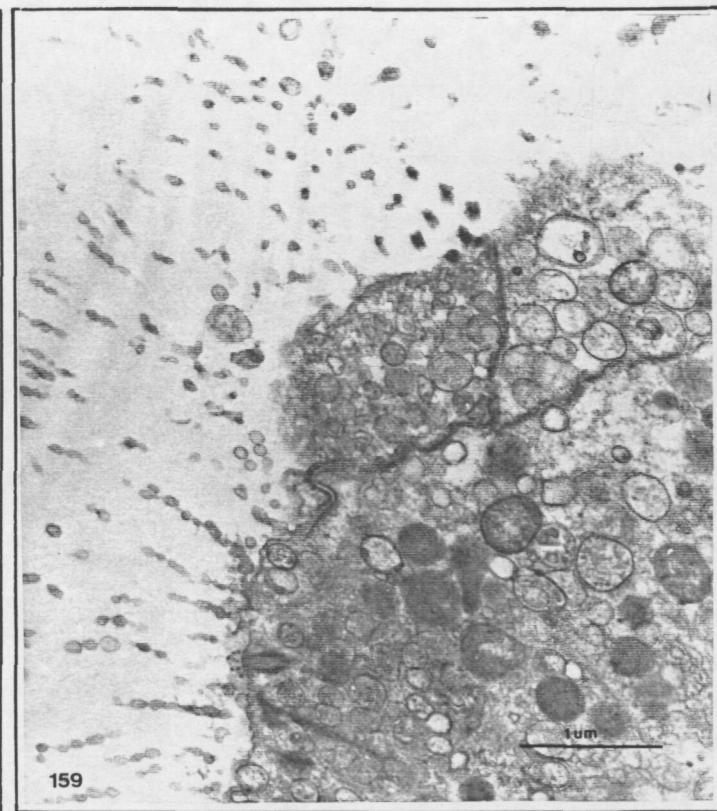
Se realizó un estudio microscópico de algunos fragmentos del borde del manto de un ejemplar de Blanes (1992). El estudio de los cortes semifinos al microscopio óptico mostraba la presencia de un epitelio similar al descrito para *D. limbata*, con la presencia de espículas que no sobresalen, sino que se hallan bajo el epitelio. En las fotografías (158 y 159) se observan algunos detalles al microscopio electrónico. En el epitelio aparecen numerosas y grandes vesículas de secreción mucosa. Hay células ciliadas y células con microvilli, que presentan morfología arrosariada (ver fotografía 158).

Desarrollo embrionario y larvario.

La puesta, coincidiendo con la descripción de Ballesteros y Ortea (1980), es una cinta de color blanquecino claro, estrecha y enrollada en espiral plana, de unos 2 cm de diámetro y unos 3 mm de altura. Esta puesta, que fue hecha por un ejemplar el día posterior a su captura, pesaba 500 mg de peso húmedo. Se cultivó en dos recipientes (la mitad en cada uno), tal y como se describe en el apartado de metodología pero no se obtuvieron las larvas, que según el trabajo antes mencionado, salen a los 13-14 días. Un fragmento se congeló para su análisis químico.



158



159

Al cabo de 10 días el tamaño medio de embriones y cápsulas resultó ser de 103.3 μm y 243 μm respectivamente. Se detectó un ligero crecimiento de los embriones hasta las 163.3 μm de media al cabo de 14 días, en que se observaron larvas veliger ya bien formadas dentro de las cápsulas, en los dos cultivos. En los días siguientes se observó un decrecimiento de larvas y embriones y su posterior degeneración.

5.16.3.2. Análisis químico.

Productos obtenidos: Estructura.

Ejemplar de Cubelles. Las vísceras y el resto del cuerpo fueron extraídos con acetona separadamente. En las placas cromatográficas, realizadas con diversos disolventes, se observó la posible presencia de oleopupuane en el extracto de la parte externa, y otro producto tipo 4-colestén-3-one en el extracto de las vísceras. El producto tipo 4-colestén-3-one estaba también presente, aunque muy ligeramente, en el extracto de la parte externa. En este extracto se detectó un tercer producto de rf intermedio entre los dos anteriores (en benceno-éter etílico 9-1). A rf 0.8 con el mismo disolvente y también en el extracto de la parte externa, aparecía un producto similar (sobre placa) al de las branquias de *D. limbata*. Al frente de la placa, en el extracto de las vísceras, aparecían otros productos similares (sobre placa) a los hallados en la glándula hermafrodita de *D. limbata* (ésteres drimánicos). Los datos cuantitativos obtenidos de la extracción se exponen en la Tabla 5.83.

Se utilizó posteriormente el extracto del manto para, junto a los extractos de otros ejemplares, intentar obtener una mayor cantidad del producto que interesaba separar (como se verá más adelante).

	Extracto acetónico	Peso seco
Ejemplar de Cubelles:		
vísceras	0.7 mg	1.9 mg
parte externa	2.1 mg	42.3 mg
Ejemplares de Las Llanas:		
vísceras	1 mg	6 mg
parte externa	6 mg	72.7 mg

Tabla 5.83. Análisis químico de los ejemplares de Cubelles (1 ejemplar) y Las Llanas (media de 2 ejemplares).

Ejemplares asturianos. Dos ejemplares se disecaron separadamente obteniéndose los resultados indicados en la Tabla 5.83. Las placas cromatográficas, realizadas en benceno-éter etílico 9-1, parecían mostrar solamente el producto tipo 4-colestén-3-one, que además aparecía en todos los extractos (posiblemente debido a su mala conservación). Se observaba también el posible producto de las branquias en los extractos de la parte externa. Sucesivas repeticiones de las placas, aumentando las concentraciones, mostraron mucho más claramente los posibles productos similares a los del reproductor y las branquias de *D. limbata*. La cantidad de dichos productos no era suficiente como para realizar posteriores análisis.

Ejemplares de Santander. Dos ejemplares se analizaron disecados en diversas partes, tal y como se expone en la Tabla 5.84.

	(1)	Extr. acetónico	Peso seco
borde amarillo del manto	2	11.8	58.3
resto del manto	1	2.3	129.8
resto del manto	1	12.0	75.0
pie	2	6.3	60.4
glándulas digestiva y hermafro.	2	13.8	18.8
resto de vísceras	2	12.7	16.3
branquias	1	1.3	<0.5

(1) = Número de ejemplares.

Tabla 5.84. Análisis químico de dos ejemplares de Santander.

Como se ha podido observar, la mayoría de los extractos se hicieron uniendo los dos animales. Las placas en hexano-acetato de etilo 8-2 con polygodial auténtico como referencia nos mostraron claramente que ésta sustancia no aparecía en los extractos de *D. areolata*. El único producto que se hallaba en las placas a esa altura era el compuesto tipo 4-colestén-3-one (varias placas en éter de petróleo-éter etílico 1-1 con 4-colestén-3-one auténtico como referencia así lo demostraron). Aparecía, sin embargo, como en los animales analizados con anterioridad, un producto que reaccionaba con Ehrlich, similar al de la branquia de *D. limbata*, en todos los extractos de la parte externa de los ejemplares de Santander, incluyendo el extracto de las branquias de un ejemplar. También se veía con claridad el producto Ehrlich positivo, tipo olepupuana, aunque no parecía ser exactamente igual al compararla sobre placa. Este producto tipo olepupuana se detectaba en los extractos de la parte externa del animal y en el extracto etéreo de la secreción mucosa (<0.1 mg de 4 ejemplares).

Se hicieron algunas placas bidimensionales para observar si el producto tipo olepupuana se transformaba en polygodial. Se usó benceno-éter etílico 9-1, en ambos sentidos, y el resultado fue negativo. De esto se deduce que este producto, si bien es similar sobre placa, no es olepupuana.

En el frente de las mismas placas cromatográficas, aparecían los productos Ehrlich positivo, tipo ésteres de *D. limbata*. Estos productos se detectaron en los extractos del borde del manto, glándula digestiva y hermafrodita, y extracto del resto de vísceras. Al repetir las placas en éter de petróleo-éter etílico 1-1 se observó que los posibles ésteres aparecían también en los otros extractos de la parte externa, y en el mucus, tal vez debido a una mala conservación del material.

Se repitieron las placas en el disolvente arriba mencionado, y se concluyó que en *D. areolata* de Santander hay un producto bajo el compuesto tipo 4-colestén-3-one, posiblemente relacionado con la olepupuana (pero no igual), otro producto similar al de las branquias de *D. limbata* y otro producto probablemente relacionado con los ésteres. El patrón es, pues, el mismo que se observó en el ejemplar de Cubelles y en los ejemplares de Las Llanas.

Comparando en una placa cromatográfica, en el mismo disolvente, con los extractos auténticos de *D. limbata* se observó que los dos productos (el similar y el auténtico) de las branquias parecían ser idénticos sobre TLC. El producto tipo olepupuana del borde del manto de *D. areolata* no aparecía en los extractos de *D. limbata*. El polygodial y el producto tipo 4-colestén-3-one se situaban a la misma altura en este disolvente, siendo ello la causa de la confusión inicial.

Posteriormente se extrajeron con acetona otros tres ejemplares disecados (dos de coloración amarilla y uno de los dos animales naranjas). Los resultados obtenidos a partir de estos ejemplares fueron los que se detallan en la Tabla 5.85., obtenidos como media de los tres valores.

	Peso seco	Extr. acetónico
borde del manto	18.4	2.6
manto y pie	95.8	16.3
glándula digestiva	13.9	7.7
resto de vísceras	0.4	2.5
Todos los valores son mg/animal.		

Tabla 5.85. Análisis químico de tres ejemplares de Santander.

En la placa cromatográfica realizada en benceno-éter etílico 9-1 se observó que los mismos productos ya mencionados se distribuían según lo explicado anteriormente. Cabe destacar que en el borde del manto se localizaba el producto tipo olepupuana, tanto en los ejemplares amarillos como en el naranja. Los ésteres se observaron solamente en dos de los tres extractos de las glándulas digestivas, lo que podría indicar una variabilidad dependiente del estado de maduración de la glándula hermafrodita. En todos los extractos, excepto en los extractos del borde del manto, aparecía el compuesto tipo 4-colestén-3-one. Esto se comprobó con una referencia auténtica de 4-colestén-3-one. La cantidad de productos no era aún suficiente como para permitir otros análisis.

Secreciones externas y pH. En la secreción mucosa de los 4 ejemplares amarillos de Santander, recogida en vivo (y congelada inmediatamente), aparecieron tanto el producto tipo oleopupuana, como todos los demás productos mencionados: compuesto tipo 4-colestén-3-one, los ésteres y el posible producto de la branquia. El extracto etéreo de la secreción mucosa pesaba <0.1 mg. En cambio, en el extracto de la secreción mucosa de los 2 ejemplares naranjas (1.3 mg de extracto etéreo) apareció solamente el producto tipo oleopupuana.

El pH de uno de estos ejemplares recién muerto era 7, y el de un animal vivo también era 7. Esto no coincide con lo expuesto en el trabajo ya mencionado de Ballesteros y Ortea (1980), en el que se señalaba que presentaban secreción ácida al ser molestados.

Extracción de un ejemplar de Alborán. Con la intención de observar si presentaba los mismos productos que los ejemplares de las demás poblaciones analizadas, fue extraido entero el ejemplar. Se hicieron placas cromatográficas en los disolventes ya mencionados, y se vió que el patrón cualitativamente era idéntico a los anteriores.

Producto del borde del manto. Se unieron los extractos de los ejemplares de Santander, Cubelles y Alborán para obtener una mayor cantidad de producto. Se obtuvieron 13.3 mg brutos. Se hizo una columna cromatográfica de sílice en hexano-acetato de etilo 9-1, obteniéndose las fracciones siguientes:

fr. 5-7: producto tipo branquias (0.1 mg).
fr. 15-21: producto tipo oleopupuana más esteroles.

Para purificar el producto se realizó otra columna (pipeta Pasteur) con hexano (y después hexano-acetato de etilo 98-2 hasta 8-2). Se obtuvo el producto más limpio, según se vió en TLC, en las fracciones 24-28, pesando 0.7 mg. Se hicieron los espectros NMR en C₆D₆ de las fracciones 5-7 de la primera columna y 24-28 de la segunda. Los resultados no fueron esclarecedores ya que la cantidad de productos era mínima, lo que no permitió realizar más análisis.

Extracción de los esteroles. Para obtener los esteroles se analizaron separadamente la parte externa y las vísceras, con el objetivo de compararlas entre ellas según su procedencia, y con *Dendrodoris*. Se unieron los extractos del manto obtenidos anteriormente de los ejemplares asturianos. Se separaron mediante una columna (pipeta Pasteur) en éter de petróleo-éter etílico 98-2 y 8-2. El producto tipo 4-colestén-3-one se obtuvo en las fracciones 12-13, los esteroles en las fracciones 14-20, y los ácidos grasos en la descarga con eter etílico. Se conservaron para su estudio GC.

Del mismo modo se unieron los 2 extractos acetónicos de las vísceras de los 2 ejemplares asturianos, siendo unos 2 mg en total. Se hizo una placa analítica en benceno-éter etílico 8-2, y se rascó la zona de los esteroles en la sílice, introduciéndose esta seguidamente en una pipeta Pasteur. Se obtuvieron dos fracciones, una con éter de petróleo y otra con éter etílico, siendo esta última la que contenía los esteroles. Se conservaron para GC.

Ejemplares de Blanes y Algeciras. Se comparó un ejemplar de Blanes con uno de la Bahía de Algeciras y resultaron ser idénticos en el patrón de metabolitos y su distribución, (en las placas cromatográficas con los disolventes ya mencionados). Los resultados cuantitativos de este análisis preliminar se muestran en la Tabla 5.86.

	Extracto acetónico	Peso seco
Ejemplar de Blanes:		
borde del manto	3 mg	34.3 mg
resto del manto	2 mg	134 mg
vísceras	3 mg	26.7 mg
Ejemplar de Algeciras:		
borde del manto	1 mg	7 mg
resto del manto	1 mg	35.9 mg
vísceras	1 mg	9.4 mg

Tabla 5.86. Análisis comparativo de un ejemplar de Blanes y uno de Algeciras.

La única diferencia apreciable entre ambos fue la concentración de los metabolitos (ya que se realizaron placas calibradas), debido posiblemente al diferente estado de desarrollo y maduración de los ejemplares.

Tras ello, se extrajeron los 24 animales restantes de Blanes, separando en 14 de ellos vísceras y parte externa, y los otros 10 ejemplares enteros (por ser de menor tamaño y para no perder producto), y lo mismo para los de Algeciras (8 disecados y 3 enteros). Los datos cuantitativos se exponen en la Tabla 5.87.

(Número de ejemplares)	Extracto acetónico	Peso seco
Ejemplares de Blanes:		
vísceras (14)	72 mg	381.2 mg
parte externa (14) + enteros (10)	224 mg	2.436g
Ejemplares de Algeciras:		
vísceras (8)	108 mg	216.9 mg
parte externa (8) + enteros (3)	36 mg	911 mg

Tabla 5.87. Análisis químico de ejemplares de Blanes y Algeciras.

De los 8 ejemplares disecados de Algeciras, se observó que 4 presentaban la glándula hermafrodita bien desarrollada, mientras que los otros 4 eran inmaduros.

Un fragmento de la puesta de los ejemplares de Blanes, fue extraído con acetona, pero no se detectaron productos ya que la cantidad era insuficiente.

Para intentar separar el producto tipo oleopupuana se unieron los extractos acetónicos de la parte externa (y animales pequeños enteros) de todos estos ejemplares, y resultaron en 75 mg de extracto etéreo del total de 35 animales. Tras sucesivos y continuados intentos de separar el producto de interés mediante columnas cromatográficas (la primera con alumina y con cloroformo como disolvente; la segunda con sílice y cloroformo-hexano 7-3) y

placas varias (unas con nitrato de plata y otras normales, analíticas), se obtuvo 1 mg de producto limpio que fue preparado para NMR y espectrometría de masa. Sobre placa se veían otros dos productos asociados, también Ehrlich positivo, pero en cantidades mucho menores que el producto aislado.

En la primera columna (con alumina) realizada para separar el producto anterior, se obtuvieron 5 mg en la fr. 4-7 del producto similar al de las branquias de *D. limbata*. Se purificó mediante dos columnas consecutivas (en éter de petróleo la primera, y con éter de petróleo-éter etílico 98-2 hasta 1-1 la segunda), y se obtuvieron en la fr. 5-6 de la segunda columna, 10 mg de producto (peso aumentado por la presencia de sílice, debido a un error metodológico). Se realizó un espectro NMR de esta fracción, así como de la fr. 10-12 en la que había 1 mg de un producto de rf inferior (Ehrlich positivo, de color fucsia).

Mediante placas bidimensionales (con éter de petróleo-éter etílico 95-5 para la primera parte y, tras calentar la placa, éter de petróleo para la segunda), con una fracción de esta última columna conteniendo tres productos Ehrlich positivo (los dos aislados y un tercero), se observó que uno de ellos se transformaba en el producto de la fracción 10-16 de las vísceras (que se verá más adelante). Se confirmó que el producto tipo olepupuana no se transformaba, como ya se vió para los ejemplares de Santander.

Se hizo una comparación sobre placa de los productos separados con el extracto acetónico de la glándula hermafrodita y borde del manto de un *D. limbata*. En esta comparación se confirmó lo visto anteriormente con los ejemplares de Santander, es decir, que los productos tipo olepupuana y tipo branquias de *D. limbata* parecían ser diferentes, y en cambio los ésteres resultaban muy parecidos.

Análisis de las vísceras. Para separar los ésteres de las vísceras (presumiblemente de la glándula hermafrodita), se unieron ambos extractos y se realizó una columna cromatográfica con sílice (con éter de petróleo y posteriormente, éter de petróleo-éter etílico 98-2, hasta 1-1). Se obtuvieron 58 fracciones, de entre las cuales destacamos las siguientes:

fr. 5-7: producto rf superior, fucsia, 1 mg.
fr. 10-16: producto rf superior, lila, 1 mg.
fr. 26-29: mezcla de varios productos, 14 mg.
fr. 30-31: producto interesante, 3 mg.
fr. 32-33: producto interesante, 1 mg.
fr. 50-57: esteroles y otros, 44 mg.

Se realizaron espectros NMR de las fr. 5-7 y 26-29. Mediante una placa bidimensional como la mencionada arriba, se vió que los dos productos mencionados se transformaban ambos en un mismo producto. Cabe destacar que, como ya hemos dicho, el producto de la fr. 10-16 es igual, sobre placa, al que resulta de la transformación de uno de los productos similares al de la branquia de *D. limbata*.

El estudio químico de los productos citados en este apartado, tanto los del manto como los de las vísceras, está todavía en fase de análisis en el I.C.M.I.B., los espectros NMR realizados están en fase de estudio, y por ello no podemos dar más datos en cuanto a la estructura y características de estas moléculas.

Origen de los productos.

Se extrajeron con acetona 7 fragmentos de esponjas de diferentes especies recogidas de la misma muestra de arrastre en la que se capturaron los ejemplares de Blanes (28-VIII-91). El análisis químico de dichas esponjas no dió ningún resultado positivo, ya que ninguna de ellas parecía ser su presa al presentar un patrón de metabolitos completamente diferente, a juzgar por las placas cromatográficas.

Si el tipo de productos es, como parece ser, similar a los presentes en *D. limbata*, es razonable hipotetizar que su origen será igualmente mediante biosíntesis. No se descarta, sin embargo, la posibilidad de que alguno de los productos de las vísceras (glándula digestiva), tuviera su origen en alguna esponja presa (que por el momento no se ha hallado), de modo similar a lo descrito para *D. grandiflora*.

Función.

Al no haber sido todavía identificados los productos hallados en *D. areolata*, ni haberse hallado una cantidad suficiente de los mismos como para realizar tests de toxicidad, repelencia, etc., no se pueden dar datos sobre su función en el animal. Sin embargo, la localización de los metabolitos, de forma análoga a lo descrito para *D. limbata* y *D. grandiflora*, apoyaría una función defensiva para los metabolitos del borde del manto, y algún papel en la reproducción para los productos tipo éster, que presumiblemente se localizarían de manera exclusiva en la glándula hermafrodita.

5.16.3.3. Resumen conclusivo.

D. areolata presenta metabolitos no identificados localizados en el borde del manto (tipo olepupuana), resto del manto (tipo branquias de *D. limbata*), y en las vísceras (tipo ésteres de *D. limbata*). Si bien no poseemos datos sobre el origen y la función de estos productos, se supone que serán similares a los descritos para *Dendrodoris* spp. Es necesario destacar, sin embargo, que las cantidades de dichos productos parecen ser bastante inferiores a las halladas en *Dendrodoris* spp. Esto podría relacionarse con la presencia de una importante defensa mecánica en *D. areolata*, ausente en *Dendrodoris* spp, consistente en una gran cantidad de espículas en el manto, lo que les confiere una mayor dureza.

Hay que señalar que en ejemplares de *Doriopsilla* spp del Pacífico (ver apartado 6.) se han descrito, análogamente a *Dendrodoris* spp, ésteres drimáticos en las vísceras y olepupuana en la parte externa. No se ha citado, sin embargo, la presencia del polygodial, hecho sorprendente si consideramos la poca estabilidad de la olepupuana.

***. Conclusiones sobre los Doridáceos de los apartados 5.12. a 5.16.**

El estudio de *Doris verrucosa*, *Peltodoris atromaculata*, *Dendrodoris limbata*, *D. grandiflora* y *D. areolata* permite extraer algunas conclusiones generales. Se observa que algunos de ellos presentan defensas mecánicas (*D. verrucosa*, *P. atromaculata*, *D. areolata*) y defensas químicas (*D. verrucosa*, *D. limbata*, *D. grandiflora* y posiblemente *D. areolata*). Mientras *P. atromaculata* y *D. grandiflora* obtienen metabolitos de la dieta sobre esponjas, *D. verrucosa* y *Dendrodoris spp* presentan biosíntesis *de novo*. Se podría sugerir que estas y otras especies formasen una escala evolutiva, en la que lentamente se liberarían de las cargas más pesadas (concha, espículas, dieta estricta). Desde este punto de vista, *D. limbata* sería la especie más evolucionada, ya que es capaz de realizar *de novo* la síntesis multifuncional de moléculas orgánicas biológicamente activas.

5.17. Otros Opistobranquios estudiados.

Se incluyen a continuación y de forma muy breve, algunos de los resultados obtenidos con otras 39 especies de opistobranquios, que han sido en su mayoría escasos debido al pequeño número de ejemplares capturado o bien debido a la inexistencia de productos especialmente abundantes e interesantes desde el punto de vista químico. Algunas de estas especies se están estudiando actualmente o se han estudiado recientemente con mayor profundidad en el I.C.M.I.B.

Los datos sobre procedencia y número de ejemplares se han incluido en la Tabla 4.1. Los datos de peso seco y peso de los extractos obtenidos relativos a la mayoría de estas especies se han incluido en el Anexo 10.II.

5.17.1. Cefalaspídeos.

Se ha trabajado con ejemplares de las especies siguientes: *Scaphander lignarius*, *Philine aperta*, *Gastropteron meckeli*, *Philinopsis depicta*, *Aglaja tricolorata* y *Haminoea* spp. Las referencias a trabajos previos realizados con estas especies se pueden hallar en el apartado 6.9.

De entre los resultados obtenidos, los más destacables han sido el pH neutro de *Scaphander lignarius*, y ácido (1-2) en *Philine aperta* y la presencia de un compuesto tipo 4-colestén-3-one y pH neutro en *Gastropteron meckeli*. En *G. meckeli* se ha observado que no hay diferencias en el patrón de metabolitos entre ejemplares de Asturias y de Blanes, y además el producto tipo 4-colestén-3-one se localiza exclusivamente en la glándula digestiva. En el borde amarillo de los parápodos no aparecieron productos de interés, ni glándulas de secreción aparentes (tras el estudio de microscopía).

En las puestas de *Philinopsis depicta* no aparecieron productos de interés. Mediante disección y posterior extracción de un ejemplar, observamos que los productos derivados de la depredación en acuario sobre *Haminoea* sp se localizan exclusivamente en la glándula digestiva. El compuesto tipo 4-colestén-3-one fue detectado en el hepatopáncreas. Se confirmó mediante NMR la presencia en la glándula digestiva de la aglajne-1

(procedente de *Bulla striata*, ver referencias en el apartado 6.9.). Son de destacar varios productos interesantes localizados en el manto (especialmente rf 0.35 y 0.6, reactivos con sulfato, en éter de petróleo-éter etílico 1:1). La secreción mucosa no pareció presentar productos de interés.

Según Ros (1978a) *P. depicta* es "sedimentívoro?", y zoófago: macrófago (cazador): microcarnívoro". Podemos añadir a esto que, según nuestras observaciones en acuario y los resultados químicos, es también capaz de alimentarse de presas de tamaño considerable tales como *Bulla* y *Haminoea*.

Aglaja tricolorata presenta al menos tres productos de interés en el extracto del manto. Estos productos son fluorescentes (UV+), aunque no carbonizan en la placa. Estos productos no pudieron ser analizados en detalle debido a la escasez de material. La secreción mucosa presentaba un pH neutro y no se detectó en ella ningún metabolito interesante, ni tampoco en las vísceras. La aparente diferencia en los metabolitos secundarios entre *P. depicta* y *A. tricolorata* podría estar relacionada con una diferente estrategia defensiva de ambas especies.

El estudio de las puestas de *Haminoea* sp reveló la presencia de varios productos interesantes que están siendo estudiados en el I.C.M.I.B. *Haminoea solitaria* fue objeto de un estudio preliminar mediante TLC, en el que productos similares a otras especies de *Haminoea* parecían estar presentes; este estudio no pudo concluirse porque se extraviaron las muestras en el I.C.M.I.B.

5.17.2. Anaspídeos.

Se han capturado ejemplares de las especies: *Akera bullata* y *Aplysia fasciata*.

Se analizó un ejemplar de *Akera bullata*, observándose que presentaba un producto fluorescente interesante (rf 0.1 en éter de petróleo-éter etílico 1-1), presente en el animal y en su puesta. Un segundo producto de interés se hallaba exclusivamente en el animal (éter de petróleo-éter etílico 95:5, UV+,

rf 0.9). Otros dos compuestos de tipo piridínico (similares sobre placa al haminol) se detectaron en el animal y su puesta (rf 0.2 y 0.3, UV+, en éter de petróleo-éter etílico 3:7). En el catálogo del apartado 6.9. se pueden hallar otros datos sobre esta especie. *Akera bullata* se ha utilizado en experimentos de depredación, en los que ha sido devorada por *Pleurobranchaea meckeli* en pocos segundos.

Los ejemplares de *Aplysia fasciata* fueron analizados en el I.C.M.I.B., presentando el mismo patrón metabólico que los ejemplares de otras localidades (Martínez *et al.*, 1992).

5.17.3. Sacoglosos.

Se han estudiado las especies siguientes: *Oxynoe olivacea*, *Elysia viridis*, *Elysia timida* y *Thuridilla hopei*.

Oxynoe olivacea presenta un comportamiento defensivo que se basa en la emisión de un líquido repelente de color blanco y en la autotomía de la cola. El líquido blanco-lechoso contiene substancias tóxicas (oxitoxinas 1 y 2, ver referencias en el apartado 6.9.). La distribución de los productos defensivos en las distintas partes del animal, tras disección, resultó ser la siguiente: en la cola, parápodos y resto del pie aparecen los dos productos, mientras que ninguno de ellos se halló en las vísceras. El análisis de una puesta no reveló nada de interés. Las fórmulas de los compuestos de *O. olivacea* han sido expuestas en la Figura 7.1.

Elysia viridis presenta tres productos de interés (uno fluorescente, rf 0.2, otro a rf 0.7, y el tercero, fluorescente, a rf 0.9 en éter de petróleo-éter etílico). Tras extracción de 50 animales se obtuvieron 5 mg del producto más abundante (rf 0.2), que fue sometido a NMR, estudio UV, etc. El test de ictotoxicidad con *Gambusia affinis* dió resultado negativo. Un estudio químico más detallado de esta especie se está realizando en el I.C.M.I.B. Otros ejemplares procedentes de Miseno presentaron los dos productos fluorescentes como los anteriores (del lago Fusaro). Mediante disección en parte externa y vísceras, se observó que los productos fluorescentes parecían ser más abundantes en la parte externa. Además, mediante placas en éter de

petróleo-éter etílico 3:7, se observaron otros productos interesantes en el extracto de la parte externa de los animales.

Elysia timida presenta un producto fluorescente igual o similar al descrito para *E. viridis*, a rf 0.3 en el mismo disolvente, así como el producto de rf 0.7, pero no se detectó el producto de rf 0.9. Los ejemplares de Ischia y Ventotene presentaron idéntico patrón de metabolitos. Una comparación sobre placa con *Acetabularia acetabulum*, el alga que le sirve de alimento, mostró la ausencia del producto fluorescente en el alga, indicando que posiblemente este producto no es de origen dietético.

En la especie *Thuridilla hopei* se observó que en éter de petróleo-éter etílico 1:1 presentaba varios productos interesantes, especialmente 2 fluorescentes sobre los esteroles y uno reactivo con sulfato bajo los mismos. La puesta parecía presentar el mismo patrón metabólico. Los ejemplares de Miseno, Taranto, Formentera y Sicilia no presentaban diferencias cualitativas en sus metabolitos, aunque si cuantitativas. De los ejemplares de Taranto se aisló un producto más abundante (rf 0.5 en éter de petróleo-éter etílico 1:9), con el cual (4 mg) se iniciaron los estudios de NMR y HPLC (al parecer podrían ser dos compuestos isómeros) en el I.C.M.I.B. Este producto parecía ser más abundante en el borde amarillo-naranja de los parápodos, aunque esto debería ser confirmado mediante el estudio de un mayor número de ejemplares.

5.17.4. Notaspídeos.

Se han estudiado las especies siguientes: *Umbraculum mediterraneum*, *Pleurobranchus membranaceus*, *Berthella plumula*, *Berthella aurantiaca*, *Berthella stellata*, *Berthella ocellata* y *Pleurobranchaea meckeli*.

Se midió el pH externo de *Umbraculum mediterraneum*, resultando ser neutro (7), al igual que el de su secreción mucosa transparente (ver referencias sobre trabajos químicos en el apartado 6. 9.). *Pleurobranchus membranaceus*, en cambio, presentaba un pH entre 1 y 2, fuertemente acido, tanto en su parte externa como su secreción mucosa. El estudio químico de la secreción mucosa reveló la ausencia de productos de interés. *Berthella*

plumula, *B. aurantiaca*, *B. stellata* y *B. ocellata* presentaron todas secreción ácida (pH 1-2). La única especie sobre la que se pudieron efectuar estudios químicos preliminares fue *B. aurantiaca*, que presentaba productos interesantes (tipo purina?) en el extracto metanólico de las vísceras. No se observaron productos interesantes en la puesta ni en la secreción mucosa, mientras que otros productos poco abundantes se detectaron en los extractos metanólicos de la parte externa y las vísceras (rf 0.2, 0.4 y 0.8 en cloroformo-metanol 8:2).

Pleurobranchea meckeli presenta un pH por todo el cuerpo y en su secreción mucosa hialina entre 0 y 1, extremadamente ácido. Es necesario destacar que en las revisiones de Vayssiére (1901), Willan (1984, 1987) y Cattaneo (1986) no se mencionan las secreciones ácidas ni en esta ni en otras especies de pleurobrancáceos revisadas. Los estudios químicos preliminares llevados a cabo con ejemplares de esta especie, procedentes de Blanes, Massa Lubrense y Llavaneres, indicaron que en el extracto butanólico de las vísceras había ciertos productos de interés (tipo purina?, rf entre 0 y 0.5 en cloroformo-metanol 9:1, fluorescentes). En éter de petróleo-éter etílico 1:1 se observaron dos productos fluorescentes (rf 0.6 y 0.15) y un producto (rf 0.2) localizado en las vísceras (sin incluir la glándula digestiva). Estos productos no fueron posteriormente analizados debido a la escasez de material.

Aplicamos la técnica de Thompson (1983) número 4 con un ejemplar de *P. meckeli*, con el objetivo de averiguar si el ácido sulfúrico estaba presente en su secreción mucosa. Recogimos la secreción en contacto con el cuerpo del animal, tal y como se ha expuesto en el apartado de metodología. Punteamos en papel de filtro y calentamos la muestra. El punto más concentrado se quemó, mientras que los demás se ennegrecieron. Según Thompson (1983), los puntos negros indican la presencia de ácido sulfúrico (iones SO_4^{2-}), o sea que podemos decir que en *P. meckeli* se detectó la presencia de dicho ácido.

Por otro lado, *P. meckeli* ha sido empleada en algunos experimentos de depredación expuestos en los apartados anteriores. Cabe añadir a la lista de sus presas conocidas (eolidáceos y otros ejemplares de su misma especie), los que aquí se han observado: *Haminoea* spp y *Akera bullata*. *P. meckeli* es capaz de atacar con avidez ejemplares de otras especies que posteriormente

rechaza debido a sus defensas químicas, y puede además devorar rápidamente fragmentos de calamar de 1 cm².

Otro hecho a destacar sobre esta especie es su posible comportamiento deimático. Pudimos observar los movimientos de un ejemplar, cuando pretendíamos molestarlo en un pequeño recipiente para obtener una mayor cantidad de secreción mucosa. Al introducir el ejemplar en el acuario, se observó que se comportaba violentamente, mediante movimientos repetidos durante 5 minutos, con contorsiones laterales y dorso-ventrales simultáneamente. El ejemplar giraba el cuerpo lateralmente mientras tocaba con el extremo del pie el velo frontal una vez a cada lado. El resultado visible es que el color marrón oscuro del pie en la parte ventral se mueve violenta y rápidamente, con lo que podría "asustar" a posibles depredadores. A los 5 minutos cesó el movimiento, disminuyendo el ritmo del movimiento progresivamente. Se quedó sobre la arena con la parte ventral hacia arriba, mostrando el color marrón oscuro del pie. Tras algunos segundos se giró empezando por la cabeza, y posteriormente hasta el pie, y el color críptico marrón claro/blanco punteado le camufló otra vez sobre la arena.

5.17.5. Nudibranquios.

5.17.5.1. Doridáceos.

A) ANADORIDOIDEA.

Se han analizado las especies siguientes: *Trapania maculata*, *Diaphorodoris luteocincta*, *Diaphorodoris papillata*, *Limacia clavigera* y *Polycera quadrilineata*.

En la especie *Trapania maculata* se detectó la presencia de un producto tipo 4-colestén-3-one. *Diaphorodoris papillata* presenta un pH neutro en su parte externa y mucosidad. Se obtuvieron dos puestas de ejemplares de Tossa de Mar, y una de ejemplares de Blanes, en acuario y se intentó su cultivo, aunque los resultados fueron negativos. La escasez de material de *Diaphorodoris* spp impidió ver en el estudio cromatográfico si existían productos de interés.

Limacia clavigera no presentó en sucesivos análisis ninguna sustancia especialmente abundante. Se detectó la presencia de algunos productos fluorescentes (en éter etílico), y de un producto reactivo con diazo (amarillo, rf 0.95 en cloroformo-metanol 8:2). Quizás con un mayor número de ejemplares se podrían separar algunos de estos productos. Su pH externo resultó ser neutro. Se obtuvieron un par de puestas de los ejemplares de Tossa de Mar, que se cultivaron sin éxito.

La especie *Polycera quadrilineata* fue analizada cromatográficamente, hallándose un producto fluorescente interesante (rf 0.6 en éter de petróleo), que fue aislado en cantidad inferior a 1 mg (de 40 ejemplares), por lo que no pudieron realizarse posteriores estudios. Con 10 ejemplares de Taranto se realizó un análisis cromatográfico tras disección en: vísceras, manto y pie, y protuberancias dorsales y cefálicas. El resultado fue que no se observó ningún producto especialmente concentrado en ninguna de dichas secciones. Esta especie presenta glándulas subepidérmicas de tipo no mucoso (Thompson, 1960b). Creemos que estas glándulas podrían acumular alguna sustancia que en estos análisis no ha sido detectada, o bien que podrían no tener relación con la defensa. En este último caso, podríamos hipotetizar que esta fuera una especie mimeta batesiano de otras especies de coloración similar, junto a las que formaría los círculos aposemáticos descritos por Ros (1976b).

B) EUDORIDOIDEA.

Se han estudiado las especies: *Hypselodoris bilineata*, *Hypselodoris pinna*, *Archidoris tuberculata*, *Austrodoris kerguelensis*, *Discodoris rosii* y *Platydoris argo*.

Estos ejemplares de la especie *Hypselodoris bilineata* constituyen la primera cita de esta especie en el Mediterráneo catalán y la más septentrional de la costa este de la Península Ibérica. Esta especie presenta MDFs, habiéndose citado los números de 7-8 posteriores (García, 1984), o bien 2-5 posteriores y 0-3 anteriores (Ortea y García, *en prensa*). Las fórmulas radulares de dos de nuestros ejemplares son las siguientes: 42x(50-0-50) y 34x(52-0-52), valores algo inferiores a los citados por Ortea y García

(*en prensa*), posiblemente debidos al pequeño tamaño de nuestros ejemplares (5 mm y 8 mm respectivamente). Siguiendo el crecimiento de uno de nuestros ejemplares en acuario, observamos que la línea central amarilla, inicialmente bifurcada a la altura de los rinóforos, se iba separando al crecer el animal hasta convertirse en dos líneas dorsales separadas de rinóforos a branquias.

Los ejemplares de *Hypselodoris pinna* fueron analizados químicamente, pero debido a su conservación en alcohol, los resultados fueron negativos, ya que los productos estaban alterados. Se contabilizaron de 3 a 5 MDFs posteriores. Se inició el estudio de las MDFs al microscópico óptico y electrónico pero los resultados fueron negativos debido al estado de las muestras.

Archidoris tuberculata presenta, exclusivamente en el extracto del manto, productos posiblemente relacionados con las verrucosinas (rf 0.3 en éter de petróleo-éter etílico 3:7), tanto en ejemplares procedentes de Blanes como de Asturias. Tras la purificación del extracto se obtuvo una cantidad inferior a 1 mg de producto (de dos ejemplares, por lo que no se pudieron analizar. Otros productos interesantes (de tipo purina?, que podrían ser similares a la xylosil-MTA de *Doris verrucosa*) se localizaron en el extracto butanólico de las vísceras. La escasa cantidad de material nos impidió realizar más estudios, que fueron posteriormente realizados en el I.C.M.I.B. con un mayor número de ejemplares (*Zubía et al., en prensa*). La secreción de esta especie y su parte externa tienen un pH neutro (7).

Austrodoris kerguelensis presenta 2 productos interesantes (rf 0.65 y 0.75 en éter etílico, reactivos con sulfato) exclusivamente en el extracto del manto, así como otros productos menos abundantes. En el extracto metanólico se detectaron varios productos fluorescentes interesantes (en butanol-ácido acético-agua 60-15-25). Cabe destacar el grosor del manto de un ejemplar de 4.5 cm de longitud máxima, que era de unos 3-4 mm, muy homogéneo en superficie, con pequeñas protuberancias, y presentando las vísceras muy compactadas. Recientemente Davies-Coleman y Faulkner (1991) han publicado un trabajo sobre las sustancias halladas en esta especie (ver apartado 6.).

Discodoris rosì presenta pH neutro (7). El análisis químico de nuestros ejemplares reveló la presencia de un furano (reactivo con Ehrlich) a rf 0.95 en éter de petróleo-éter etílico 9:1. Otros productos interesantes fueron tres sustancias fluorescentes (rf 0.30, 0.40 y 0.50 en benceno-éter etílico 8:2), si bien la cantidad no era suficiente para realizar otros análisis químicos.

Platydoris argo fue analizado en repetidas ocasiones, con ejemplares de Formentera, Miseno y Taormina, observándose que no presentaba ningún producto especialmente abundante en el manto que hiciera sospechar una posible defensa de tipo químico. Cabe recordar que esta especie presenta un manto bastante coriáceo. En los extractos de la glándula digestiva se detectó la presencia de un compuesto tipo 4-colestén-3-one, y en las puestas aparecieron ésteres de ácidos grasos. Los esteroles fueron aislados separadamente de las vísceras y la parte externa. Se comprobó que el pH externo era neutro (7). El estudio microscópico preliminar del epitelio del manto no reveló glándulas de interés, aunque se requieren más observaciones para confirmarlo. Los experimentos de predación con *Pleurobranchaea meckeli* dieron resultado negativo, y éste fue incapaz de morder al ejemplar de *P. argo*.

C) PORODORIDOIDEA.

Se han estudiado ejemplares de las especies: *Dendrodoris languida*, *Dendrodoris subpellucida*, *Doriopsis ciminoi* y *Doriopsis pharpa*.

El análisis preliminar de un ejemplar de *Dendrodoris languida* mostraba, sorprendentemente, la ausencia de productos parecidos a oleopupuana y polygodial. Se detectó, sin embargo, la presencia de un producto tipo 4-colestén-3-one en las glándulas digestiva y hermafrodita y en el aparato digestivo anterior.

Los ejemplares de *Dendrodoris subpellucida* analizados (previamente fijados en alcohol) parecían presentar polygodial en el extracto del borde del manto, si bien esto debiera ser confirmado con otros ejemplares especialmente conservados para el estudio químico. Se detectaba sobre placa la presencia de posibles ésteres del polygodial y otros productos relacionados

con los descritos para *D. limbata* y *D. grandiflora* (ver apartados 5.14. y 5.15.).

Doriopsilla pharpa parecía presentar sobre placa productos similares a los de *Doriopsilla areolata* (ver apartado 5.16.), concretamente varios productos sobre los esteroles (en éter de petróleo-éter etílico 1:1), y productos tipo ésteres y similar al de las branquias de *Dendrodoris limbata*, este último localizado en el extracto de la parte externa.

El estudio químico de *D. ciminoi* no reveló sustancias de interés ya que había sido conservado en alcohol, pero su estudio anatómico nos permitió describirla como nueva especie para la ciencia (Avila *et al.*, 1992).

5.17.5.2. Dendronotáceos.

Las especies analizadas han sido *Tritonia nilsodhneri*, *Tritonia striata*, *Marionia blainvillea* y *Tethys fimbria*.

Tritonia nilsodhneri presenta un patrón de productos (en TLC) similar al de su presa (*Eunicella verrucosa*), por lo que se supone que algunos de sus productos serán de origen dietético, si bien no se han podido identificar todavía estos productos (posiblemente ésteres de ácidos grasos). No se detectó la presencia de ningún producto especialmente abundante. El estudio químico de este posible marcador de la relación depredador-presa, obtenido de la presa, está siendo realizado en el I.C.M.I.B. En las puestas de esta especie no se detectaron productos de interés, si bien la cantidad de extracto era muy pequeña.

Tritonia striata presenta un producto muy interesante, de tipo furánico (rf 0.95 en éter de petróleo-éter etílico 1:1). La escasez de ejemplares impidió el análisis de este producto. En esta especie no se halló el producto citado en *D. nilsodhneri* que podría proceder de *E. verrucosa*.

El pH de los ejemplares capturados de *Marionia blainvillea* resultó ser neutro (7). De las placas cromatográficas realizadas (con productos de

referencia), no puede descartarse la posibilidad de que productos similares a las prostaglandinas de *Tethys fimbria* estén presentes en *M. blainvillea*.

Tethys fimbria ha sido objeto de numerosos y recientes estudios químicos (ver apartado 6. 9.). Conociendo la presencia de prostaglandinas, un extracto acetónico del manto de nuestros ejemplares (sin apenas cerata debido al método de captura por arrastre), conteniendo los productos descritos en los trabajos citados anteriormente, fue utilizado para un test de actividad sobre embriones de erizo (*P. lividus*). El extracto fue probado a concentraciones de 10 y 20 µg/ml, resultando inactivo en ambos casos, es decir, que se formaron larvas pluteus en porcentajes similares a los del control con agua e inferiores al control con acetona. Se midió el pH externo, que resultó ser neutro (7).

5.17.5.3. Armináceos y Eolidáceos.

En esta Tesis no se han efectuado estudios detallados con especies de estos dos grupos.

5.17.6. Resumen conclusivo.

Las 39 especies mencionadas han sido sometidas a estudios químicos preliminares, siendo una de ellas nueva para la ciencia (*Doriopsilla ciminoi*). De estas especies 7 presentan secreción ácida, y 5 poseen compuestos tipo 4-colestén-3-one. Obviamente, de estos datos preliminares no es posible extraer conclusiones, pero de todos modos se observa claramente que, aplicando la misma metodología multidisciplinaria utilizada en las otras especies (5.1. a 5.16.), se pueden obtener resultados interesantes para la taxonomía y la ecología de otros opistobranquios (cefalaspídeos, sacoglosos, etc.).

6. REVISION BIBLIOGRAFICA: TIPOS DE MOLECULAS HALLADAS EN MOLUSCOS OPISTOBRANQUIOS

6.1. Breve introducción química.

Las sustancias incluidas en esta Tesis pertenecen a la categoría de los denominados metabolitos secundarios. Bajo este nombre se engloban todas las sustancias que no están directamente implicadas en el llamado metabolismo primario (glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), y por lo tanto incluye, como un cajón de sastre, muchos y muy diversos compuestos. Las características básicas de estas moléculas orgánicas, también llamadas sustancias naturales, se podrían resumir así: 1) son muy heterogéneas en su estructura química, 2) tienen una distribución reducida en los seres vivos (a menudo son características de géneros o especies), y 3) se forman a través de vías metabólicas especializadas a partir de precursores estructuralmente muy simples.

Estas características, y algunas otras, (Luckner, 1984), los distinguen de los metabolitos primarios. Es importante destacar que los metabolitos primarios que están en el origen de las vías del metabolismo secundario son tan sólo unos pocos: aminoácidos, acetil coenzima A, ácido mevalónico e intermediarios de la vía del ácido shikímico.

Como funciones importantes de este tipo de metabolitos hay que destacar los efectos fisiológicos, las señales químicas, la regulación de la actividad entre organismos de la misma especie o de distintas especies, con sus implicaciones ecológicas, etc., (Luckner, 1984). Y aunque en algunos casos se pueda pensar que son simples productos de acumulación, esto es más bien difícil de creer (Torssell, 1983; Williams *et al.*, 1989). Torssell (*op. cit.*) define los metabolitos secundarios como sustancias químicas no-nutricionales que controlan la biología de las especies en su ambiente, o bien como sustancias que juegan un papel importante en la coexistencia y coevolución de las especies. Como consecuencia el organismo adaptaría la producción de metabolitos a sus condiciones de vida, y esto, siempre según Torssell (1983), no puede ser fortuito.

Las vías del metabolismo secundario pueden estar activadas sólo en determinadas fases de crecimiento y desarrollo (Mann, 1987). La línea divisoria entre metabolismo primario y secundario no es clara, existen

ejemplos intermedios, y además, ambos están interrelacionados (Mann, 1987). En la Figura 6.1. podemos observar esquemáticamente las principales vías del metabolismo secundario.

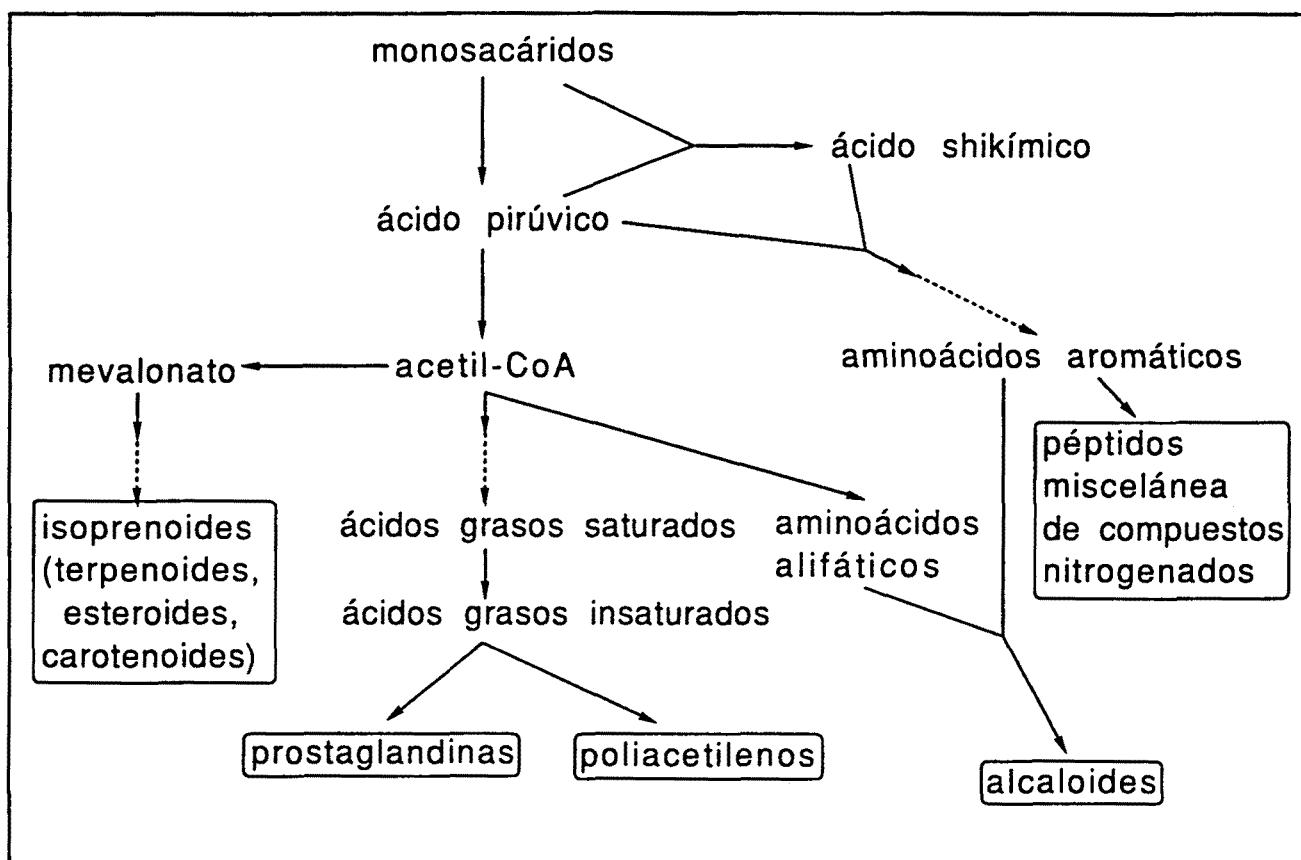


Figura 6.1. Principales vías del metabolismo secundario. Esquema modificado de Torsell (1983) y Mann (1987).

Como ejemplos de las vías básicas se pueden observar algunos de estos metabolitos de moluscos Opistobranquios (Figura 6.2.).

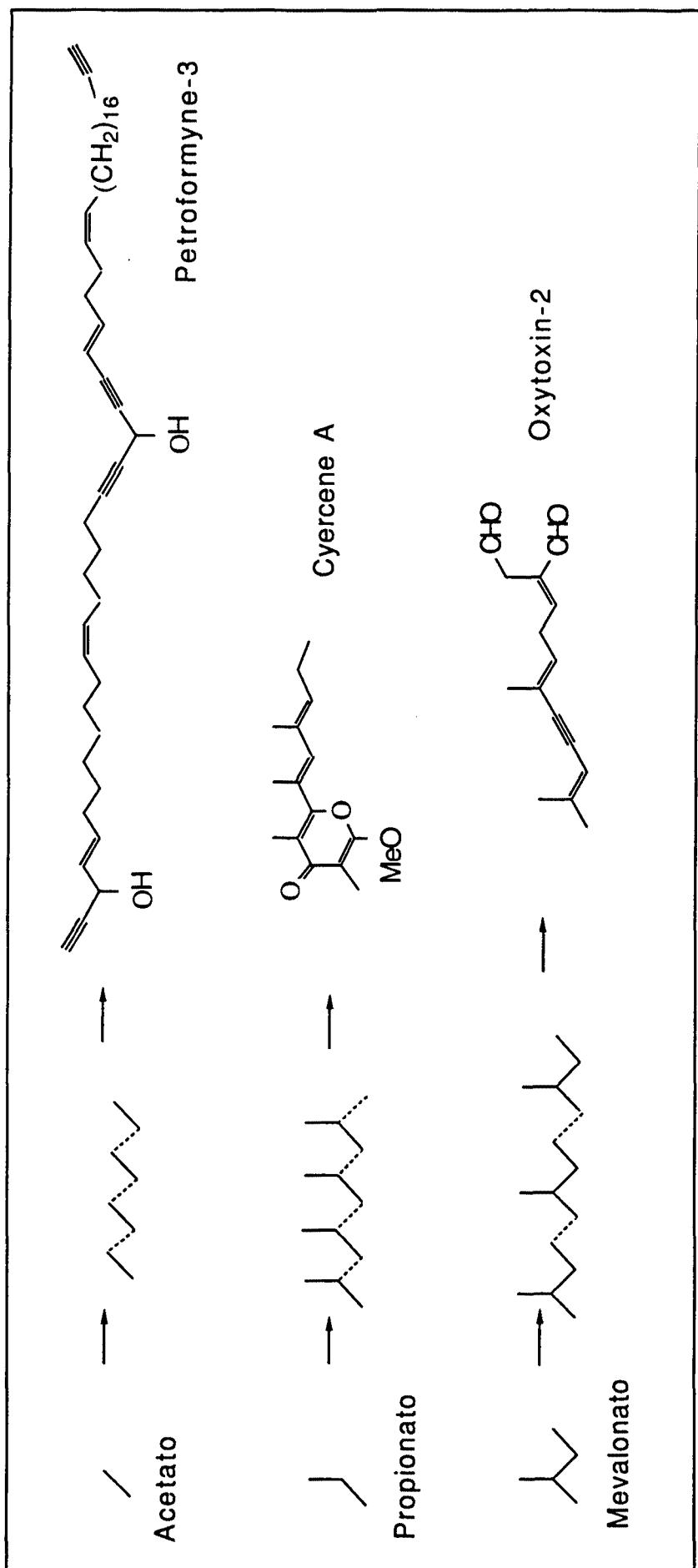


Figura 6.2. Ejemplos de productos naturales de opistobranquios derivados de algunas vías básicas del metabolismo secundario.

Algunos compuestos, sin embargo, presentan una biogénesis mixta, como por ejemplo las verrucosinas (mevalonato y glicerol) y el haminol (acetato y piridina). Los compuestos presentes en Dendrodorididae y Chromodorididae derivan básicamente de la vía del mevalonato (sesquiterpenos, diterpenos, etc.). Las sustancias que tienen un origen dietético proceden del metabolismo secundario de la especie presa, en la que pueden tener distintas funciones, pero en algunos casos son modificadas por el molusco, como en el Sacoglosso *Oxynoe olivacea* o en *Hypselodoris orsini* (ver el listado del apartado 6.9. para las referencias). El origen y la función de estas sustancias en Opistobranquios se discuten en los capítulos siguientes. Una observación previa y obligada es que la técnica empleada implica un sesgo en el tipo de productos hallados, es decir, por ejemplo, en nuestro caso, no se analizan las sustancias muy polares u otras no solubles en disolventes orgánicos (con algunas excepciones).

Una última observación es que en este capítulo se omiten deliberadamente las fórmulas de los compuestos mencionados, ya que estas pueden hallarse fácilmente en la bibliografía citada para cada caso. Otro comentario que es necesario hacer es que los trabajos referidos a nudibranquios no identificados son de escaso valor biológico, ya que no pueden ser replicados.

A continuación se revisan los compuestos descritos en moluscos opistobranquios a nivel mundial, clasificándolos por vías metabólicas. Aunque son numerosos los productos hasta ahora hallados (unos 500), su relación respecto al número de especies de opistobranquios (más de 6000) es relativamente baja.

6.2. Derivados del acetato y del propionato.

Se incluyen en este grupo los compuestos formados a partir del acetato y propionato, cuyas fórmulas se detallan en la Figura 6.3.

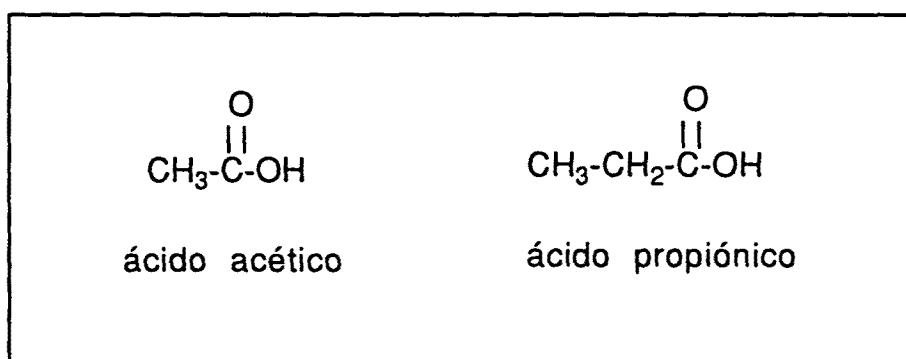


Figura 6.3. Fórmulas del acetato (A) y del propionato (B).

El ácido acético se encuentra en la naturaleza en forma de acetil-coenzima A. De hecho, prácticamente todo el resto de metabolitos, incluido el isopreno, derivan de esta molécula (Herbert, 1981). Los compuestos formados mediante la repetición de unidades de acetato son los ácidos grasos y los llamados polikétidos (polifenoles, poliacetilenos, prostaglandinas, macrocíclicos, antibióticos, macrólidos, lactonas macrocíclicas,...).

La mayoría de acetilenos, sin embargo, se citan como tóxicos para los animales (Luckner, 1984). El mismo autor los menciona como posibles repelentes en invertebrados.

En la Tabla 6.1. se detallan los compuestos de este tipo presentes en moluscos opistobranquios. En esta Tabla, y en todas las demás de este capítulo, se incluyen las referencias bibliográficas en las que se describieron las sustancias, si bien hay que considerar que en un mismo trabajo pueden describirse varias sustancias, así como una misma sustancia puede haber sido estudiada en varios trabajos.

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
Acidos grasos:		
<i>Aplysia kurodai</i>		Tanaka y Toyama (1959a)
<i>Aplysia fasciata</i>		Tibaldi (1966)
<i>Bursatella leachi</i>		Fenical et al. (1979)
<i>Pleurobranchaea meckeli</i>		Tibaldi (1966)
<i>Haminoea templadoi</i>		Carballeira et al. (1992)
Acetilenos:		
<i>Aplysia dactylomela</i>		
6 éteres acetilénicos		Schmitz et al. (1974, 1977)
<i>Peltodoris atromaculata</i>		
petroformyna-1		Castiello et al. (1978, 1980)
petroformyna-2		Cimino et al. (1980b, 1981a,
petroformyna-3		1985a, 1989d)
petroformyna-4		esta Tesis
<i>Diadumena sandiegensis</i>		
9 acetilenos clorados		Walker y Faulkner (1981)
hidrocarburos lineales		Faulkner et al. (1990)
Fenoles:		
<i>Stylocheilus longicauda</i>		
aplysiatoxina	Kato y Scheuer (1974, 1975 y 1976)	
debromoaplysiatoxina	Moore et al. (1984)	
Polipropionatos:		
<i>Phelinopsis depicta</i>		
aglajne-1, 2 y 3	Cimino et al. (1985b, 1986a, 1987c)	
<i>Phelinopsis speciosa</i>		
niuhinone-A y -B		Coval et al. (1985)
pulo'upone		
<i>Navanax inermis</i>		
niuhinone-B	Spinella et al. (1992b y c)	
5,6-dehydroaglajne-3	Spinella et al. (en prensa)	
isopulo'upone		
<i>Bulla striata</i>		
aglajne-2 y 3	Cimino et al. (1987c)	

<i>Bulla gouldiana</i>		
niuhinone-B	Spinella et al. (1992b y c)	
5,6-dehydroaglajne-3	Spinella et al. (en prensa)	
isopulo'upone		
<i>Elysia timida</i>		
polipropionatos	Gavagnin et al. (1992)	
<i>Elysia viridis</i>		
polipropionatos	Gavagnin et al. (1992)	
<i>Elysia chlorotica</i>		
9,10-deoxytridachione	Dawe y Wright (1986)	
elysione		
<i>Cyerce crystallina</i>		
cyercene-A y B	Vardaro et al. (1991)	
cyercene-1, 2, 3, 4 y 5	Mollo (1992)	
	Di Marzo et al. (en prensa)	
<i>Cyerce nigricans</i>		
7-methyl-cyercene-B	Roussis et al. (1990)	
polipropionato similar		
<i>Placida dendritica</i>		
placidene A y B	Vardaro et al. (1992a)	
iso-placidene A y B	Mollo (1992)	
	Di Marzo et al. (en prensa)	
<i>Ercolania funerea</i>		
cyercene-B	Mollo (1992)	
12-norcyercene-B	Vardaro et al. (1992b)	
7-methyl-cyercene-B	Di Marzo et al. (en prensa)	
7-methyl-12-norcyercene-B		
7-methyl-cyercene-2		
7-methyl-cyercene-1		
<i>Caliphylla mediterranea</i>		
polipropionato no identificado	Mollo (1992)	
<i>Tridachia crispata</i>		
crispatene	Ireland et al. (1979)	
crispatone	Ireland y Faulkner (1981)	
tridachiapyrone A, B, y C	Ksebati y Schmitz (1985)	
otros 3 propionatos		
<i>Placobranchus ocellatus</i>		
photodeoxytridachione	Ireland y Scheuer (1979)	
9,10-deoxytridachione		

<i>Tridachiella diomedea</i>		
9,10-deoxytridachione	Ireland et al. (1978)	
tridachione	Ireland y Faulkner (1981)	
15-nortridachione	Kay y Faulkner (1984)	
15-nor-9,10-deoxytridachione		
Prostaglandinas y eicosanoides:		
<i>Aplysia kurodai</i>		
aplydilactona	Ojika et al. (1990a)	
<i>Tethys fimbria</i>		
PGE ₂	Cimino et al. (1989b, 1991a, c)	
PGE ₂ -1,15-lactona	Di Marzo et al. (1990, 1991a,	
PGE ₂ -1,15-lactona-11-acetato	1992a, en prensa)	
PGE ₃	Marín et al. (1991)	
PGE ₃ -1,15-lactona		
PGE ₃ -1,15-lactona-11-acetato		
PGF ₂ α-1,15-lactona-11-acetato		
PGF ₂ α-1,15-lactona ésteres de ácidos grasos		
PGF ₃ α-1,15-lactona-11-acetato		
PGF ₃ α-1,15-lactona ésteres de ácidos grasos		
PGA ₂ -1,15-lactona		
PGA ₃ -1,15-lactona		
<i>Tritonia sp</i>		
punaglandinas	Baker (1986)	
Macrólidos:		
<i>Aplysia kurodai</i>		
aplyronine	Yamada et al. (1992)	
<i>Chromodoris lochi</i>		
laulimalide	Corley et al. (1988)	
iso-laulimalide		
<i>Hexabranchus sanguineus</i>		
kabiramida A, B, C, D, y E	Kernan et al. (1988b)	
methyldihydrohalichondramida	Roesener y Scheuer	
dihydrohalichondramida	(1986)	
ulapualide-A y B	Matsunaga et al. (1986, 1989)	
tetrahydrohalichondramida	Pawlik et al. (1988)	
<i>Hexabranchus sp</i>		
kabiramidas A, B, D y E	Matsunaga et al. (1989)	
dihydrohalichondramida		
33-methyldihydrohalichondramida		
<i>Nudibranquios no identificados</i>		
sphinxolide	Guella et al. (1989)	
kabiramida C	Matsunaga et al. (1986)	

Puestas de nudibranquios no identificados	
kabiramida C	Matsunaga et al. (1986)
kabiramidas A, B, C, D y E	Fusetani (1988)
Otros compuestos:	
<i>Scaphander lignarius</i>	
lignarenone-A y B	Cimino et al. (1987a, 1989c)
<i>Archidoris montereyensis</i>	
1-O-hexadecylglycerol	Gustafson y Andersen (1985)
<i>Aldisa sanguinea cooperi</i>	
1-O-hexadecylglycerol	Gustafson y Andersen (1985)

Tabla 6.1. Compuestos derivados del acetato y del propionato descritos en moluscos opistobranquios.

Las escasas referencias que hemos encontrado de ácidos grasos se hallan recopiladas en su mayoría en Voogt (1972). Por otro lado, según Castiello *et al.* (1980), se han descrito muy pocos acetilenos en organismos marinos.

En algunas de las especies mencionadas, existe una variabilidad geográfica de los metabolitos que será discutida en el apartado sobre el origen de las sustancias.

En algunos libros sobre metabolismo secundario se puede leer respecto a las prostaglandinas que "son metabolitos secundarios fisiológicamente activos que se hallan en mamíferos" (Herbert, 1981). Ya en 1976 Nomura y Ogata publicaron un listado de invertebrados en los que habían sido descritas prostaglandinas. Su listado incluía 16 especies, de las cuales sólo había 2 moluscos, ambos bivalvos. Las primeras prostaglandinas en invertebrados se describieron en la gorgonia *Plexaura homomalla* (Weinheimer y Spraggins, 1969). En 1989, como se puede ver en la Tabla 6.1., se encontraron las primeras prostaglandinas en opistobranquios.

6.3. Derivados del mevalonato.

Estos compuestos son los llamados isoprenoides, y comprenden terpenos, esteroides y carotenoides. La unidad fundamental que se repite en su estructura es, en este caso, el isopreno, de 5 átomos de carbono, aunque éste no se encuentra de forma natural, sino que es el mevalonato el que se observa (Figura 6.4.), derivado de 3 unidades de ácido acético (6 átomos de Carbono).

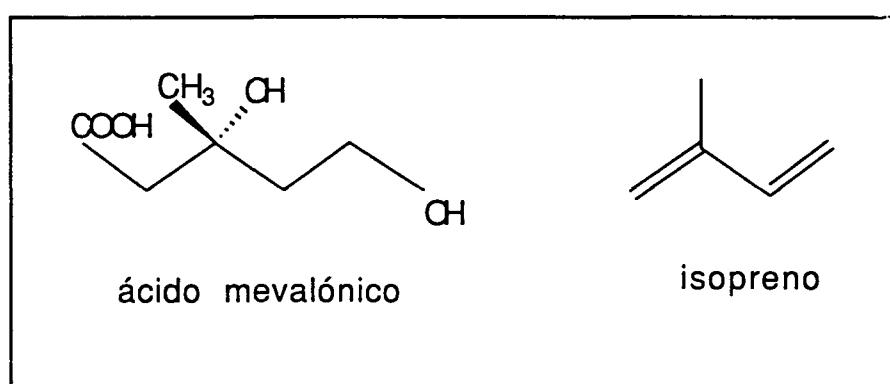


Figura 6.4. Fórmulas A) del mevalonato y B) del isopreno.

En los Opistobranquios estos compuestos se hallan, como veremos, ampliamente distribuidos en grupos muy diversos. Según el número de átomos de carbono reciben un nombre, y según este criterio los hemos clasificado en los listados de las Tablas 6.2. a 6.7.

Monoterpenos (C₁₀).

Los compuestos de este tipo hasta ahora descritos en Opistobranquios se encuentran relacionados en la Tabla 6.2.

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Aplysia</i> sp violacene		Faulkner (1977)
<i>Aplysia fasciata</i> (limacina) pentachloromonoterpeno derivado brominado		Imperato et al. (1977) Mynderse y Faulkner (1974)
<i>Aplysia californica</i> monoterp. polihalogenados		Faulkner et al. (1973) Faulkner y Stallard (1973) Mynderse y Faulkner (1974)
<i>Aplysia punctata</i> 7 monoterp. halogenados		Quiñoa et al. (1989)
<i>Aplysia kurodai</i> kurodainol aplysiapyranoid A, B, C y D aplysiaterpenoid A y B		Katayama et al. (1982) Inouye et al. (1987) Kusumi et al. (1987) Miyamoto et al. (1988)
<i>Aplysia dactylomela</i> monoterp. brominado		Kuniyoshi et al. (1985)
<i>Haminoea cymbalum</i> kumepaloxane		Poiner et al. (1989)
<i>Tylodina fungina</i> monoterp. brominado		Andersen y Faulkner (1972)
<i>Melibe leonina</i> 2,6-dimethyl-5-heptenal ácido 2,6-dimetil-5-heptenoico		Ayer y Andersen (1983)
<i>Melibe pillosa</i> 2,6-dimethyl-5-heptenal ácido 2,6-dimetil-5-heptenoico		Karuso (1987)

Tabla 6.2. Monoterpenos descritos en moluscos Opistobranquios.

Aunque los monoterpenos halogenados fueron de los primeros metabolitos descritos en Aplisiáceos, no son los compuestos más abundantes en este grupo, como veremos más adelante. Como curiosidad, destacaremos que *Melibe leonina* contiene los dos compuestos descritos por Ayer y Andersen (1983), (ver tabla), siendo el aldehido el responsable del peculiar

olor que desprende el animal, citado anteriormente por Nybakken y Ajeska (1976).

Sesquiterpenos (C₁₅).

Este tipo de compuestos parecen ser los más abundantes en Opistobranquios, tal y como se observa en la Tabla 6.3.

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Aplysia kurodai</i>		
aplysin	Tanaka y Toyama (1959c)	
debromoaplysin	Yamamura e Hirata (1963, 1971)	
aplysinol	Yamada et al. (1968)	
sesquiterp. no identificado	Irie et al. (1969)	
	Matsuda et al. (1967)	
<i>Aplysia californica</i>		
aplysin	Winkler (1961)	
debromoaplysin	Winkler et al. (1962)	
laurinterol	Irie et al. (1969)	
pacidiene	Stallard y Faulkner (1974a, b)	
pacifenol	Faulkner et al. (1974)	
johnstonol		
comp. relacionado		
prepacifenol epoxide		
<i>Aplysia vaccaria</i>		
aplysin	Winkler (1961)	
	Winkler et al. (1962)	
<i>Aplysia angasi</i>		
aplysistatin	Pettit et al. (1975, 1976, 1977, 1979)	
<i>Aplysia oculifera</i>		
(E)- y (Z)-ocellenyne	Schulte et al. (1981)	
srilankenye	De Silva et al. (1983)	

<i>Aplysia brasiliiana</i>		
brasilenyne	Kinnel et al. (1977a, 1979)	
cis-dihydrorhodophytin	Stallard et al. (1978)	
cis-isodihydrorhodophytin	Dieter et al. (1979)	
brasilenol		
epi-brasilenol		
brasilenol acetato		
brasudol		
iso-brasudol		
panacene		
<i>Aplysia dactylomela</i>		
isoobtusol acetato	Schmitz y McDonald (1974)	
dactylyne	McDonald et al. (1975)	
isodactylyne	Vanderah y Schmitz (1976)	
aplysistatina	Pettit et al. (1977)	
elatol	Schmitz et al. (1978a,	
deodactol	1978b, 1980, 1981, 1982)	
isocaespitol acetato	Kaul y Kulkarni (1978)	
isómero del austradiol acetato	Kaul et al. (1978a, b)	
16,16-dichloro-homo-laurane	Hollenbeak et al. (1979)	
dactylol	Von Dreele y Rao (1980)	
4 enynes	Gopichand et al. (1981)	
isodeodactol	González et al. (1982, 1983a)	
cyclolaurene	Brenan y Erickson (1982)	
cyclolaurenol	Ichiba e Higa (1986)	
dihydroxydeodactol monoacetato	Sakai et al. (1986)	
cyclolaurenol acetato	Baker et al. (1988)	
cupalaurenol	Rao et al. (1989)	
cupalaurenol acetato		
4 tipo chamigrane		
lankapuol A y B		
dactyloxene-A, B y C		
dactylenol		
dactylenol acetate		
allolaurinterol		
<i>Aplysia sp</i>		
bromo-chamigrane	Fedorov et al. (1989a y b)	
<i>Oxynoe olivacea</i>		
oxytoxin-1 y 2	Cimino et al. (1990a)	
<i>Acanthodoris nanaimoensis</i>		
nanaimoal	Ayer et al. (1984a, b)	
acanthodoral	Faulkner et al. (1990)	
isoacanthodoral		
<i>Acanthodoris brunnea</i>		
acanthodoral	Faulkner et al. (1990)	

<i>Anisodoris nobilis</i>	norsesquiterp. aldehido	Gustafson y Andersen (1985)
<i>Cadlina luteomarginata</i>		
dendrolasina	Thompson et al. (1982)	
pallescensina-A	Hellou et al. (1981, 1982)	
pleraplysillina-1	Faulkner et al. (1990)	
dihydropallescensina-2		
furodysinina		
microcionina-1, 2, 3 y 4		
albicanol		
albicanol acetato		
furodysina		
3 sesquiterp. isonitrilos		
3 sesquiterp. isothiocyanatos		
sesquiterp. furánicos		
<i>Ceratosoma brevicaudatum</i>		
dehydrodendrolasina	Ksebati y Schmitz (1988)	
dehydrolasiosperman		
thiofurodysinina acetato		
cis-dehydronodendrolasina		
methylthiofurodysinina		
dithiofurodysinina disulfuro		
<i>Hypselodoris californiensis</i>		
uryfurano	Hochlowski et al. (1982)	
pallescensina-A		
furodysinina		
dendrolasina		
nakafurano-8		
<i>Hypselodoris daniellae</i>		
spiniferina-2	Schulte y Scheuer (1982)	
<i>Hypselodoris ghiselini</i>		
dendrolasina	Hochlowski et al. (1982)	
nakafurano-9		
methoxybutenolide		
<i>Hypselodoris godeffroyana</i>		
nakafurano-8	Schulte et al. (1980)	
nakafurano-9	Bowden et al. (1980)	
<i>Hypselodoris porterae</i>		
uryfurano	Bowden et al. (1980)	
furodysinina	Hochlowski et al. (1982)	

<i>Hypselodoris zebra</i>		
euryfurano	Grode y Cardellina (1984)	
furodysinina		
5-acetoxy-nakafurano-8		
5-hydroxy-nakafurano-8		
furodysinina lactona		
<i>Hypselodoris agassizi</i>		
agassizina	Hochlowski et al. (1982)	
<i>Hypselodoris cantabrica</i>		
ent-furodysinina	Fontana et al. (en prensa)	
nakafurano-9	esta Tesis	
longifolina		
tavacfurano		
agassizina		
iso-nakafurano-9		
dendrolasina		
iso-dehidrodendrolasina		
<i>Hypselodoris fontandraui</i>		
furanos no identificados	esta Tesis	
<i>Hypselodoris webbi</i>		
longifolina	Cimino et al. (1982)	
nakafurano-9	García et al. (1990)	
iso-tavacfurano	Avila et al. (1991b)	
otros furanos no identificados	esta Tesis	
<i>Hypselodoris villafranca</i>		
longifolina	Cimino et al. (1980b)	
nakafurano-9	Avila et al. (1991b)	
tavacfurano	Fontana et al. (en prensa)	
dendrolasina	esta Tesis	
iso-nakafurano-9		
ent-furodysinina		
agassizina		
iso-dehidrodendrolasina		
<i>Hypselodoris tricolor</i>		
longifolina	Fontana et al. (en prensa)	
tavacfurano	esta Tesis	
nakafurano-9		
dendrolasina		
iso-nakafurano-9		
ent-furodysinina		
agassizina		
iso-dehidrodendrolasina		

<i>Hypselodoris</i> sp		
longifolina		esta Tesis
otros furanos no identificados		
<i>Chromodoris mariadilus</i>		
nakafurano-8		Schulte et al. (1980)
nakafurano-9		
<i>Chromodoris albonotata</i>		
pu'ulenal		Schulte y Scheuer (1982) Karusso (1987)
<i>Chromodoris marislae</i>		
2 ésteres isoméricos		Hochlowski y Faulkner (1981)
<i>Chromodoris lochi</i>		
dendrolasina		Kakou et al. (1987)
<i>Chromodoris funerea</i>		
furodysina		Carte et al. (1986)
furodysinina		
methylfurodysinina lactona		
furodysinina hydroperóxido		
3,4,5-tribromo-2-(2,4-dibromophenoxy)phenol		
4,6-dibromo-2-(2,4-dibromophenoxy)phenol		
furodysinina lactona		
β-hydroxybutenolide		
epoxilactona		
<i>Chromodoris</i> sp		
pu'ulenal		Karusso (1987)
<i>Dendrodoris limbata</i>		
polygodial	Cimino et al. (1981b, 1982, 1988b)	
olepupuana	Avila et al. (1991a)	
7-deacetoxy-olepupuana		esta Tesis
6-β-acetoxy-olepupuana		
ésteres drimánicos		
curyfurano		
<i>Dendrodoris grandiflora</i>		
microcionina-1, 2, 3 y 4	Cimino et al. (1980b, 1985d,	
6-β-acetoxy-olepupuana	1986a, 1988b)	
polygodial	Avila et al. (1991a)	
olepupuana		esta Tesis
7-deacetoxy-olepupuana		
ésteres drimánicos		
curyfurano		
otros comp. no identificados		

<i>Dendrodoris nigra</i>		
polygodial		Okuda et al. (1983)
olepupuana		
<i>Dendrodoris tuberculosa</i>		
polygodial		Okuda et al. (1983)
olepupuana		
<i>Dendrodoris krebsi</i>		
polygodial		Okuda et al. (1983)
olepupuana		
<i>Doriopsilla areolata</i>		
comp. relacionados con los de <i>D. limbata</i>	esta Tesis	
<i>Doriopsilla janaina</i>		
ésteres drimánicos		Okuda et al. (1983)
olepupuana		
<i>Doriopsilla albopunctata</i>		
?olepupuana		Okuda et al. (1983)
methoxy acetal		
3 porostomados no identificados		
ésteres drimánicos		Okuda et al. (1983)
<i>Phyllidia pulitzeri</i>		
axisonitrilo-1		Cimino et al. (1982, 1986a)
<i>Phyllidia varicosa</i>		
9-isocyanopupukeanane		Burreson et al. (1975)
2-isocyanopupukeanane		Hagadone et al. (1979)
isothiocyanoaromadendrane		Karuso (1987)
<i>Phyllidia bourguini</i>		
9-isocyanopupukeanane	Fusetani et al. (1990, 1992)	
9-epi-9-isocyanopupukeanane		
<i>Phyllidia loricata</i>		
sesquiterpenoides		Karuso (1987)
<i>Phyllidia rosans</i>		
sesquiterpenoides		Karuso (1987)
<i>Phyllidia ocellata</i>		
axisonitrilo-3	Fusetani et al. (1992)	
7-iso-cyano-7,8-dihydro- δ -bisabolene		
cavernoisothiocyanato		
iso-thiocyanide no identificado		

<i>Phyllidia pustulosa</i>		
isocyanides no identificados	Fusetani et al. (1992)	
isothiocyanoaromadendrane	Karuso (1987)	
<i>Phyllidia quadrilineata</i>		
isothiocyanoaromadendrane	Karuso (1987)	
<i>Phyllidia sp</i>		
3-isocyanotheronellina	Gulavita et al. (1986)	
<i>Phyllidia sp</i>		
isocyanides no identificados	Fusetani et al. (1992)	
<i>Phyllidia spp</i>		
sesquiterpenos isocyanides	Karuso (1987)	
<i>Fryeria spp</i>		
sesquiterpenos isocyanides	Karuso (1987)	
<i>Tochuina tetraquetra</i>		
tochuinyl acetato	Williams y Andersen (1987)	
dihydrotachuinyl acetato	Faulkner et al. (1990)	

Tabla 6.3. Sesquiterpenos descritos en Moluscos Opistobranquios.

Según Baslow (1969) y Endean (1972), el término "aplysin" fue inicialmente usado para más de un compuesto: por un lado el citado en *A. californica* y *A. vaccaria* por Winkler y sus colaboradores (1961, 1962), refiriéndose a un extracto crudo, y por otra parte, Yamamura e Hirata (1963) en *A. kurodai*, aislaron la sustancia llamada "aplysin".

En *Anisodoris nobilis*, Gustafson y Andersen (1985), hallaron en pequeñas cantidades, un norsesquiterpeno aldehido, que es el responsable del olor afrutado de esta especie.

Por otro lado, se podría suponer que la toxina descrita por Lewin (1970) en *Oxynoe panamensis*, que se alimenta de *Caulerpa sertularioides*, estaría relacionada con este tipo de compuestos, por similitud con *O. olivacea*, si bien no se ha efectuado (a nuestro saber) ningún estudio posterior sobre esta especie.

Chromodoris albonotata contiene, segun Schulte y Scheuer (1982), pu'ulenal, que resulta ser un enol acetato del polygodial, que comentaremos seguidamente. Hochlowski *et al.* (1982) citaron un methoxy-butenolide en *H. ghiselini*, que según Faulkner (1984b) sería un producto resultado de la oxidación del nakafurano-9.

Hechos estos comentarios al listado anterior, vamos a comentar los productos de este tipo analizados en esta Tesis. Tal y como se detalla en la Tabla 6.3. se han hallado en este trabajo productos de tipo sesquiterpenoide en las especies: *Hypselodoris cantabrica*, *H. fontandraui*, *H. webbi*, *H. villafranca*, *H. tricolor*, *Hypselodoris* sp, *Dendrodoris limbata*, *D. grandiflora* y *Doriopsilla areolata*. En cada uno de los apartados dedicados a estas especies se ha incluido ya una pequeña discusión, por lo que aquí revisaremos solamente los caracteres generales.

Además de las especies *Dendrodoris limbata* y *D. grandiflora*, el polygodial también se ha encontrado en *Dendrodoris nigra*, *D. tuberculosa* y *D. krebsi*, mientras que los ésteres drimánicos se hallaron en *D. krebsi*, *Doriopsilla janaina*, *Doriopsilla albopunctata* y otros tres porostomados no identificados (ver las referencias en la Tabla 6.3.). La olepupuana se ha descrito además en *Dendrodoris nigra*, *D. tuberculosa*, *D. krebsi*, *Doriopsilla albopunctata*, *Doriopsilla janaina*, y uno de los tres porostomados no identificados por Okuda *et al.* (1983). En *Doriopsilla albopunctata* se citaba también un methoxy-acetal que según Faulkner (1984b) y Krebs (1986) debe ser un artefacto metodológico. Olepupuana y 6- β -acetoxy-olepupuana también se hallaron en *D. limbata* y *D. grandiflora* (ver las referencias en la Tabla 6.3.). A partir de los ésteres drimánicos se obtiene en estas especies el euryfurano (Okuda *et al.*, 1983), que también se ha descrito en *Hypselodoris californiensis*, *H. porterae* e *H. zebra*. La 7-deacetoxy-olepupuana, que hemos hallado en *D. limbata* y *D. grandiflora*, es un compuesto nuevo para la ciencia.

En cuanto las especies del género *Hypselodoris*, podemos decir que algunos de los compuestos que hemos hallado en nuestros análisis, se han descrito también en otras especies. Como excepción, la longifolina (no confundir con longifolene) se ha descrito solamente en las especies *H.*

cantabrica, *H. webbi*, *H. villafranca*, *H. tricolor* e *Hypselodoris* sp. El nakafurano-9 se ha hallado en *H. cantabrica*, *H. webbi*, *H. villafranca*, *H. tricolor*, *H. godeffroyana*, *H. ghiselini* y *Chromodoris maridadilus* (ver las referencias en la Tabla 6.3.). La dendrolasina se ha citado en *Cadlina luteomarginata*, *H. californiensis*, *H. ghiselini*, *H. cantabrica*, *H. villafranca*, *H. tricolor* y *Chromodoris lochi*. La iso-dehidrodendrolasina, citada por primera vez como producto natural, se ha hallado en *H. cantabrica*, *H. villafranca* e *H. tricolor*. La agassizina se ha descrito en *H. agassizi*, *H. cantabrica*, *H. villafranca* e *H. tricolor*. Por su parte, *ent*-furodysinina y tavacfurano se habían hallado únicamente en esponjas (ver apartado 5.1. para las referencias), y en esta Tesis se citan para *H. cantabrica*, *H. villafranca* e *H. tricolor*. El iso-tavacfurano de *H. webbi* fue descrito como producto sintético (ver apartado 5.3.), y esta es la primera cita como producto natural. El iso-nakafurano-9 se ha hallado como compuesto nuevo para la ciencia en las especies *H. cantabrica*, *H. villafranca* e *H. tricolor*. Esta Tesis representa el primer estudio químico de las especies *H. cantabrica*, *H. fontandraui*, *H. tricolor* e *Hypselodoris* sp. Estos y otros compuestos se distribuyen en las especies de *Hypselodoris* según se expone en la Tabla 7.6.

Para concluir diremos que los compuestos siguientes: tavacfurano, iso-tavacfurano, *ent*-furodysinina, iso-nakafurano-9 y 7-deacetoxyolepupuana se citan por primera vez en moluscos Opistobranquios.

Diterpenos (C₂₀)

Este tipo de compuestos son también muy abundantes en opistobranquios, tal y como se puede observar en la Tabla 6.4.

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Aplysia depilans</i>		
	pachydictyol	Minale y Riccio (1976)
	dictyol A, B, C, D y E	Fattorusso et al. (1976)
	dictyolactona	Danise et al. (1972, 1977) Finer et al. (1979)

<i>Aplysia dactylomela</i>		
14-bromoobtus-1-ene-3,11-diol	Schmitz et al. (1979,	
parguerol	1982)	
16-acetato de parguerol	Yamamura y Terada (1977)	
deoxyparguerol	González et al. (1983b)	
isoparguerol	Rodríguez et al. (1989)	
16-acetato de isoparguerol	Estrada et al. (1989)	
isoconcinndiol		
dactylomelol		
<i>Aplysia parvula</i>		
diterpeno	Fenical et al. (1979)	
<i>Aplysia kurodai</i>		
aplysin-20	Matsuda et al. (1967)	
isoaplysin-20	Scheuer (1969)	
aplysiadiol	Yamamura e Hirata (1971)	
	Yamamura y Terada (1977)	
	Ojika et al. (1990b)	
<i>Aplysia angasi</i>		
angasiol	Schmitz et al. (1978b)	
	Pettit et al. (1978)	
<i>Aplysia vaccaria</i>		
acetoxicrenulide	Midland et al. (1983)	
1,9-dihydroxycrenulide		
1-hydroxy-9-acetoxycrenulide		
9-hydroxycrenulide		
<i>Dolabella auricularia</i>		
dolatriol	Pettit et al. (1976)	
dolatriol-6-acetato	Pettit y Cragg (1978)	
<i>Dolabella ecaudata</i>		
dolatriol	Pettit et al. (1980)	
<i>Dolabella californica</i>		
14 diterp. tipo dolabellane	Faulkner e Ireland (1977)	
<i>Casella atromarginata</i>		
spongiatriol acetato	De Silva y Scheuer (1982)	
spongiadiol acetato	Scheuer (1982)	
4 furanoditerpenos no identificados		

<i>Cadlina luteomarginata</i>		
marginatafurano	Gustafson et al. (1985)	
glaciolide	Faulkner (1991)	
cadlinolide A	Faulkner et al. (1990)	
tetrahydroaplysulphurina-1	Thompson et al. (1982)	
	Hellou et al. (1982)	
<i>Chromodoris norrisi</i>		
norrisolide	Hochlowski et al. (1983a)	
macfarlandina-E	Faulkner (1991)	
shahamina-C		
polyrhaphina-A		
<i>Chromodoris epicuria</i>		
aplyroseol-1	Ksebati y Schmitz (1987)	
aplyroseol-2		
dendrillol-1		
6 diterp. espongianos		
<i>Chromodoris marisliae</i>		
marislina	Hochlowski y Faulkner (1981)	
<i>Chromodoris macfarlandi</i>		
macfarlandina-A	Molinski y Faulkner (1986)	
macfarlandina-B	Molinski et al. (1986)	
macfarlandina-C	Hambley et al. (1986)	
macfarlandina-D		
macfarlandina-E (o aplyviolacene)		
<i>Chromodoris cavae</i>		
chromodorolide-A	Dumdei et al. (1989)	
<i>Chromodoris tasmaniensis</i>		
6 aplyroseol diterpenos	Karuso (1987)	
<i>Chromodoris luteorosea</i>		
luteorosina	Cimino et al. (1990b)	
12-epi-aplysillina	Gavagnin et al. (1991)	
12-epi-12-deacetylaplysillina	Avila et al. (1990b)	
macfarlandina-A	Di Marzo et al. (en acept.)	
norrisolide	esta Tesis	
polyrhaphina C		
chelonaplysina C		
<i>Chromodoris purpurea</i>		
luteorosina*	Avila et al. (1990b)	
macfarlandina-A*	Di Marzo et al. (en acept.)	
norrisolide*	esta Tesis	
polyrhaphina-C*		
chelonaplysina-C*		
otros comp. relacionados		

<i>Chromodoris krohni</i>	
luteorosina*	Avila et al. (1990b)
macfarlandina-A*	Di Marzo et al. (en acept.)
norrisolide*	esta Tesis
polyrhaphina-C*	
chelonaplysina-C*	
<i>Chromodoris britoi</i>	
luteorosina*	esta Tesis
macfarlandina-A*	
norrisolide*	
polyrhaphina-C*	
chelonaplysina-C*	
otros comp. relacionados	
<i>Hypselodoris ghiselini</i>	
ghiselinina	Hochlowski et al. (1982)
<i>Elysia sp</i>	
chlorodesmina	Hay et al. (1989)
<i>Cyerce nigricans</i>	
chlorodesmina	Hay et al. (1989)
<i>Elysia halimedae</i>	
halimeda tetraacetato	Paul y Van Alstyne (1988)
<i>Elysia translucens</i>	
diterp. no identificados	Gavagnin et al. (1992)
<i>Bosellia mimetica</i>	
diterp. no identificados	Gavagnin et al. (1992)
<i>Thuridilla hopei</i>	
diterp. no identificados	Gavagnin et al. (1992)
<i>Phyllodesmium longicirra</i>	
trocheliophoral	Coll et al. (1985)
<i>Armina maculata</i>	
verecynarmina A, B, C,	Guerriero et al. (1987,
verecynarmina D, E, F y G	1988, 1990)
preverecynarmina	
cembrene-C	
<i>Tochuina tetraquetra</i>	
pukalide	Williams y Andersen (1987)
ptilosarcenone	Faulkner et al. (1990)
butanoate análogo	

Tabla 6.4. Diterpenos descritos en Moluscos Opistobranquios. (*= productos identificados únicamente mediante TLC).

Algunos comentarios a la Tabla 6.4. son que *Chromodoris epicuria* fue inicialmente confundido con *Ceratosoma brevicaudatum* (Ksebati y Schmitz, 1987) y corregido posteriormente por los mismos autores (1988). En *Chromodoris cavae* se halló chromodorolide A (Dumdei *et al.*, 1989), que presenta un tipo particular de esqueleto bautizado como chromodorane. La macfarlandina A y B, de *Chromodoris macfarlandi*, son norditerpenos aromáticos (Molinski y Faulkner, 1986), siendo los primeros compuestos de este tipo que fueron aislados de organismos marinos.

A este grupo pertenecen los compuestos mencionados en esta Tesis para las especies de *Chromodoris* analizadas (*C. luteorosea*, *C. purpurea*, *C. krohni* y *C. britoi*). Destacaremos que la macfarlandina-A se halló previamente en *C. macfarlandi*, mientras que luteorosina, 12-*epi*-aplysillina y 12-*epi*-12-deacetyl-aplysillina se describieron en *C. luteorosea*, y el norrisolide en *C. norrisi* (ver referencias en la Tabla 6.4.). La polyrhaphina C y la chelonaplysina C se habían descrito con anterioridad únicamente en esponjas.

Sesterterpenos (C₂₅).

En la Tabla 6.5. se exponen los productos de este tipo hallados en opistobranquios hasta la fecha.

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Cadlina luteomarginata</i>		
idadione		Thompson <i>et al.</i> (1982)
luteone		Hellou <i>et al.</i> (1981, 1982)
		Faulkner <i>et al.</i> (1990)
<i>Chromodoris sedna</i>		
sednolide		Hochlowski <i>et al.</i> (1983b)
12-deacetyl-20-methyl-12- <i>epi</i> -deoxoscalarina		
23-hydroxy-20-methyldeoxoscalarina		
23-hydroxy-20-methylscalarolide		
sednolide-23-acetato		

<i>Chromodoris splendida</i>		
24-methyl-scalarinas	Hochlowski et al. (1983b)	
<i>Chromodoris funerea</i>		
12-epi-scalarina	Kernan et al. (1988a)	
deoxoscalarina		
luffariellina-C y D		
ketodeoxoscalarina		
<i>Chromodoris elisabethina</i>		
latrunculina-A	Okuda y Scheuer (1985)	
<i>Chromodoris youngbleuthi</i>		
3 deacetyl-scalaradials	Terem y Scheuer (1986)	
<i>Chromodoris inornata</i>		
inorolide A, B y C	Miyamoto et al. (1992)	
scalarobutenolide		
5 comp. tipo scalarina		
<i>Glossodoris pallida</i>		
scalaradial	Rogers y Paul (1991)	
deoxyscalarina		
<i>Glossodoris hikurensis</i>		
heteronemina	Rogers y Paul (1991)	
episcalaradial		
<i>Glossodoris cincta</i>		
heteronemina	Rogers y Paul (1991)	
episcalaradial		
<i>Hypselodoris orsini</i>		
furoscalarol	Cimino et al. (1982)	
deoxoscalarina	Cimino et al. (1991d, en prensa)	
6-oxo-deoxoscalarina	esta Tesis	
<i>Dendrodoris grandiflora</i>		
fasciculatina	Cimino et al. (1980b, 1985d)	
furospingina-1 acetato		
furanoterpeno no identificado		
<i>Tochuina tetraquetra</i>		
rubifolide	Williams y Andersen (1987)	
	Faulkner et al. (1990)	

Tabla 6.5. Sesterterpenos descritos en Moluscos Opistobranquios.

En *Dendrodoris grandiflora* se halló fasciculatina (Cimino et al., 1980b), siendo éste el primer sesterterpeno hallado en opistobranquios.

Aunque se ha trabajado con *D. grandiflora*, esta Tesis no aporta más datos sobre sesterterpenos en dicha especie. Se ha analizado la especie *Hypselodoris orsini*, y se han hallado los sesterterpenos detallados en la Tabla 6.5. (procedentes de la biotransformación del scalaradial), previamente mencionados para *Glossodoris tricolor* o *Hypselodoris tricolor*, pero que como ya hemos comentado en el capítulo 5.7., corresponden a *H. orsini*. La deoxoscalarina se describió también en *Chromodoris funerea*, mientras que compuestos similares se han descrito en *C. sedna* y *C. youngbleuthi*.

Triterpenos (C₃₀) y esteroides.

Los compuestos de este tipo, básicamente esteroles, descritos en Opistobranquios son los que se detallan en la Tabla 6.6.

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Philine japonica</i>		
	esteroles no identificados	Toyama y Tanaka (1956)
<i>Aplysia kurodai</i>		
	colesterol	Tanaka y Toyama (1959a)
	delta-5,7,22,25-colestatetraenol	Miyamoto et al.
	aplykurodina-A y B	(1986)
<i>Aplysia depilans</i>		
	colesterol	Voogt y Van Rheenen (1973)
	2 endoperóxidos esteroidales	Jiménez et al. (1986)
<i>Aplysia juliana</i>		
	endoperóxidos esteroidales	Castedo et al. (1983)
<i>Aplysia punctata</i>		
	3 endoperóxidos esteroidales	Jiménez et al. (1986)
		Castedo et al. (1983)
<i>Aplysia dactylomela</i>		
	4 epidioxosteroles	Gunatilaka et al. (1981)
<i>Aplysia fasciata</i>		
	4-acetyl-aplykurodina-B	Spinella et al. (1992a)
	aplykurodinone-B	Martínez et al. (1992)

<i>Limacina helicina</i>		
pteropodasterol	Baalsrud (1950)	
delta-5,7		
<i>Clione limacina</i>		
pteropodasterol	Baalsrud (1950)	
delta-5,7		
<i>Dendronotus frondosus</i>		
colesterol	voogt (1970, 1973)	
desmosterol		
22-dehydrocholesterol		
dihydrobrassicasterol		
brassicasterol		
24-methylenecholesterol		
<i>Lamellidoris bilamellata</i>		
colesterol	voogt (1970, 1973)	
desmosterol		
22-dehydrocholesterol		
brassicasterol		
24-methylenecholesterol		
<i>Adalaria sp</i>		
esteroles peróxidos	Stonard et al. (1980)	
<i>Diaulula sandiegensis</i>		
diaulusteroles A y B	Williams et al. (1986)	
	Faulkner et al. (1990)	
<i>Archidoris tuberculata</i>		
colesterol	voogt (1970, 1973)	
desmosterol		
22-dehydrocholesterol		
dihydrobrassicasterol		
brassicasterol		
sitosterol		
stigmasterol		
24-nor-cholesta-5,22-dien-3 β -ol		
<i>Peltodoris atromaculata</i>		
colesterol	voogt (1973)	
desmosterol	Cimino et al. (1980b)	
22-dehydrocholesterol		esta tesis
dihydrobrassicasterol		
brassicasterol		
24-methylenecholesterol		
sitosterol		
stigmasterol		
fucosterol		
petrosterol		
comp. tipo 4-colestén-3-one		

<i>Doris verrucosa</i>	esta Tesis
colesterol	
7-dehidro-colesterol	
<i>Aldisa sanguinea cooperi</i>	
2 esteroides	Ayer y Andersen (1982)
ácido relacionado	
<i>Actinocyclus japonicus</i>	
esteroles no identificados	Toyama y Tanaka (1956)
<i>Dendrodoris rubra</i>	
delta-5,7 y otros	Tanaka y Toyama (1959b)
<i>Doriopsilla areolata</i>	
comp. tipo 4-colestén-3-one	esta Tesis
<i>Hervia peregrina</i>	
esteroides polihidroxilados	Cimino et al. (1980a, b)
<i>Flabellina affinis</i>	
esteroides polihidroxilados	Cimino et al. (1980a, b)
<i>Coryphella lineata</i>	
esteroides polihidroxilados	Cimino et al. (1980a, b)

Tabla 6.6. Triterpenos y esteroles descritos en Moluscos Opistobranquios.

Algunas revisiones sobre esteroles y otros compuestos relacionados se pueden hallar en Voogt (1972), Goad (1976) y Casteel (1992). Otros estudios sobre *Aplysia depilans* (biosíntesis de esteroides) pueden hallarse en Lupo di Prisco *et al.* (1973) y Lupo di Prisco y Dessi Fulgheri (1974, 1975).

Segun Nigrelli *et al.* (1967, y referencias en el citadas) en los phyla inferiores (suponemos que se refiere a invertebrados en general) hay una gran diversidad de esteroles, y el colesterol no es el principal esterol. Aunque esto no coincide con Ikekawa (1985), según el cual, en moluscos los esteroles son predominantemente C₂₆, C₂₇, C₂₈ y C₂₉. En gasterópodos los delta-5 son los más abundantes, y entre ellos el colesterol es entre un 50 y un 60% de los esteroles totales. El hecho más destacable en moluscos es el elevado porcentaje de delta-5,7-diene esteroles (la numeración indica la situación de los dobles enlaces en la molécula).

Voogt (1970) determinó la presencia relativa de esteroles según el número de carbonos, obteniendo un porcentaje mayor de C₂₇, seguido de C₂₈, respecto a C₂₆ y C₂₉. Su estudio se refería a las especies: *Lamellidoris bilamellata*, *Archidoris tuberculata* y *Dendronotus frondosus*. El mismo autor estudió el metabolismo lipídico en estas especies inyectando acetato-1-¹⁴C. Obtuvo ácidos grasos marcados pero observó que los esteroles presentaban poquíssima radioactividad, por lo que dedujo que se sintetizaban a una muy baja velocidad. Esto coincidiría con las bajas incorporaciones que se obtienen en algunos experimentos de biosíntesis, que comentaremos en el apartado 6.2.

Los compuestos de este tipo analizados en esta Tesis son el 4-colestén-3-one (que en realidad es un grupo de productos), hallado en *Peltodoris atromaculata* y *Doriopsilla areolata* (y otras especies que se detallan en el apartado 5.17.), y los esteroles de *Dendrodoris* spp, comentados en el apartado 5.15. Es necesario destacar que se han preparado los esteroles de varias de las especies analizadas para su posterior estudio mediante GC. Este tipo de trabajos requieren gran dedicación y los resultados no son siempre satisfactorios.

Tetraterpenos (C₄₀).

La mayoría de carotenoides naturales son tetraterpenos. En Opistobranquios se ha señalado la presencia de los carotenoides que se exponen en la Tabla 6.7.

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Philine aperta</i>		
?β-caroteno		Lönnberg (1931)
luteina		
<i>Aplysia depilans</i>		
β-caroteno		Fisher et al. (1956)
xantofilas		
<i>Dolabella ecaudata</i>		
loliolide		Pettit et al. (1980)

<i>Clione limacina</i>		Fisher et al. (1956)
β-caroteno		
xantofilas		
<i>Limacina retroversa</i>		Fisher et al. (1956)
xantofilas		
<i>Pleurobranchus sp</i>		Karrer y Solmssen (1935)
astaxanthina		
<i>Hopkinsia rosacea</i>		Strain (1949)
hopkinsi xanthina		Isler (1971)
<i>Triopha carpenteri</i>		
acetylenic apo-carotenoide (triophaxanthina)		
		McBeth (1972)
<i>Anisodoris nobilis</i>		
α-caroteno		McBeth (1972)
β-caroteno		
isorenieratene		
<i>Rostanga pulchra</i>		Cullon (1966)
carotenoides		
astaxanthina		Anderson (1971)
<i>Doris tuberculata</i>		
pigmento no identificado		Abeloos y Abeloos (1932)
<i>Archidoris montereyensis</i>		
carotenos no determinados		Goodwin y Fox (1955)
<i>Hypselodoris webbi (edenticulata)</i>		
pigmento no identificado		Anderson y Lane (1963)
<i>Dendrodoris fulva</i>		
α-caroteno		McBeth (1972)
β-caroteno		
isorenieratene		
<i>Doriopsilla albopunctata</i>		
α-caroteno		McBeth (1972)
β-caroteno		
isorenieratene		
<i>Flabellinopsis iodinea</i>		
xantofilas no determinadas		Goodwin y Fox (1955)
astaxanthina		McBeth (1972)
astaxanthina ésteres		
<i>Hermissenda crassicornis</i>		
pigmento no identificado		Bürgin (1965)

<i>Phestilla melanobrachia</i>		
carotenoides		Scheuer (1982)
pigmento no identificado		Harris (1971)
<i>Fiona marina</i>		
pigmento no identificado		Kropp (1931)
<i>Trinchesia coerulea</i>		
pigmento no identificado		Bürgin-Wyss (1961)

Tabla 6.7. Tetraterpenos descritos en Moluscos Opistobranquios.

Como se puede observar, la mayoría de estos trabajos fueron realizados hace varias décadas, y recientemente a este tipo de compuestos no se les ha prestado mucha atención. El único trabajo reciente es el de Pettit *et al.* (1980), que aislaron el carotenoide degradado loliolide de *Dolabella ecaudata*, y la cita de Scheuer (1982).

Un pigmento soluble en agua, con características algo distintas de los pigmentos carotenoide-proteicos, fue hallado en *Hypselodoris webbi* (*H. edenticulata*) por Anderson y Lane (1963), si bien no pudo ser purificado. Este pigmento era indicador: azul en soluciones básicas y neutras, y rojo en las ácidas. No se ha incluido en la Tabla 6.7. la especie *H. cantabrica*, cuyo pigmento azul muestra también, como hemos explicado en el capítulo 5.1., estos cambios de color típicos (en presencia de ácidos y bases), ya que no lo hemos analizado con detalle. Un pigmento soluble en agua fue descrito en *Hypselodoris californiensis* (Cockerell, 1901; Crozier, 1922), *Chromodoris zebra* (Crozier, 1914; Preisler, 1930) e *Hypselodoris porterae* (Crozier, 1922).

6.4. Derivados del ácido shikímico.

El ácido shikímico es un intermediario en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, los cuales a su vez son precursores de numerosos

metabolitos secundarios en plantas y en microorganismos (los animales no pueden efectuar biosíntesis *de novo* mediante esta vía, Herbert, 1981). Pertenecen a este grupo, pues, los aminoácidos aromáticos, las quinonas, coumarinas y flavonoides, y ciertos polifenoles. Curiosamente a este tipo de compuestos pertenecen las ligninas y lignanos. La mayoría de estos productos en las plantas son alelopácticos: suprimen o inhiben el crecimiento o la germinación en otras plantas, (Mann, 1987).

En Opistobranquios no hay apenas compuestos descritos derivados de esta vía. Uno de ellos es el navenone-C (navenone-A y B no lo son). Esta sustancia se halló en *Navanax inermis*, y es un fenol simple (Sleeper y Fenical, 1977; Fenical *et al.*, 1979; Sleeper *et al.*, 1980). La secreción amarilla que deja este opistobranquio contiene una mezcla de las tres navenonas citadas, más otros cuatro compuestos minoritarios (Fenical *et al.*, 1979).

Por otro lado, en *Jorunna funebris* se describieron 4 quinonas (una de ellas la mimosamycina) y una dihydroquinona (Gulavita, 1987).

6.5. Compuestos nitrogenados.

Se incluyen en este grupo los alcaloides, los pigmentos nitrogenados, los nucleósidos y otros derivados peptídicos y piridínicos.

Los pigmentos nitrogenados, a pesar de estar bastante distribuidos en invertebrados marinos (Prota, 1980), se encuentran apenas descritos en Opistobranquios, debido seguramente a las dificultades que conlleva su estudio (solubilidad limitada, difícil cristalización, etc.). En la Tabla 6.8. se detallan los compuestos nitrogenados descritos hasta ahora en Opistobranquios.

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Stylocheilus longicauda</i>		
stylocheilamide		Mynderse et al. (1977)
deacetoxystylocheilamide		Rose (1975)
<i>Aplysia limacina</i>		
aplysioviolina		Rüdiger (1967)
<i>Aplysia californica</i>		
aplysioviolina		Siegelmann et al. (1968)
murexina		Chapman y Fox (1969)
neuropéptidos varios		Langlais y Blakenship (1972)
octopamina		Saavedra et al., (1974)
		Blakenship et al. (1975)
		Weiss et al. (1992)
		Kobayashi y Suzuki (1992)
<i>Aplysia punctata</i>		
uroporfirina I		Kennedy y Vevers (1953)
<i>Aplysia kurodai</i>		
aplysepine		Ojika et al. (1992)
piperazine (2 isómeros)		Kigoshi et al. (1990)
aplaminone		
neoaplaminone		
neoaplaminone sulfato		
<i>Aplysia dactylomela</i>		
N-methyl-indol		Schmitz et al. (1981, 1982)
2 indoles		Kato (1984)
<i>Aplysia juliana</i>		
2 indoles		Kato (1984)
<i>Bursatella leachi plei</i>		
bursatellina		Gopichand y Schmitz (1980)
<i>Bursatella leachi leachi</i>		
bursatellina		Cimino et al. (1987b)
<i>Bursatella leachi savignyana</i>		
bursatellina		Cimino et al. (1987b)
<i>Dolabella auricularia</i>		
dolastatina-1, 2, 3, 4, 5, 6,		Pettit et al. (1976,
dolastatina-7, 8, 9, 10, 11,		1982, 1987, 1989a,
dolastatina-12, 13, 14 y 15		1989b, c y d)

<i>Akera bullata</i>	
uroporfirina I	Kennedy y Vevers (1953)
<i>Navanax inermis</i>	
navenone A	Sleeper y Fenical (1977)
<i>Philinopsis (Aglaja) depicta</i>	
adenosine	Cimino et al. (1986a)
<i>Glossodoris quadricolor</i>	
latrunculina-B	Mebs (1985)
<i>Chromodoris lochi</i>	
latrunculina-A	Kakou et al. (1987) Corley et al. (1988)
<i>Chromodoris elizabethina</i>	
latrunculina-A	Corley et al. (1988)
<i>Chromodoris willani</i>	
latrunculina-A	Corley et al. (1988)
<i>Chromodoris sp</i>	
latrunculina-A	Corley et al. (1988)
<i>Notodoris citrina</i>	
comp. nitrogenados	Carmely et al. (1989)
<i>Roboastria tigris</i>	
tambjamina-A, B, C y D	Carté y Faulkner (1983, 1986)
<i>Tambja eliora</i>	
tambjamina-A, B, C y D	Carté y Faulkner (1983, 1986)
<i>Tambja abdere</i>	
tambjamina-A, B, C y D	Carté y Faulkner (1983, 1986)
<i>Nemrotha cristata</i>	
tambjamina-A y C	Paul et al. (1990)
tetrapyrrole	
aldehido	
<i>Nemrotha kubaryana</i>	
tambjamina-A y C	Paul et al. (1990)
tetrapyrrole	
aldehido	
<i>Nemrotha sp</i>	
tambjamina-A, C, E y F	Paul et al. (1990)
tetrapyrrole	
aldehido	

<i>Phestilla melanobrachia</i>		
5 indole alcaloides	Okuda et al. (1982)	
hokopurina	Okuda (1983)	
<i>Phestilla lugubris (P. sibogae)</i>		
homarina	Targett et al. (1983)	
<i>Duvaucelia (Tritonia) plebeia</i>		
uroporfirina I	Kennedy y Vevers (1953)	
<i>Janolus cristatus</i>		
janolusimida	Cimino et al. (1986a)	
	Sodano y Spinella (1986)	

Tabla 6.8. Compuestos nitrogenados hallados en Moluscos Opistobranquios.

El compuesto aplysiovioletina, que caracteriza las secreciones purpúreas de varias especies del género *Aplysia*, es un pigmento nitrogenado de tipo biliar (anillo tetrapirrólico). Este compuesto fue descrito en 1967 por Rüdiger, aunque se intentaba su caracterización desde 1925, para la especie *Aplysia limacina*. En *Aplysia californica* la aplysiovioletina representa el 75% del pigmento total (Siegelmann et al., 1968), y el resto son ácidos libres con trazas de otros compuestos relacionados con la molécula citada. Según Prota (1980), se puede asumir que el pigmento principal de las secreciones purpúreas de *Aplysia punctata* (Lederer y Hutterer, 1942), *A. depilans* (Christomanos, 1955), y *A. kurodai* (Nishibori, 1960), todos ellos analizados previamente al trabajo de Rüdiger, es también aplysiovioletina.

Las dolastatinas son péptidos presentes en *Dolabella auricularia* a muy bajas concentraciones, (100 kg de peso húmedo de esta especie dieron 1 mg de cada dolastatina de la 1 a la 9), (Pettit et al., 1976). Estos péptidos son los agentes antineoplásicos más potentes conocidos (Munro et al., 1987), y sin embargo son todavía desconocidos estructuralmente. La estructura de la dolastatina-3 fue descrita por Pettit et al. (1982), aunque según Faulkner (1984) y Krebs (1986) no era correcta. Pettit et al. (1987b) consiguieron finalmente averiguar su estructura. En posteriores estudios se hallaron el resto de dolastatinas (ver Tabla 6.8.).

La murexina, que fue la primera toxina marina cuya estructura fue totalmente elucidada (Hashimoto, 1979), descrita para *Murex* spp, fue también hallada por Blakenship *et al.* (1975) en *Aplysia californica*.

Johannes en 1963 describió en *Phyllidia varicosa* una secreción tóxica, de pH neutro, de la que daba algunas características sin identificar el compuesto activo. Señalaba, además, un fuerte olor asociado al desprendimiento de muco, que desaparecía al inactivar la toxina. Posteriormente Burreson *et al.* (1975) aislaron un compuesto que llamaron 9-isocyanopupukeanane. Las isocyanopupukeananes poseen un esqueleto único entre los sesquiterpenoides, con un grupo isonitrilo, y han sido por ello objeto de numerosos estudios de síntesis (Piers y Winter, 1982, y referencias allí citadas). Los compuestos de *Phyllidia* spp se han incluido por su estructura en la Tabla 6.3 (sesquiterpenos), si bien son también compuestos nitrogenados. Algo similar sucede con los macrólidos de *Hexabranchus*, que se relacionan en la Tabla 6.1.

6.6. Origen biosintético mixto.

Se incluyen aquí los compuestos que poseen esqueletos derivados de al menos dos vías diferentes de entre las comentadas anteriormente.

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIAS
<i>Haminoea hydatis</i>		
	haminol-A y B	Cimino <i>et al.</i> (1987a) Passeggio (1989)
<i>Haminoea navicula</i>		
	haminol-A y B	Cimino <i>et al.</i> (1987a, 1991b) Passeggio (1989)
<i>Haminoea orteai</i>	haminol-A, B y C	Spinella <i>et al.</i> (1992b y c, 1993)
<i>Haminoea orbignyana</i>	haminol-1 y 2	Spinella <i>et al.</i> (1992b y c, 1993)

<i>Haminoea fusari</i>		
haminol-1, 2, 3, 4 , 5, y 6		Spinella et al. (1992, 1993)
<i>Akera bullata</i>		
?haminol		Cimino et al. (1987a) Passeggio (1989)
<i>Aplysia dactylomela</i>		Gerwick y Whatley (1989)
stypoldione		González et al. (1983b, 1987)
epitaondiol		
3-keto-epitaondiol		
10,18-dihidroxi-7,8-epoxydolabelladiene		
dolabellane epóxido		
<i>Dolabella californica</i>		Ireland et al. (1976)
dolabelladienes		
<i>Umbraculum mediterraneum</i>		
umbraculuminas A, B y C	Cimino et al. (1988a, 1989a) Gavagnin et al. (1990)	
<i>Doris verrucosa</i>		
verrucosinas A y B	Cimino et al. (1988c)	
xylosil-MTA	Gavagnin et al. (1990)	
	esta Tesis	
<i>Anisodoris nobilis</i>		
N ¹ -methylisoguanosina (o doridosina)	Furhman et al. (1980, 1981), Kim et al. (1981)	
<i>Archidoris montereyensis</i>		
agathanoic acid glycerides	Gustafson et al. (1984)	
drimanoic acid glycerides	Gustafson y Andersen (1985)	
farnesoid acid glycerides	Faulkner et al. (1990)	
<i>Archidoris odhneri</i>		
farnesoic acid glycerides	Andersen y Sum (1980)	
agathanoic acid glycerides	Gustafson y Andersen (1985)	
drimanoic acid glycerides	Faulkner et al. (1990)	
<i>Archidoris tuberculata</i>		
acylglyceroles	Zubía et al. (en prensa)	
<i>Archidoris carvi</i>		
2 acylglyceroles	Zubía et al. (en prensa)	
<i>Austrodoris kerguelensis</i>		
5 acid glycerides	Davies-Coleman y Faulkner (1991)	

<i>Diaulula sandiegensis</i>	
isoguanosina	Furhman et al. (1981) Faulkner et al. (1990)
<i>Triopha catalinae</i>	
triophamina (diacylguanidina)	Gustafson y Andersen (1982 y 1985) Faulkner et al. (1990)
<i>Polycera tricolor</i>	
triophamina (diacylguanidina)	Gustafson y Andersen (1985)

Tabla 6.9. Compuestos de origen mixto descritos en Moluscos Opistobranquios.

En esta Tesis se ha trabajado con los compuestos de *Doris verrucosa*. Las verrucosinas presentan un origen mixto a partir de mevalonato y glicerol. Una discusión más amplia sobre los productos de esta especie se halla en el capítulo 5.12.

6.7. Otras sustancias.

En este apartado hemos incluido las sustancias ácidas, si bien no son metabolitos secundarios, junto con otros grupos de sustancias muy distintas que no encajaban en ninguno de los grupos revisados anteriormente.

Las sustancias ácidas de opistobranquios fueron revisadas por Thompson (1960b) y por Edmunds (1968a), si bien al parecer fue Panceri (1869) el primero en detectar la secreción ácida en *Pleurobranchus*, *Berthella* y *Philine*. En la Tabla 6.10. se incluyen las especies en las que se ha investigado la presencia o ausencia de dichas secreciones de tipo ácido.

ESPECIE	SECRECION ACIDA	REFERENCIA
<i>Aplysia punctata</i>	-	Thompson (1960b)
<i>Acteon punctocaelatus</i>	+	Paine (1963)
<i>Scaphander lignarius</i>	-	Thompson (1960b)
	-	esta Tesis
<i>Philine quadripartita</i>	+	Thompson (1960a, b)
<i>Philine aperta</i>	+	Thompson (1960a, b)
	+	Thompson (1983)
	+	Thompson (1986)
	+ Thompson y Gathercole (1986)	
	+	esta Tesis
<i>Aglaja tricolorata</i>	-	esta Tesis
<i>Philinopsis depicta</i>	-	Fasulo et al. (1982)
<i>Berthella plumula</i>	+	Thompson (1960a, b, 1970, 1976)
	+	esta Tesis
<i>Berthella stellata</i>	+	Thompson y Colman (1984)
	+	esta Tesis
<i>Berthella pellucida</i>	+	Thompson (1969, 1970)
<i>Berthella aurantiaca</i>	+	Franc (1968)
	+	esta Tesis
<i>Berthella ocellata</i>	+	esta Tesis
<i>Berhellina citrina</i>	+	Thompson (1969, 1970)
	+	Edmunds y Thompson (1972)
	+	Marbach y Tsurnamal (1973)
	+	Thompson y Colman (1984)
<i>Pleurobranchus (Oscanius) membranaceus</i>		
	+	Garstang (1890)
	+	Thompson y Slinn (1959)
	+	Thompson (1960b, c, 1976)
	+	Ros (1973, 1976b)
	+	Thompson y Colman (1984)
	+	esta Tesis
<i>Pleurobranchus areolatus</i>	+	Edmunds (1968)
<i>Pleurobranchus peroni</i>	+	Thompson (1969, 1970)
	+	Edmunds y Thompson (1972)
<i>Pleurobranchus ovalis</i>	+	Thompson (1969, 1970)
<i>Pleurobranchus forskali</i>	+	Thompson (1969, 1970)
	+	Marbach y Tsurnamal (1973)
<i>Pleurobranchus californicus</i>	+	Thompson (1969)
<i>Pleurobranchus semperi</i>	+	Edmunds y Thompson (1972)
<i>Pleurobranchus sp</i>	+	Marbach y Tsurnamal (1973)
<i>Pleurobranchaea meckeli</i>	+	Ros (1973, 1976b)
	+	esta Tesis
<i>Pleurobranchaea maculata</i>	+	Thompson (1969, 1970)
	+	Thompson y Colman (1984)
<i>Pleurobranchaea sp</i>	+	Paine (1963)
<i>Gastropterion meckeli</i>	-	esta Tesis
<i>Umbraculum mediterraneum</i>	-	Thompson y Colman (1984)
	-	esta Tesis

<i>Umbraculum sinicum</i>	-	Thompson (1970)
<i>Tylobranchus corticalis</i>	-	Thompson (1970)
<i>Elysia viridis</i>	-	Thompson (1960b)
<i>Hexabranchus marginatus</i>	-	Edmunds (1968b)
<i>Hypselodoris villafranca</i>	-	Ros (1976b)
<i>Hypselodoris cantabrica</i>	-	esta Tesis
<i>Hypselodoris webbi</i>	-	Ros (1976b)
<i>Hypselodoris tricolor</i>	-	esta Tesis
<i>Chromodoris luteorosea</i>	-	esta Tesis
<i>Chromodoris purpurea</i>	-	esta Tesis
<i>Chromodoris britoi</i>	-	esta Tesis
<i>Glossodoris gracilis</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Glossodoris neona</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Glossodoris annulata</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Glossodoris cincta</i>	-	Rogers y Paul (1991)
<i>Glossodoris pallida</i>	-	Rogers y Paul (1991)
<i>Glossodoris hikuerensis</i>	-	Rogers y Paul (1991)
<i>Ceratosoma cornigerum</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Rostanga rufescens</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Jorunna tomentosa</i>	-	Thompson (1960b)
<i>Doris verrucosa</i>	+	Edmunds (1968a) esta Tesis
<i>Ctenodoris aurantiaca</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Archidoris pseudoargus</i>	-	Thompson (1960b) Edmunds (1968a)
<i>Archidoris tuberculata</i>	-	esta Tesis
<i>Peltodoris atromaculata</i>	-	esta Tesis
<i>Discodoris pusae</i>	+	Edmunds (1968a)
<i>Discodoris tema</i>	+	Edmunds (1968a)
<i>Discodoris palma</i>	+	Thompson (1969, 1975)
<i>Discodoris heathi</i>	+	Thompson (1969) esta tesis
<i>Discodoris rosi</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Anisodoris stellifera</i>	+	Ros (1976b) esta Tesis
<i>Geitodoris planata</i>	-	Perrone (1992)
<i>Geitodoris portmanni</i>	+	Perrone (1992)
<i>Platydoris argo</i>	-	esta Tesis
<i>Aegires punctilucens</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Aegires villosus</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Polycera elegans</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Polycera quadrilineata</i>	-	Thompson (1960b) Edmunds (1968a) Edmunds (1968a)
<i>Polycerella conyna</i>	-	Edmunds (1968a) esta Tesis
<i>Limacia clavigera</i>	-	Thompson (1960b) Edmunds (1968a)
<i>Acanthodoris pilosa</i>	-	Thompson (1960b) Edmunds (1968a)
<i>Onchidoris pusilla</i>	-	Thompson (1960b)
<i>Onchidoris muricata</i>	-	Thompson (1960b)

<i>Onchidoris fusca</i>	-	Thompson (1960b)
	+	Edmunds (1968a)
	+	Potts (1970)
<i>Lamellidoris bilamellata</i>	+	Edmunds (1968a)
<i>Diaphorodoris papillata</i>	-	esta Tesis
<i>Adalaria proxima</i>	-	Thompson (1958)
	-	Thompson (1960b)
<i>Goniodoris nodosa</i>	-	Thompson (1960b)
	-	Edmunds (1968a)
<i>Goniodoris castanea</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Okenia aspersa</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Okenia implexa</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Dendrodoris limbata</i>	-	esta tesis
<i>Dendrodoris grandiflora</i>	-	esta tesis
<i>Dendrodoris nigra</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Dendrodoris rubra</i>	-	Edmunds (1968a)
<i>Doriopsilla areolata</i>	-	esta Tesis
<i>Doriopsilla albopunctata</i>	-	Fuhrman et al. (1979)
	+	Ghiselin (1964)
<i>Duvaucelia plebeia</i>	-	Thompson (1960b)
<i>Tritonia hombergi</i>	-	Thompson (1960b)
<i>Marionia blainvillea</i>	-	esta Tesis
<i>Tethys fimbria</i>	-	esta Tesis
<i>Melibe leonina</i>	-	Ajeska y Nybakken (1976)
<i>Melibe fimbriata</i>	-	Thompson y Crampton (1984)
<i>Dendronotus frondosus</i>	-	Thompson (1960b)
<i>Doto coronata</i>	-	Thompson (1960b)
<i>Hero formosa</i>	-	Thompson (1960b)
<i>Eubranchus tricolor</i>	-	Thompson (1960b)
<i>Facelina auriculata</i>	-	Thompson (1960b)

Tabla 6.10. Especies de Moluscos Opistobranquios en los que se ha investigado si presentan o no secreción de tipo ácido (+=presente, -= ausente).

Entre los ácidos implicados en este tipo de secreciones se encuentran los iones Cl^- y SO_4^{2-} , tal y como han demostrado los numerosos estudios de Thompson relacionados en la Tabla 6.10. Una revisión sobre las secreciones ácidas fue realizada por Long (1970). Las secreciones ácidas invalidan, en cierta manera, otras secreciones de metabolitos secundarios, ya que un pH muy bajo alteraría posiblemente su estructura.

En cuanto al resto de sustancias incluidas en este capítulo, vamos a comentar brevemente algunas de ellas. Watson (1973) describió que los extractos de *Dolabella auricularia*, *Aplysia pulmonica*, *Stylocheilus longicauda* y *Dolabrilera dolabrilera* presentaban efectos tóxicos. Se

mencionaba una toxina soluble en éter etílico y otra en agua. Los metabolitos de *S. longicauda* fueron posteriormente identificados por Scheuer (1975) y Kato y Scheuer (1974 y 1975) como ya hemos mencionado, así como los compuestos de *Dolabella auricularia*, mientras que el resto no ha sido todavía resuelto.

Blakenship *et al.* (1975) describieron la presencia de acetilcolina en la fracción acuosa de la glándula digestiva de *Aplysia californica*. Reel y Fuhrman (1981) citaron un antagonista de la acetilcolina en la secreción mucosa de *Doriopsilla albopunctata* (=*Dendrodoris fulva*), soluble en agua y estable al calor. Una colina fue descrita en *Aplysia brasiliensis* (De Freitas, 1977), y otras sustancias colinomiméticas se citaron en *A. californica* y *A. vaccaria* (Winkler, 1961; Winkler *et al.*, 1962; Winkler y Tilton, 1962). Un estudio sobre la neurosecreción en opistobranquios se puede hallar en Vicente (1969).

Las investigaciones sobre la secreción coloreada de *Aplysia* spp se resumen en Carefoot (1987, y referencias allí mencionadas), siendo las causantes básicamente cromoproteínas (aplysióviolina, aplysiórodina y aplysióazurina), algunas de las cuales ya han sido comentadas en este capítulo. Un terpeno no identificado se halló en la secreción de la glándula opalina de *Aplysia depilans* (Flury, 1915), y un terpenoide aldehido no identificado se describió para las puestas de *Hypselodoris infucata* (Karusso, 1987).

En la revisión de Shimizu y Kamiya (1983) sobre biopolímeros de tipo proteico, se citan las aglutininas de especificidad indeterminada en *Aplysia sp.* (McKay *et al.*, 1969), *Aplysia californica* (Pauley *et al.*, 1971; Pauley, 1974 a y b) y *Dendrodoris gunnamata* (McKay *et al.*, 1969), mientras que el resultado fue negativo en *Hexabranchus imperialis*. En *Aeolidia papillosa* se observó que eran anti-B (Rogers, 1977). *Aplysia* sp presenta los biopolímeros aplysiánin-A y E, según Adamson *et al.* (1989).

Voogt (1972) menciona el análisis de fosfolípidos realizado por Roots y Johnston (1965) con *Aplysia punctata*. Estos autores observaron tres tipos de fosfolípidos, uno de los cuales era predominante sobre los otros dos.

Una sustancia no identificada que aparece en el momento del desarrollo del sistema motor en embriones de nudibranquios (básicamente *Dendronotus frondosus*), fue estudiada por Buznikov y Manukhin (1962).

6.8. Breve discusión química.

La mayor parte de los metabolitos descritos en Moluscos Opistobranquios son terpenoides, y entre ellos los sequiterpenos y diterpenos son los más abundantes, como se puede ver en la Tabla 6.11. Sin embargo, los no-terpenoides presentan también un enorme interés, destacando como ejemplos significativos las tambjaminas, las prostaglandinas de *Tethys fimbria* y los compuestos de *Cyerce crystallina*.

COMPUESTOS	(1)	(2)
Acetilenos	750	20
Polikétidos	500	45
Macrólidos	100	25
Monoterpenos	1200	25
Sesquiterpenos	1000	130
Diterpenos	1000	100
Esteroides	1950	50
Carotenoides	500	12
Compuestos nitrogenados	610	55
Alcaloides	8900	-
Coumarinas	800	-
Lignanos	50	-
Flavonoides	3325	-
Antibióticos	5500	-

Tabla 6.11. Número de productos naturales descritos (1)= datos extraídos de Luckner (1984), (2)= número aproximado en Moluscos Opistobranquios según los datos de esta Tesis.

En la revisión efectuada en esta Tesis se incluyen unas 200 especies. Naturalmente, gran parte de la diferencia respecto a las revisiones anteriores se debe a los trabajos publicados en los últimos años, incluyendo en ellos las aportaciones de esta Tesis.

Al considerar las proporciones de los distintos tipos de sustancias descritas, hay que tener en cuenta que los terpenoides son los compuestos más liposolubles, y esto implica un sesgo debido a la técnica de extracción empleada. Por otro lado, hay que considerar que frecuentemente los trabajos químicos no incluyen ni siquiera una línea dedicada a describir los ejemplares con los que se trabaja. Esto significa, entre otras cosas, que sea imposible comprobar cuál era dicha especie, o por ejemplo, si se trata de un grupo de especies no descritas de morfología muy similar (como podría ser quizás el caso de *Cadlina luteomarginata*). Esto podría solventarse fácilmente si se conservaran ejemplares en los laboratorios (como se empieza a hacer en algunos casos), y además se asegurara su identificación por algún taxónomo. Otra posibilidad sería adjuntar una breve descripción de los ejemplares, o identificar los ejemplares en el marco de un estudio multidisciplinario entre biólogos y químicos.

6.9. Catálogo de las sustancias naturales en Opistobranquios del Mediterráneo Occidental y Atlántico próximo.

Se incluye a continuación (Tabla 6.12.) un listado de especies de moluscos opistobranquios del Mediterráneo Occidental y Atlántico próximo, en los que se ha comprobado que poseen substancias naturales de interés por su estructura química, su origen y/o su función en ecosistemas bentónicos. Se incluyen datos sobre el origen y la actividad de estas substancias, los lugares de procedencia de los animales estudiados y las referencias bibliográficas relacionadas.

El catálogo incluye las especies de moluscos Opistobranquios en las que se han estudiado los metabolitos secundarios. Los esteroles y sus derivados no se han incluido, exceptuando el petrosterol y algunos esteroides que hemos considerado de interés. En el caso de existir secreciones externas descritas, éstas se han incluido también en el listado.

La Tabla 6.12. se estructura en cinco columnas. La primera incluye los nombres específicos siguiendo los criterios de Cervera *et al.* (1988); si fue citada con otro nombre éste se encuentra a continuación entre paréntesis. Las referencias bibliográficas se encuentran también en esta columna. Las sustancias halladas y las secreciones se sitúan en la segunda columna. En el resto de columnas se detalla el origen de los metabolitos, el tipo de actividad y el área de procedencia de los animales estudiados.

Códigos de origen:

- B. Biosíntesis de novo.
- S. Esponjas.
- A. Algas.
- C. Cnidarios.
- O. Otros Opistobranquios.
- . Origen desconocido.
- ? . Origen hipotético.

Códigos de actividad:

- I. Ictiotoxicidad.
- D. Repelencia (Feeding deterrence).
- P. Feromona de alarma.
- C. Citotoxicidad para *Artemia salina*.
- T. Promotor de tumores.
- A. Autotoxicidad (tóxico para el propio animal).
- R. Regenerador para *Hydra*.
- N. Neurotóxico para ratón.
- U. Toxicidad no especificada.
- . Actividad desconocida.
- ? . Actividad hipotética. (Basándonos en sustancias de estructura similar con actividad demostrada).

Generalmente los tests se han realizado con las sustancias aisladas, para determinar su actividad. La metodología de algunos de estos tests ha sido ya explicada en el apartado 4.5., aunque se hallará una discusión más amplia en el apartado 7.4. Los tests más utilizados son los dos primeros de la lista. El resto de códigos se refieren a ciertas especies en las que, por razones químicas o bioquímicas, se sospechaba que podían presentar una determinada actividad, y se hicieron los tests para confirmarlo. En otros casos no se han realizado tests, o al menos no se han publicado los resultados (en el listado se ha representado mediante el símbolo -). Los resultados

negativos se representan como "no" seguido del código de actividad correspondiente.

Los metabolitos secundarios que intervienen en la comunicación química, como veremos en el capítulo 7.4., pueden ser clasificados en tres grupos básicos, según su función biológica, que son: alomonas, kairomonas y feromonas (Brown, 1975). Las alomonas serían las sustancias químicas involucradas en las interacciones interespecíficas que beneficiarían al organismo productor (las más conocidas serían las usadas como repelentes), mientras que las kairomonas beneficiarían al organismo receptor; y feromonas serían las sustancias químicas utilizadas en la comunicación intraespecífica.

Códigos de área:

El área incluida en este catálogo está dividida en cinco zonas. La zona 1 incluye la costa Oeste de Italia (Mar Tirreno y Jónico). La zona 2 incluye el Sur de Francia y la parte Noreste de la Península Ibérica (costas catalanas, valencianas y las Islas Baleares). La zona 3 comprende el Sur de la Península Ibérica. La zona 4 comprende el Cantábrico (Asturias, Cantabria y País Vasco, en el norte de la Península Ibérica); se incluyen aquí algunas referencias al Sur de Inglaterra que hemos considerado de interés. Y, finalmente, la zona 5 abarca las Islas Canarias.

Las zonas que hemos usado en el catálogo no han sido estudiadas por igual. La costa italiana es la más estudiada, presentando un 60% de los productos listados en este catálogo. Esto es debido a la presencia en Nápoles de uno de los grupos de investigación en productos naturales marinos más productivo en el mundo (I.C.M.I.B.-C.N.R., Nápoles, Italia).

Una amplia discusión sobre el origen, función y otros aspectos relativos a dichas sustancias se puede hallar en los capítulos siguientes (7.1. a 7.4.).

ESPECIES (referencias)	SUSTANCIAS	ORIGEN	ACTIVIDAD	AREA
Orden Cephalaspidea				
<i>Acteon tornatilis</i> (72, 128, +)	secreción púrpura	-	U	4
<i>Scaphander lignarius</i> (31, 40, 82)	secreción amarilla viscosa lignarenone-A lignarenone-B	- - -	- P? P?	4 1 1
<i>Philine aperta</i> (129, 130, 133, *)	ácido sulfúrico ácido clorhídrico secreción ácida	- - -	D? D? -	4 4 2
<i>Gastropteron meckeli</i> (*)	compuesto relacionado con el 4-colestén-3-one	-	-	2
<i>Phlinopsis depicta</i> (Aglaja depicta, 26, 29, 33, 47, 102, 139, *)	aglajne-1 aglajne-2 aglajne-3 adenosine haminol-A haminol-B compuesto relacionado con el 4-colestén-3-one	O O O - O O	- - - - P P	1 1 1 1 1 1 1
<i>Bulla striata</i> (33, 139)	aglajne-1 aglajne-2 aglajne-3	- - -	- - -	1 1 1
<i>Haminoea hydatis</i> (31, 102)	haminol-A haminol-B	- -	P P	1 1
<i>Haminoea navicula</i> (31, 47, 102)	haminol-A haminol-B	- -	P P	1 1
Orden Anaspidea				
<i>Akera bullata</i> (31, 99, 102, *)	secreción púrpura ?haminol	- O?	- -	4 1
<i>Aplysia depilans</i> (50, 70, 97, 128)	secreción de tinta secreción blanca dictyol A dictyol B dictyol C dictyol D pachydictyol A	- - A A A A A	D? - - - - - -	1 4 1 1 1 1 1

<i>Aplysia dactylomela</i> (70, 78)	secreción de tinta - diterpeno trioxigenado	-	D?	1
		-	-	5
<i>Aplysia fasciata</i> (A. limacina, 70, 91, 122 , 128)	secrecion de tinta - secreción púrpura - secreción blanca - monoterpenos polihalogenados A 4-acetyl-aplyku- rodina-B aplykurodinone-B	-	D - - -	1 4 4 1 1 1
<i>Bursatella leachii</i> (32, 107)	bursatellina	-	-	1
Orden Sacoglossa				
<i>Oxynoe olivacea</i> (43, 56, 101, 123)	oxytoxin-1 oxytoxin-2	A A	I, D, C, R -	1 1
<i>Cyerce crystallina</i> (54, 56, 136)	cyercene-A cyercene-B cyercene-1 cyercene-2 cyercene-3 cyercene-4 cyercene-5	B B B B B B B	I, R I - I I I -	1 1 1 1 1 1 1
<i>Placida dendritica</i> (137)	placidene-A iso-placidene-A placidene-B iso-placidene-B	B? B? B? B?	I, no R I, no R I, no R I, no R	1 1 1 1
<i>Ercolania funerea</i> (138)	cyercene-B 12-norcyercene-B 7-methylcyercene-B 7-methyl-12-norcyercene-B 7-methylcyercene-2 7-methylcyercene-1	B B B B B B	I R I I, R - R	1 1 1 1 1 1
Orden Notaspidea				
<i>Tylorella perversa</i> (13, 29)	?compuestos bromados	S	-	1
<i>Umbraculum mediterraneum</i> (35, 38, 76)	umbraculumina-A umbraculumina-B umbraculumina-C	- - -	I no I I	1 1 1

<i>Pleurobranchus membranaceus</i>					
(108, 126, 127, 128,	ácido sulfúrico	-	D?	4	
129, 131, *)	ácido clorhídrico	-	D?	4	
	secreción ácida	-	D?	2	
<i>Berthella plumula</i>					
(125, 126, 128, *)	secreción ácida	-	D?	4	
	ácido sulfúrico	-	-	4	
<i>Berthella aurantiaca</i>					
(*)	secreción ácida	-	-	1, 2, 4	
	comp. purínicos	-	-	4	
<i>Berthella stellata</i>					
(*)	secreción ácida	-	-	4	
<i>Bertella ocellata</i>					
(*)	secreción ácida	-	-	1	
<i>Pleurobranchaea meckeli</i>					
(108, *)	secreción ácida	-	-	1, 2	

Orden Nudibranchia

<i>Trapania lineata</i>					
(*)	compuesto relacionado con el 4-colestén-3-one	-	-	2	
<i>Hypselodoris villafranca</i>					
(<i>H. gracilis</i> , 4, 6, 19, 56, 71, *)	longifolina	S	I, D	1, 2, 4	
	dendrolasina	S?	D	4	
	nakafurano-9	S	D	1, 4	
	tavacfurano	S?	D	4	
	agassizina	S?	-	4	
	<i>iso</i> -nakafurano-9	S?	D	4	
	ent-furodysinina	S?	I, D	4	
	<i>iso</i> -dehidrodendro- lasina	S?	-	4	
<i>Hypselodoris tricolor</i>					
(4, 56, 71, *)	longifolina	S?	I, D	4	
	dendrolasina	S?	D	4	
	nakafurano-9	S	D	4	
	tavacfurano	S?	D	4	
	agassizina	S?	-	4	
	<i>iso</i> -nakafurano-9	S?	D	4	
	ent-furodysinina	S?	I, D	4	
	<i>iso</i> -dehidrodendro- lasina	S?	-	4	
<i>Hypselodoris webbi</i>					
(<i>Glossodoris valen-</i> <i>ciennensi</i> , 4, 6, 22, 56, 73, *)	longifolina	S	I, D	1, 2, 3	
	nakafurano-9	S?	D	1, 2	
	<i>iso</i> -tavacfurano	S?	-	2	

<i>Hypselodoris orsini</i>					
(<i>Glossodoris tricolor</i> , 22, 48', *)	furoscalarol	S	D	1	
	deoxoscalarina	S	D	1,2	
	6-oxo-deoxoscalarina	S	-	1,2	
<i>Hypselodoris cantabrica</i>					
(4, 56, 71, *)	longifolina	S?	I, D	4	
	dendrolasina	S?	D	4	
	nakafurano-9	S	D	4	
	tavacfurano	S?	D	4	
	agassizina	S?	-	4	
	iso-nakafurano-9	S?	D	4	
	ent-furodysinina	S?	I, D	4	
	iso-dehidrodendrolasina	S?	-	4	
<i>Chromodoris luteorosea</i>					
(4, 44, 56, 77, *)	luteorosina	S?	I	1,4	
	12-epi-aplysillina	S?	I	1	
	12-epi-12-deace-tyl-aplysillina	S?	I	1	
	macfarlandina A	S?	I	1,4	
	norrisolide	S?	I	4	
	polyrhaphyna-C	S?	I	4	
	chelonaplysina-C	S?	I	4	
<i>Chromodoris purpurea</i>	luteorosina(!)	S?	-	1,4	
(4, 56, *)	macfarlandina(!)	S?	-	1,4	
	norrisolide(!)	S?	-	4	
	polyrhaphyna-C(!)	S?	-	4	
	chelonaplysina-C(!)	S?	-	4	
<i>Chromodoris krohni</i>	luteorosina(!)	S?	-	1,4	
(4, 56, *)	macfarlandina(!)	S?	-	1,4	
	norrisolide(!)	S?	-	4	
	polyrhaphyna-C(!)	S?	-	4	
	chelonaplysina-C(!)	S?	-	4	
<i>Chromodoris britoi</i>	luteorosina(!)	S?	-	2	
(*)	macfarlandina(!)	S?	-	2	
	norrisolide(!)	S?	-	2	
	polyrhaphyna-C(!)	S?	-	2	
	chelonaplysina-C(!)	S?	-	2	
<i>Doris verrucosa</i>	verrucosina-A	B	I, T	1,2,4	
(2, 3, 17, 30, 37, 76, 106, *)	verrucosina-B	B	I, T	1,2,4	
	xylosyl-MTA	B	-	1,2,4	
	oxima ác. pirúvico	S	-	1,2	

<i>Peltodoris atromaculata</i>				
(13, 14, 19, 20, 25, petrosterol 42, *)	S	-	1,2	
poliacetilos	S	-	1,2	
petroformyna 1	S	C	1	
petroformyna 2	S	C	1	
petroformyna 3	S	C	1	
petroformyna 4	S	C	1	
<i>Discodoris stellifera secreción ácida</i>	-	-	1,4	
(<i>Anisodoris stellifera</i> , 59, 108, *)				
<i>Discodoris indecora fasciculatina</i>	S	D, no I	3	
(96)				
<i>Platydoris argo</i>	compuesto relacionado con el			
(*)	4-colestén-3-one	-	-	2
<i>Phyllidia pulitzeri</i>	isocyanosesqui-			
(22, 29, 139)	quiterpenos	S	-	1
	axisonitrilo-1	S	I, no D	1
<i>Dendrodoris limbata</i>	polygodial	B	D, A	1,2
(5, 21, 22, 23, 27, 29, 36, *)	olepupuana	B	-	1,2
	7-deacetoxy-olepu-			
	puana	B	-	1,2
	ésteres drimánicos	B	-	1,2
	euryfurano	B	-	1,2
<i>Dendrodoris grandiflora</i>				
(5, 19, 28, 29, 36, *)	polygodial	B	D	1
	olepupuana	B	-	1
	7-deacetoxyolepu-			
	puana	B	-	1
	6-β-acetoxyole-			
	pupuana	B	D	1
	ésteres drimánicos	B	-	1
	fasciculatina	S	-	1
	microcionina-1	S	-	1
	microcionina-2	S	-	1
	microcionina-3	S	-	1
	microcionina-4	S	-	1
	furospingina-1 ace-			
	tato	S	-	1
	cromanoles prenilados	S	-	1
	C-21 furanoterpeno	S	-	1
<i>Doriopsilla areolata</i>	sesquiterpenos simi-			
(*)	lares a <i>Dendrodoris</i> -	-	2,4	
	comp. relacionado con el			
	4-colestén-3-one	-	-	2,4

<i>Tethys fimbria</i> (♀) (39, 46, 48, 52, 53, 55, 56, 95)	PGE ₂	B	no I	1
	PGE ₂ -1,15-lactona	B	I	1
	PGE ₂ -1,15-lacto- na-11-acetato	B	-	1
	PGE ₃	B	no I	1
	PGE ₃ -1,15-lactona	B	I	1
	PGE ₃ -1,15-lacto- na-11-acetato	B	I	1
	PGF ₂ α-1,15-lacto- na-11-acetato	B	no I	1
	PGF ₂ α-1,15-lactona ésteres ácidos grasos	B	no I	1
	PGF ₃ α-1,15-lacto- na-11-acetato	B	no I	1
	PGF ₃ α-1,15-lactona ésteres ácidos grasos	B	no I	1
	PGA ₂ -1,15-lactona	B	-	1
	PGA ₃ -1,15-lactona	B	I	1
<i>Armina maculata</i> (79, 80, 81)	verecynarmina A	C	-	2
	verecynarmina B	C	-	2
	verecynarmina C	C	-	2
	verecynarmina D	C	-	2
	verecynarmina E	C	-	2
	verecynarmina F	C	-	2
	verecynarmina G	C	-	2
	preverecynarmina	C	-	2
	cembrene-C	C	-	2
<i>Janolus cristatus</i> (29, 121)	janolusimida	B?	N	1
<i>Flabellina affinis</i> (18, 19)	esteroides polihidroxilados	C	-	1
<i>Flabellina lineata</i> (<i>Coryphella lineata</i> , 18, 19)	esteroides polihidroxilados	C	-	1
<i>Cratena peregrina</i> (<i>Hervia peregrina</i> , 18, 19)	esteroides polihidroxilados	C	-	1

Tabla 6.12. Catálogo de las sustancias naturales de Moluscos Opistobranquios del Mediterráneo Occidental y Atlántico próximo. (*= esta Tesis; @= PG significa prostaglandinas; += la secreción púrpura de *A. tornatilis* no ha sido observada por N. Yonow, com. pers., quien ha examinado en sus estudios más de 1000 ejemplares). (!)= Productos identificados mediante TLC.

7. DISCUSION GENERAL

7.1. Origen de las sustancias.

En este capítulo se revisa el origen de las sustancias naturales descritas en Moluscos Opistobranquios. Como se verá, los casos en que se conoce con certeza de dónde proceden los metabolitos son una minoría respecto al total de productos mencionados en el apartado anterior.

Según Faulkner *et al.* (1990), la presencia de un mismo producto en ejemplares de una especie procedentes de distintas áreas, implicaría un origen biosintético para los mismos, y, en cambio, un mismo producto en distintas especies en una misma área implicaría un origen dietético.

En total, de los Opistobranquios en los que se ha estudiado el origen de sus metabolitos, unos 60 los obtienen de sus presas mientras que 10 los fabrican mediante biosíntesis. En el resto de casos no se conoce de dónde proceden, aunque se discutirán algunos casos hipotéticos.

En eolidáceos, sus defensas proceden de la dieta (Edmunds, 1974, y referencias allí mencionadas), si bien es algo distinto a lo que aquí se trata.

7.1.1 Origen dietético.

Los productos de origen dietético, que son la mayoría de los descritos, dependen del tipo de productos que posea la presa, p. ej. esponjas (y éstas posiblemente de sus simbiontes). En los Opistobranquios del Mediterráneo, los metabolitos de origen dietético descritos hasta ahora proceden de esponjas, algas, cnidarios u otros opistobranquios, si bien en otras áreas geográficas se han descrito metabolitos procedentes de briozoos y ascidias, como se puede ver en la Tabla 7.1. Una revisión sobre la dieta de los Opistobranquios puede hallarse en Ros (1978a) y Todd (1981), aunque actualmente los datos son algo más numerosos.

Las referencias que se incluyen en la Tabla 7.1. se refieren a los trabajos en los que se ha demostrado la relación entre ambas especies, y en algunos casos se incluyen aquellas en las que se describieron los productos en

las especies presa. La cadena alimentaria sólo puede ser establecida con certeza cuando se detecta también la sustancia en el organismo que constituye la dieta (Hashimoto, 1979), habiéndose comprobado en muy pocos casos que algún precursor se transforme en otra sustancia en el depredador. La elaboración de estas tablas ha sido especialmente dificultosa debido a que en muchos casos se sugiere un origen dietético pero no se demuestra, y, algunas veces, en trabajos posteriores se asume este hecho como si hubiera sido ya demostrado.

OPISTOBRANQUIOS SUSTANCIA	PRESA REFERENCIA
ALGAS	
<i>Stylocheilus longicauda</i>	<i>Lyngbya majuscula</i>
aplysiatoxina	Scheuer (1977a)
debromoaplysiatoxina	Rose (1975)
stylocheilamida	
deacetoxystylocheilamida	
<i>Aplysia californica</i>	<i>Laurencia pacifica</i>
aplysina	<i>Laurencia johnstonii</i>
debromoaplysina	<i>Laurencia okamurai</i>
laurinterol	<i>Plocamium coccineum</i>
pacifenol	<i>Plocamium pacificum</i>
johnstonol	Faulkner et al. (1973, 1974)
pacifidiene	Faulkner y Stallard (1973)
pacifidiene dichloride	Stallard y Faulkner (1974a, b)
comp. polihalogenados	Mynderse y Faulkner (1974)
<i>Aplysia brasiliensis</i>	<i>Laurencia obtusa</i>
brasilenol	<i>Chondria cnicophylla</i>
brasilenol acetato	Stallard et al. (1978)
epibrasilenol	Dieter et al. (1979)
brasudol	
isobrasudol	
<i>Aplysia kurodai</i>	<i>Laurencia okamurai</i>
aplysinol	Yamamura e Hirata (1963, 1971)
aplysina	Irie et al. (1969)
debromoaplysina	Yamada et al. (1968)
aplysin-20	Matsuda et al. (1969)
<i>Aplysia punctata</i>	<i>Plocamium coccineum</i>
comp. halogenados	Quiñoa et al. (1989)

<i>Aplysia dactylomela</i>	<i>Cladophora fascicularis</i>
comp. brominado	<i>Laurencia snyderiae</i>
isoconcinndiol	<i>Stylopodium zonale</i>
stypoldione	Kuniyoshi et al. (1985)
epitaondiol	Rodríguez et al. (1989)
	Gerwick y Whatley (1989)
<i>Aplysia limacina</i>	<i>Plocamium cartilagineum</i>
monoterpenos halogenados	Imperato et al. (1977)
	Mynderse y Faulkner (1974)
<i>Aplysia depilans</i>	<i>Dictyota dichotoma</i>
dictyols	Minale y Riccio (1976)
	Fattorusso et al. (1976)
	Danise et al. (1977)
<i>Aplysia vaccaria</i>	<i>Dictyota crenulata</i>
crenulides	Midland et al. (1983)
acetoxycrenulide	Krebs (1986)
<i>Bosellia mimetica</i>	<i>Halimeda tuna</i>
diterpenoides	Gavagnin et al. (1992)
<i>Elysia sp</i>	<i>Chlorodesmis fastigiata</i>
chlorodesmina	Hay et al. (1989)
<i>Elysia translucens</i>	<i>Udotea petiolata</i>
diterpenoides	Gavagnin et al. (1992)

CNIDARIOS

<i>Cratena peregrina</i>	<i>Eudendrium sp</i>
esteroides polihidroxilados	Cimino et al. (1980a y b)
<i>Flabellina affinis</i>	<i>Eudendrium sp</i>
esteroides polihidroxilados	Cimino et al. (1980a y b)
<i>Flabellina (Flabellinopsis) iodinea</i>	<i>Eudendrium ramosum</i>
astaxanthin	McBeth (1972)
<i>Coryphella lineata</i>	<i>Eudendrium sp</i>
esteroides polihidroxilados	Cimino et al. (1980a y b)
<i>Phestilla melanobrachia</i>	<i>Tubastrea coccinea</i>
carotenoides	Scheuer (1982)
<i>Phyllodesmium longicirra</i>	<i>Sarcophyton trocheliophorum</i>
trocheliophoral	Coll et al. (1985)
<i>Fiona marina</i>	<i>Velella spirans</i>
pigmento azul	Kropp (1931)

<i>Armina maculata</i>	<i>Veretillum cynomorium</i>
<i>vereccynarminas</i>	Guerriero et al. (1987, 1988, 1990)
BRIozoos	
<i>Tambja abdere</i>	<i>Sessibusula translucens</i>
<i>tambjaminas</i>	Carte y Faulkner (1983, 1986)
<i>Tambja eliora</i>	<i>Sessibusula translucens</i>
<i>tambjaminas</i>	Carte y Faulkner (1983, 1986)
<i>Triopha carpenteri</i>	briozoos no identificados
<i>carotenoides</i>	McBeth (1972)
ASCIDIAS	
<i>Nemrotha cristata</i>	<i>Atapozoa sp</i>
<i>tambjaminas</i>	Paul et al. (1990)
<i>Nemrotha kubaryana</i>	<i>Atapozoa sp</i>
<i>tambjaminas</i>	Paul et al. (1990)
<i>Nemrotha sp</i>	<i>Atapozoa sp</i>
<i>tambjaminas</i>	Paul et al. (1990)
ESPONJAS	
<i>Tylodina perversa</i>	<i>Verongia aerophoba</i>
comp. bromados	Cimino et al. (1990c)
<i>Peltodoris atromaculata</i>	<i>Petrosia ficiformis</i>
poliacetilenos	Castiello et al. (1978, 1980)
petrosterol	Cimino et al. (1980b, 1982) esta Tesis
<i>Archidoris montereyensis</i>	<i>Halichondria panicea</i>
1-O-hexadecylglycerol	Gustafson y Andersen (1985)
<i>Doris verrucosa</i>	<i>Hymeniacidon sanguinea</i>
oxima ácido pirúvico	Avila et al. (1990a) esta Tesis
<i>Notodoris citrina</i>	<i>Leucetta chagosensis</i>
comp. nitrogenados	Carmely et al. (1989)
<i>Hexabranchus sanguineus</i>	<i>Halichondria sp</i>
dihydrohalichondramida	Pawlik et al. (1988)
tetrahydrohalichondramida	Kernan et al. (1988b)
33-methyldihydrohalichondramida	Matsunaga et al.
kabiramida-C	(1989)

<i>Cadlina luteomarginata</i>	<i>Dysidea fragilis</i>
sesquiterpeno no identificado	<i>Dysidea amblia</i>
pallescensina A	<i>Dysidea etheria</i>
furodysinina	<i>Dysidea sp</i>
idiadione	<i>Dysidea herbacea</i>
isonitrilo	<i>Axinella sp</i>
isothiocianato	Thompson et al. (1982)
furodysina	Hellou et al. (1982)
dihydropallescensina-2	
<i>Hypselodoris godeffroyana</i>	<i>Dysidea fragilis</i>
nakafurano-8	Schulte et al. (1980)
nakafurano-9	
<i>Hypselodoris villafranca</i>	<i>Dysidea fragilis</i>
longifolina	Avila et al. (1990b)
nakafuran-9	Cimino y Sodano (1989)
	Avila et al. (1991b)
	esta Tesis
<i>Hypselodoris webbi</i>	<i>Dysidea fragilis</i>
longifolina	Avila et al. (1990b)
nakafurano-9	Cimino y Sodano (1989)
	Avila et al. (1991b)
	esta Tesis
<i>Hypselodoris cantabrica</i>	<i>Dysidea fragilis</i>
nakafurano-9	esta Tesis
<i>Hypselodoris tricolor</i>	<i>Dysidea fragilis</i>
nakafurano-9	esta Tesis
<i>Hypselodoris orsini</i>	<i>Cacospongia mollior</i>
furoscalarol	<i>Spongia officinalis</i>
deoxoscalarina	Cimino et al. (1973, 1974, 1982, en prensa)
6-oxo-deoxoscalarina	Cafieri et al. (1977)
<i>Chromodoris maridadilus</i>	<i>Dysidea fragilis</i>
nakafurano-8	Schulte et al. (1980)
nakafurano-9	
<i>Chromodoris norrisi</i>	<i>Dendrilla sp</i>
norrisolide	Hochlowski et al. (1983a)
macfarlandina-E	<i>Aplysilla polyrhaphis</i>
shahamina C	Bobzin y Faulkner (1989a)
polyrhaphina A	
<i>Chromodoris lochi</i>	<i>Hyatella sp</i>
laulimalide	<i>Spongia mycofijiensis</i>
iso-laulimalide	Corley et al. (1988)
dendrolasina	Kakou et al. (1987)
latrunculin-A	

<i>Chromodoris tasmaniensis</i>	<i>Dendrilla sp</i>
6 diterpenoides	Karuso (1987)
<i>Chromodoris marislae</i>	<i>Aplysilla polyraphis</i>
varios comps. (no marislin)	Faulkner (1991)
	Bobzin y Faulkner (1989a)
<i>Chromodoris youngbleuthi</i>	<i>Spongia oceanica</i>
sesterterpeno	Terem y Scheuer (1986)
<i>Chromodoris funerea</i>	<i>Dysidea herbacea</i>
dibromophenoxytribromophenol	Carte et al. (1986)
scalarinas	<i>Spongia</i>
furodysinina	Kernan et al. (1988a)
furodysina	<i>Dysidea spp</i>
	Faulkner (1988a)
<i>Glossodoris quadricolor</i>	<i>Latrunculia magnifica</i>
latrunculina-B	Mebs (1985)
<i>Glossodoris pallida</i>	<i>Hyrtios erecta</i>
scalaradial	Rogers y Paul (1991)
deoxyscalarina	
<i>Glossodoris hikeurensis</i>	<i>Hyrtios erecta</i>
episcalaradial	Rogers y Paul (1991)
heteronemina	
<i>Glossodoris cincta</i>	<i>Hyrtios erecta</i>
episcalaradial	Rogers y Paul (1991)
heteronemina	
<i>Casella atromarginata</i>	<i>Spongia sp</i>
spongiatriol triacetato	De Silva y Scheuer (1982)
spongiatriol acetato	Kazlauskas et al. (1979)
<i>Jorunna funebris</i>	<i>Xestospongia sp</i>
quinonas	Gulavita et al. (1986)
	Gulavita (1987)
<i>Dendrodoris grandiflora</i>	<i>Ircinia fasciculata</i>
fasciculatina	<i>Microciona toxystila</i>
microcionina-1, 2, 3 y 4	<i>Spongia officinalis</i>
	Cimino et al. (1975a, 1980b, 1982, 1985b, 1986a, 1990c)
	Cafieri et al. (1972)
<i>Phyllidia pulitzeri</i>	<i>Axinella cannabina</i>
axisonitrilo-1	Cimino et al. (1982)
	Cafieri et al. (1973)

<i>Phyllidia varicosa</i>	<i>Hymeniacidon (Ciocalypta) sp</i>
9-isocyanopupukeanane	Schulte y Scheuer (1982)
2-isocyanopupukeanane	Burreson et al. (1975) Hagadone et al. (1979)
<i>Phyllidia ocellata</i>	<i>Acanthella cf. cavernosa</i>
sesquiterpene isocyanides	Fusetani et al. (1992)
<i>Phyllidia quadrilineata</i>	<i>Densa sp</i>
isothiocyanoaromadendrane	Karuso (1987)
<i>Phyllidia pustulosa</i>	<i>Densa sp</i>
isothiocyanoaromadendrane	Karuso (1987)
OPISTOBRANQUIOS	
<i>Aglaja depicta</i>	<i>Bulla striata</i>
aglajnes	<i>Haminoea hydatis</i>
prods. piridínicos	<i>Haminoea spp</i>
	Cimino et al. (1985b, 1987c)
<i>Navanax inermis</i>	<i>Bulla gouldiana</i>
prods. piridínicos	Spinella et al. (1992b y c)
polipropionatos	
<i>Roboastra tigris</i>	<i>Tambja abdere</i>
tambjaminas	<i>Tambja eliora</i>
	Carté y Faulkner (1983, 1986)

Tabla 7.1. Opistobranquios que obtienen los metabolitos secundarios a partir de sus presas.

En la Tabla 7.2. se han incluido aquellos casos en los que un producto (u otro estructuralmente muy similar) ha sido aislado en los opistobranquios y en otros organismos supuesta o probablemente depredados, pero sin haberse comprobado con exactitud la relación depredador-presa. En el apartado 6. se ha detallado ya la información sobre estas moléculas en los Opistobranquios.

OPISTOBRANQUIOS SUSTANCIAS	OTROS ORGANISMOS REFERENCIAS
ALGAS	
<i>Aplysia kurodai</i>	algas no determinadas
aplysin-20	Matsuda et al. (1967)
iso-aplysin-20	Scheuer (1969)
<i>kurodainol</i>	Yamamura y Terada (1977)
<i>aplysiaterpenoides A y B</i>	<i>Plocamium</i> Katayama et al. (1982) <i>Plocamium sp</i> <i>Plocamium hamatum</i> Stierle et al. (1979) Coll et al. (1988) Miyamoto et al. (1988)
<i>Aplysia depilans</i>	<i>Pachydictyon coriaceum</i>
pachydictyol	Hirschfeld et al. (1973) Minale y Riccio (1976)
<i>Aplysia dactylomela</i>	<i>Laurencia nipponica</i>
varios terpenos	<i>Laurencia obtusa</i> Schmitz et al. (1979) Yamamura y Terada (1977) Hashimoto (1979) Gopichand et al. (1981) Faulkner (1984a) <i>Laurencia poitei</i> Schmitz et al. (1978a) Fenical et al. (1978) <i>Laurencia majuscula</i> Sims et al. (1973) Suzuki et al. (1979) <i>Laurencia</i> Schmitz et al. (1985) Brennan y Erickson (1982) Rao et al. (1989)
dactylyne	Schmitz et al. (1974) McDonald et al. (1975)
lankapuols	<i>Laurencia</i> Baker et al. (1988) Faulkner (1990)
dolabellane epóxide	algas pardas
deodactol	González et al. (1973, 1975, 1979) Hollenbeak et al. (1979) Hegyeli y Hegyeli (1981) Munro et al. (1987)

<i>Aplysia brasiliensis</i>		<i>Laurencia spp</i>
brasilenyne	Kinnel et al. (1976, 1977a y b)	
cis-dihydrorhodophytin		Moore (1978)
panacene		Higa (1981)
		Faulkner (1984a)
<i>Aplysia angasi</i>		<i>Laurencia</i>
aplysistatina	Pettit et al. (1975, 1979)	
angasiol	Faulkner (1984a)	
		<i>Laurencia ireii</i>
		Schmitz et al. (1978b)
ESPONJAS		
<i>Anisodoris nobilis</i>		<i>Tedania digitata</i>
1-methylisoguanosina (doridosina)	Kim et al. (1981)	
	Furhman et al. (1980, 1981)	
	Quinn et al. (1980)	
	Cook et al. (1980)	
<i>Archidoris montereyensis</i>		<i>Palythoa liscia</i>
1-O-hexadecylglycerol	Gustafson y Andersen (1985)	
	Pettit y Fujii (1982)	
<i>Aldisa sanguinea cooperi</i>		<i>Palythoa liscia</i>
1-O-hexadecylglycerol	Gustafson y Andersen (1985)	
	Pettit y Fujii (1982)	
<i>Hypselodoris spp</i>		<i>Oligoceras hemorrhages</i>
dendrolasina	Vanderah y Schmitz (1975)	
<i>Hypselodoris daniellae</i>		<i>Pleraplysilla spinifera</i>
spiniferina-2	Cimino et al. (1975b)	
	Schulte y Scheuer (1982)	
<i>Hypselodoris californiensis</i>		<i>Dysidea herbacea</i>
furodysinina		<i>Euryspongia sp</i>
euryfurano		<i>Dysidea pallescens</i>
pallecsinsina-A		<i>Oligoceras hemorrhages</i>
dendrolasina		<i>Dysidea fragilis</i>
nakafurano-8		<i>Dysidea amblia</i>
		<i>Dysidea etheria</i>
	Cimino et al. (1975d, e y f)	
	Kazlauskas et al. (1978)	
	Hochlowski et al. (1982)	
	Vanderah y Schmitz (1975)	
	Schulte et al. (1980)	
<i>Hypselodoris ghiselini</i>		<i>Oligoceras hemorrhages</i>
dendrolasina		<i>Dysidea fragilis</i>
nakafurano-9	Hochlowski et al. (1982)	
	Vanderah y Schmitz (1975)	
	Schulte et al. (1980)	

<i>Hypselodoris porterae</i>	<i>Dysidea herbacea</i>
furodysinina	<i>Dysidea amblia</i>
ceryfurano	<i>Dysidea etheria</i>
	<i>Euryspongia sp</i>
	Hochlowski et al. (1982)
	Kazlauskas et al. (1978)
<i>Hypselodoris zebra</i>	<i>Dysidea herbacea</i>
furodysinina	<i>Dysidea amblia</i>
ceryfurano	<i>Dysidea etheria</i>
5-acetoxy-nakafurano-8	<i>Euryspongia sp</i>
5-hydroxy-nakafurano-8	Hochlowski et al. (1982)
	Kazlauskas et al. (1978)
	Grode y Cardellina (1984)
<i>Hypselodoris fontandraui</i>	<i>Dysidea avara</i>
furanoterpenos no identificados	esta Tesis
<i>Hypselodoris tricolor</i>	<i>Dysidea fragilis</i>
longifolina	Avila et al. (1990b)
nakafurano-9	esta Tesis
<i>Hypselodoris infucata</i>	<i>Dysidea sp</i>
	Albert (1988)
<i>Chromodoris marislae</i>	<i>Pleraplysilla spinifera</i>
marislina	Cimino et al. (1975b)
	Hochlowski y Faulkner (1981)
<i>Cadlina luteomarginata</i>	<i>Aplysilla glacialis</i>
glaciolide	Tischler y Andersen (1989)
	Faulkner (1991)
varios terpenos	<i>Dysidea herbacea</i>
	<i>Oligoceras hemorrhages</i>
	<i>Leiosella (Spongia) idia</i>
	<i>Dysidea pallidescens</i>
	<i>Pleraplysilla spinifera</i>
	<i>Microciona toxystila</i>
	Kazlauskas et al. (1978)
	Cimino et al. (1975a, b, c, d y f)
	Vanderah y Schmitz (1975)
	Walker et al. (1980)
	Hellou et al. (1981, 1982)
	Thompson et al. (1982)
	Gustafson y Andersen (1985)
	Guella et al. (1985b)
marginatafurano	<i>Spongia officinalis</i>
Gustafson et al. (1985 y ref. allí mencionadas)	
<i>Ceratosoma brevicaudatum</i>	<i>Dysidea sp</i>
thiofurodysinina acetato	<i>Dysidea avara</i>
	Kazlauskas et al. (1978)
	Dunlop et al. (1982)

<i>methylthiofurodysinina</i>	Capon y McLeod (1987)
<i>dithiofurodysinina disulfuro</i>	Ksebati y Schmitz (1988)
	Faulkner (1990)
	<i>Dysidea sp</i>
<i>Chromodoris inornata</i>	
sesterterpenos	<i>Luffariella sp</i>
	Miyamoto et al. (1992)
<i>Chromodoris norrisi</i>	
shahamina-C	<i>Dysidea sp</i>
	Carmely et al. (1988)
<i>Chromodoris spp</i>	
shahaminas	<i>Dysidea sp</i>
macfarlandina-E	Carmely et al. (1988)
<i>Chromodoris epicuria</i>	
diterpenos	<i>Aplysilla rosea</i>
	<i>Dendrilla rosea</i>
	Karuso y Taylor (1986)
	Ksebati y Schmitz (1987)
<i>Chromodoris macfarlandi</i>	
macfarlandinas A y B	<i>Aplysilla sulphurea</i>
	Karuso et al. (1984)
	Molinski y Faulkner (1986)
<i>Chromodoris elisabethina</i>	
latrunculina-A	<i>Latrunculia magnifica</i>
	Kashman et al. (1980, 1985)
	Okuda y Scheuer (1985)
<i>Chromodoris sedna</i>	
scalaranes	<i>Phyllospongia</i>
	Hochlowski et al. (1983b)
<i>Chromodoris splendida</i>	
24-methylscalarinas	<i>Phyllospongia</i>
	Hochlowski et al. (1983b)
	Kazlauskas et al. (1980)
<i>Chromodoris funerea</i>	
varios diterp.	<i>Spongia officinalis</i>
	<i>Spongia nittens</i>
	Cimino et al. (1973, 1977)
	<i>Luffariella variabilis</i>
	Kernan et al. (1987)
	<i>Dysidea</i>
	Carte y Faulkner (1981)
	Kazlauskas et al. (1978)
	Dunlop et al. (1982)
<i>Diaulula sandiegensis</i>	
acetilenos clorados	<i>Haliclona sp</i>
	Walker y Faulkner (1981)
	Faulkner y Ghiselin (1983)

<i>Phestilla melanobrachia</i> alcaloides	<i>Dercitus sp</i> Okuda et al. (1982)
CNIDARIOS	
<i>Tritonia sp</i> punaglandinas	<i>Telesto riisei</i> Baker et al. (1985) Baker (1986)

Tabla 7.2. Sustancias halladas en Opistobranquios (u otras estructuralmente muy similares) para las que se ha sugerido un origen dietético (mediante depredación sobre estas especies o sobre especies relacionadas).

El resto de casos hipotéticos se comentan brevemente a continuación. El loliolide de *Dolabella auricularia* (Pettit et al., 1980) se asume que es de origen dietético (Munro et al., 1987).

Ando (1952) fue el primero en señalar que los compuestos de *Aplysia kurodai* procedían de *Laurencia nipponica*. Otros autores, sin embargo, señalan que *A. kurodai* presenta metabolitos que han sido hallados en *Laurencia okamurai* y *L. nidifica*, pero no en *L. glandulifera* que es la que se cita como su presa (referencias en el apartado 6.3.). Sin embargo, las aplykurodininas, descritas también para esta especie, podrían estar relacionadas con diterpenos de algas pardas o bien resultar de la degradación de esteroides (Miyamoto et al., 1986).

Ha sido demostrado que la aplysioviolina en *Aplysia californica* es de origen dietético mediante los experimentos que realizaron Chapman y Fox en 1969, a partir de la ficoeritobilina. Esto no está claro para las especies europeas, ya que se alimentan de algas como *Ulva*, etc. Es de suponer que en *A. limacina* (Rüdiger, 1967) y *A. californica* (Chapman y Fox, 1969) el pigmento tiene un origen similar.

Los epidioxosterols de *A. dactylomela* (Gunatilaka et al., 1981) se hallan en tunicados, esponjas y corales, y según Krebs (1986) estarían relacionados con los hábitos alimenticios de la especie.

Vistos todos los compuestos de *Aplysia* que derivan o pueden derivar de algas, Scheuer (1977a) indica que es más fácil obtener los productos a partir de los moluscos que de las algas, ya que además de estar concentrados, se evita el tener que limpiar las algas. De hecho, muchos de los compuestos hallados en especies del género *Aplysia* fueron descritos primero en el molusco, y posteriormente en algas del género *Laurencia*, junto a otros compuestos del mismo tipo (Scheuer, 1973; y otros trabajos citados en Higa, 1981). El origen dietético de estos compuestos es pues bastante claro, ya que sólo se han hallado en *Laurencia* y *Aplysia*. Segun Higa (1981), las citas en algas Coralináceas podrían ser errores por contaminación. Los diterpenos de aplisiáceos son probablemente todos derivados de *Laurencia* (Faulkner, 1984a; Carefoot, 1987).

El uso de pigmentos (y especialmente los carotenoides) de la dieta ya fue señalado por Harris (1971, 1973, y refs. allí mencionadas). Abeloos y Abeloos (1932) indicaban el origen dietético del pigmento de *Archidoris pseudoargus* a partir de la esponja *Halichondria panicea*, y Strain (1949) y McBeth (1971) lo hacían para *Hopkinsia rosacea* del briozoo *Eurystomella bilabiata*. *Rostanga pulchra* incorpora carotenoides de esponjas rojas (Anderson, 1971).

Thuridilla hopei probablemente obtiene sus metabolitos (diterpenoides) de algas no determinadas (Gavagnin *et al.*, 1992). *Tylodina fungina* obtiene un pigmento no identificado de la esponja *Aplysina* (Faulkner y Ghiselin, 1983). *Mourgona germainae* presenta (mediante TLC) el mismo compuesto que su presa, el alga *Cymopolia barbata* (Jensen, 1984).

La dendrolasina, además de en los nudibranquios y en las esponjas mencionadas (ver apartado 6.3. y Tabla 7.2.) ha sido hallada en la hormiga *Dendrolasius fuliginosus*, en el "sweet potato fusel oil", y en el aceite de *Torreya nucifera* (ver referencias en Kakou *et al.*, 1987). Esta sustancia, por lo tanto, constituye un curioso caso de convergencia.

Cadlina limbaughorum y *C. flavomaculata* al parecer contienen metabolitos parecidos, y supuestamente obtenidos de las mismas esponjas,

que *C. luteomarginata* (Walker, 1982; Faulkner y Ghiselin, 1983), es decir de *Spongia idia* y *Dysidea amblia*

Hypselodoris webbi presenta longifolina, sustancia que fue hallada por Cimino *et al.* (1980b, 1982) quienes observaron que a pesar de que dicho compuesto se hallaba en la esponja *Pleraplysilla spinifera* (Cimino *et al.*, 1975b), esta esponja no podía ser su presa ya que presentaba otros compuestos mayoritarios que no aparecían en el molusco. Sugirieron que se alimentaba de esponjas relacionadas, que contuvieran longifolina, y algo similar sucedió con *H. villafranca*. El origen dietético de esta sustancia ha sido posteriormente demostrado a partir de la especie *Dysidea fragilis*, como hemos expuesto en los apartados 5.3. y 5.4., así como para *Hypselodoris cantabrica* y la esponja *Dysidea fragilis* del Cantábrico (ver apartado 5.1.).

Las especies de *Hypselodoris* (las no incluidas en la Tabla 7.1.) y *Chromodoris* trabajados en esta Tesis, se incluirían en este apartado como especies que probablemente obtienen sus metabolitos a partir de esponjas. En los lugares de recolección de los *Hypselodoris* del Cantábrico han sido citadas las esponjas *Dysidea fragilis* (Ferrer-Hernández, 1914) y *D. fragilis* y *D. avara* (Lombas, 1982). En los capítulos referidos a cada una de las especies de *Hypselodoris* y *Chromodoris* analizadas, se ha expuesto una discusión sobre el origen de sus metabolitos, y por ello no se repite aquí.

Chromodoris luteorosea según Schmekel y Portmann (1982) se alimenta de *Spongionella*. Sin embargo, Cimino *et al.* (1990b), analizaron el nudibranquio y los productos que hallaron (mencionados en el apartado 5.8.) no son iguales a los de la única especie de esta esponja citada en el Mediterráneo, *S. gracilis*, que presenta sin embargo diterpenos bastante similares (Mayol *et al.*, 1986). Cimino *et al.* (*op. cit.*) postularon un origen a partir de otras esponjas incrustantes tipo *Spongionella*, o tipo *Aplysilla rosea*, ya que esta última presenta compuestos estructuralmente parecidos (Kazlauskas *et al.*, 1979). En el caso de *C. luteorosea* de Asturias, analizados en el capítulo 5.8., deben de proceder análogamente de la dieta. En la zona de recolección de los nudibranquios del Cantábrico analizados en esta Tesis están citadas las esponjas *Aplysilla sulphurea* y *A. rosea* (Ferrer-Hernández, 1914, 1918).

Hay casos en que la estructura del producto da una pista sobre el tipo de presa. Por ejemplo, la marislina que se halla en *Chromodoris marislae* (ver el apartado 6.3. Diterpenos, y la Tabla 7.2.), está estructuralmente relacionada con la pleraplysillin-2 (Cimino *et al.*, 1975b), de la esponja *Pleraplysilla spinifera* del Mediterráneo. Esto da pie a suponer que se alimentará de alguna esponja parecida o relacionada presente en su hábitat. A pesar de ello, Hochlowski y Faulkner (1981) estudiaron más de 20 especies de esponjas comunes en la zona y ninguna de ellas contenía marislina. Se le supone origen dietético a partir de una esponja desconocida.

Chromodoris elisabethina presenta latrunculina-A (Okuda y Scheuer, 1985). La presa citada de esta especie es la esponja *Heteronema sp.* en la que los citados autores no hallaron dicha sustancia, sino otros compuestos que no presentaba el molusco. Sugirieron por ello que este producto procedía de un alimento ocasional no identificado.

Chromodoris macfarlandi es altamente probable que obtenga las macfarlandinas de alguna esponja Dendroceratida (Molinski y Faulkner, 1986). Algunas de estas esponjas son incrustantes y ello explicaría la dificultad para obtenerlas y analizarlas. Las macfarlandinas A y B están estructuralmente relacionadas con la aplysulphurina descrita en la esponja *Aplysilla (=Darwinella) sulphurea* (Karusso *et al.*, 1984; Molinski *et al.*, 1986). Por analogía, estos autores suponen que el resto de macfarlandinas se obtiene de la dieta a base de esponjas, que al menos son dos especies distintas para *Chromodoris macfarlandi*. Esto se debe a que la macfarlandina A y B pueden o no estar presentes en ejemplares de distintas áreas geográficas, pero si las hay son abundantes y en cantidades similares; en cambio, las macfarlandinas C, D y E son bastante más variables en todos los ejemplares. Estas dos especies o más de esponjas deben ser, según los mencionados autores, de la Familia Aplysillidae, ya que éstas producen diterpenos relacionados con los de los nudibranquios (Molinski *et al.*, 1986). Esto podría ser similar a lo que hemos expuesto para *Chromodoris britoi* (ver apartado 5.11.).

La kabiramida C fue hallada en puestas no identificadas de nudibranquio (Matsunaga *et al.*, 1986) y por su original estructura se sugirió

que podían tener origen biosintético. Sin embargo, al ser halladas posteriormente en *Halichondria* sp por Kernan *et al.* (1988b), esta idea tuvo que ser abandonada.

Adalaria sp presenta productos previamente citados en esponjas tales como *Hyrtios* sp, *Thalysia juniperina*, *Axinella cannabina*, *Tethya aurantia* (Stonard *et al.*, 1980), y otros citados en la pluma de mar *Virgularia* sp, pero se alimenta de briozoos (*Membranipora membranacea*). En este caso su origen no está claro.

Dendrodoris grandiflora acumula en su glándula digestiva metabolitos procedentes de esponjas varias (Cimino *et al.*, 1980b, 1985d, 1986a), si bien no los usa para su defensa ya que posee una vía metabólica que lleva a la formación de sesquiterpenos y ésteres drimánicos, como en la especie *D. limbata* (ver los apartados 5.14. y 5.15). El resto de compuestos citados en la glándula digestiva de esta especie, y que no se mencionan en la Tabla 7.1. tendrían también un origen dietético a partir de esponjas según los autores ya mencionados, o bien resultarían de la modificación de otros metabolitos de esponjas. Esta especie podría alimentarse de varias especies de esponjas sin que ello afectara a su estrategia defensiva.

No hemos incluido en las Tablas la relación entre *Duvaucelia* y *Eunicella*, (ver apartado 5.17.) debido a que el producto observado mediante TLC no fue identificado.

Las esponjas mencionadas en este apartado son mayoritariamente Demospongias: *Axinella*, *Acanthella* (Axinellida), *Hymeniacidon*, *Halichondria* (Halichondrida), *Myxilla*, *Microciona*, *Ophlitaspongia*, *Latrunculia* (Poecilosclerida), *Petrosia* (Petrosiida), *Pleraplysilla*, *Aplysilla*, *Dendrilla* (Dendroceratida), *Suberites*, *Laxosuberites* (Hadromerida), *Dysidea*, *Spongia*, *Cacospongia*, *Spongionella*, *Ircinia*, *Hyrtios* (*Oligoceras*), *Hyatella*, *Euryspongia*, *Phyllospongia*, *Luffariella* (Dyctioceratida), y *Verongia* (*Aplysina*) (Verongida). Por su parte *Leucetta* es una esponja calcárea. Muy recientemente se ha propuesto que el género *Spongionella* podría estar mucho más relacionado con *Aplysilla* de lo que hasta ahora se había supuesto (Uriz, com. pers.).

Seguramente gran cantidad de esteroles y otras sustancias de esponjas (u otros organismos) se encuentran en la glándula digestiva de los opistobranquios que las depredan. Sin embargo, y como hemos visto en la Tabla 7.1., son escasos los casos en que esto se ha demostrado. Todos los casos descritos en los que los compuestos de los opistobranquios son similares a los de posibles presas, podrían no indicar obligatoriamente un origen dietético. Por ejemplo, en *Dendrodoris limbata*, se mencionó (Cimino *et al.*, 1980b) que los sesquiterpenoides que presentaba eran similares a la heteronemina, descrita para esponjas, por lo que se concluía que podrían obtenerlos de alguna esponja desconocida. Como comentaremos en el apartado siguiente (y hemos expuesto ya en el apartado 5.14.), Cimino *et al.* (1983) demostraron posteriormente el origen biosintético de dichos productos. En la Tabla 7.2. se han incluido, y posteriormente hemos comentado, algunos casos similares en los que por un parecido estructural se supone el origen dietético para determinados metabolitos. Esto debe ser considerado con precaución hasta que se demuestre cada caso.

En nuestra opinión, para demostrar que el producto de un opistobranquio procede de una determinada presa es necesario que:

- 1) el producto esté presente en ambas especies a concentraciones detectables.
- 2) las dos especies compartan el mismo hábitat.
- 3) el producto se encuentre al menos en el hepatopáncreas y/o en la parte anterior del tubo digestivo del opistobranquio.
- 4) si dicho producto no es el más abundante en la esponja, que el resto de productos mayoritarios de la esponja esté presente en el aparato digestivo del opistobranquio.

La observación directa de la depredación y el estudio de los restos de la especie presa (como por ejemplo, espículas) en el aparato digestivo del depredador complementarían el estudio de esta relación.

Acumulación selectiva de metabolitos.

Nos referimos aquí al hecho de que además de seleccionar la esponja de la que se alimentan, algunos opistobranquios son capaces de seleccionar los metabolitos de la esponja que deben acumular y los que no (estos son probablemente excretados o destruidos). Este fenómeno fue ya sugerido por Thompson *et al.* (1982) y Schulte y Scheuer (1982). En general se puede decir que existen dos posibilidades: se acumulan únicamente los más tóxicos o repelentes, o bien se acumulan varios pero no el más tóxico. Como ejemplo del segundo caso se puede mencionar *Hypselodoris orsini*, que no acumula el scalaradial de *Cacospongia mollior*, pero sí otros metabolitos menos tóxicos (que además transforma) (Cimino *et al.*, 1974, 1982, *en prensa*).

Un ejemplo de acumulación selectiva sería el caso de *Chromodoris funerea*, descrito por Kernan *et al.* (1988a). Esta especie podría distinguir ciertas sustancias aleloquímicas de entre otros metabolitos, de manera que no dependería de una dieta estricta para su defensa. Los ejemplares de una laguna marina, donde no había *Dysidea*, se alimentaban de esponjas tipo *Spongia*, que contienen sesterterpenos tipo scalarinas. Fuera de la laguna el nudibranquio podría alimentarse de especies de *Dysidea*, adquiriendo sus sesquiterpenos para su defensa (Carté *et al.*, 1986). El nudibranquio resultaría no estar adaptado a una especie de esponja en concreto, sino que podría seleccionar de las esponjas que le sirven de alimento los productos de defensa y acumularlos selectivamente. En el caso de que se tratara de especies distintas (tipo *H. tricolor/H. orsini*), coincidiría con los datos aquí expuestos respecto a la especificidad de estas especies.

El norrisolide fue hallado en *Dendrilla* sp, que es una esponja taxonómicamente relacionada con *Aplysilla rosea*, de la que Kazlauskas *et al.* (1979) obtuvieron aplysillina (estructuralmente parecida al norrisolide). Por ello, Hochlowski *et al.* (1983a) suponen para este producto un origen dietético en los moluscos. Posteriormente, Bobzin y Faulkner (1989a) demostraron para *Chromodoris norrisi*, el origen de los cuatro diterpenos mencionados en la Tabla 7.1. a partir de la esponja *Aplysilla polyrhaphis*. Estos compuestos se hallaban en iguales proporciones en el nudibranquio y en la esponja, por lo

que no se acumulaba preferentemente ninguno de los cuatro. Sin embargo, hay que destacar que citaron otros cinco diterpenos de la esponja que no estaban presentes en el molusco. El nudibranquio secuestra, pues, algunos de los metabolitos. Según los autores citados, esto implica una función ecológica, aunque además seguramente es el resultado de una larga evolución bajo el efecto de una cierta presión selectiva.

Otros casos de acumulación selectiva serían: *Phyllidia varicosa* (Schulte y Scheuer, 1982; Scheuer, 1982), *Glossodoris* spp (Rogers y Paul, 1991), *Chromodoris tasmaniensis* (Karusoo, 1987), *Phyllidia* spp (Karusoo, 1987), *Aplysia* spp (Carefoot, 1987; Hay y Steinberg, 1992), *Cadlina flavomaculata* (Faulkner y Ghiselin, 1983), *Phyllodesmium longicirra* (Coll et al., 1985) y *Phestilla melanobrachia* (Harris, 1973).

En las especies de los géneros *Hypselodoris* y *Chromodoris* estudiadas en esta Tesis, se observa que los terpenos seleccionados por el nudibranquio se almacenan en lugares concretos del organismo, a los que son transferidos selectivamente desde el hepatopáncreas (por algún mecanismo desconocido). Así pues, además de una acumulación selectiva se observa un posterior traslado específico de los productos, que son los únicos presentes en las formaciones dérmicas del manto.

Variabilidad geográfica.

Se han citado en la bibliografía algunos casos en los que los productos de una determinada especie variaban según su localidad de procedencia. Esto, como ya hemos comentado al inicio de este capítulo, iría asociado al origen dietético de los metabolitos.

Una revisión de este fenómeno desde un punto de vista químico ha sido realizada recientemente por Faulkner et al. (1990). Una excepción, sin embargo, a lo postulado por estos autores, serían las variaciones debidas al estado fisiológico y de desarrollo del animal (no relacionadas con la dieta), como por ejemplo, los ésteres drimáticos y otros compuestos de *Dendrodoris*

limbata (ver apartado 5.14.), cuya variabilidad no estaría asociada a un origen dietético de dichos compuestos.

Las especies para las que se ha descrito este fenómeno son las que se exponen en la Tabla 7.3.

ESPECIES	REFERENCIAS
<i>Aplysia dactylomela</i>	(ver Tablas anteriores)
<i>Aplysia californica</i>	idem
<i>Aplysia kurodai</i>	idem
<i>Tridachia crispata</i>	idem
<i>Hexabranchus sanguineus</i>	idem
<i>Cadlina luteomarginata</i>	idem
<i>Hypselodoris californiensis</i>	idem
<i>Hypselodoris villafranca</i>	esta Tesis
<i>Hypselodoris webbi</i>	esta Tesis
<i>Hypselodoris cantabrica</i>	esta Tesis
<i>Chromodoris luteorosea</i>	esta Tesis
<i>Chromodoris britoi</i>	esta Tesis
<i>Chromodoris krohni</i>	esta Tesis
<i>Chromodoris purpurea</i>	esta Tesis
<i>Chromodoris lochi</i>	(ver Tablas anteriores)
<i>Chromodoris macfarlandi</i>	idem
<i>Chromodoris funerea</i>	idem
<i>Diaulula sandiegensis</i>	idem
<i>Nembrotha spp</i>	idem
<i>Tochuina tetraquetra</i>	idem

Tabla 7.3. Especies de Opistobranquios en las que se ha detectado variabilidad geográfica en sus productos químicos.

La gran variabilidad de compuestos estructuralmente relacionados y procedentes de la dieta en los géneros *Hypselodoris-Dysidea* es comparable a la de *Aplysia-Laurencia*. En ambos casos se hallan productos distintos en una misma especie de opistobranquios, debido a la variabilidad geográfica, es decir debido a las diferencias en los metabolitos de la especie presa (sea esta una única especie, p. ej. *D. fragilis*, o varias, p. ej. *Laurencia spp*).

En esponjas del género *Dysidea* se han descrito gran cantidad de productos de muy diversos tipos: bromofenoles, thiazole derivados,

sesquiterpenoides, etc. (para referencias ver Schulte *et al.*, 1980). Esto podría ser debido a la gran variabilidad de estas esponjas, o quizás a la confusión existente en este género (que al no poseer esqueleto espicular presenta problemas de identificación). Para comprobar la confusión a la que nos referimos basta observar la cantidad de productos descritos en la llamada por todos *Dysidea fragilis*. Esto podría indicar que existe una gran variabilidad dentro de la misma especie, o bien que, por algún error sistemático, se trata de varias especies mezcladas. Otros datos de carácter morfológico apoyarían esta última idea, ya que *D. fragilis*, por ejemplo, del Cantábrico es algo distinta de la de las costas catalanas y de las italianas (coloración, morfología externa,...), si bien esto está aún por demostrar.

Un caso bien estudiado es el de *Cadlina luteomarginata*, una especie que obtiene sus productos de esponjas de la dieta, y según Thompson *et al.* (1982), éstas son por lo menos 10 especies diferentes. En su estudio analizaron además de los productos químicos, los contenidos estomacales (espículas y granos de arena con fibras), y concluyeron que las esponjas más frecuentemente depredadas eran *Axinella* sp y *Myxilla incrustans*, así como *Leiosella (Spongia) idia* y *Dysidea amblia*. No hay duda de que en esta especie los productos son de origen dietético, así como tampoco hay duda de que *C. luteomarginata* no es muy específica a la hora de alimentarse. La gran variabilidad de compuestos descritos en esta especie, y como también sucede en otras especies de la misma Familia Chromodorididae (*Hypselodoris* y *Chromodoris*), según su lugar de procedencia apoya el origen dietético a partir de distintas especies de esponjas. La variabilidad de metabolitos hallados en las propias esponjas presas (por ejemplo para *C. luteomarginata* en *Dysidea amblia*, Walker, 1982) provoca una gran parte de la variabilidad observada en los opistobranquios que se alimentan de ellas.

En el Dendronotáceo *Tochuina tetraquetra* se hallaron varios productos (ver apartado 6.3. Sesquiterpenos y Sesterterpenos) que se habían descrito previamente en el coral blando *Gersemia rubiformis* (Williams *et al.*, 1987), aunque en ejemplares de otra localidad no hallaron estos compuestos sino otros. Esto apoyaría su origen dietético. Asimismo, en ejemplares de otra localidad se hallaron productos (6.3. Diterpenos) previamente citados para el alciónáceo *Ptilosarcus gurneyi* (Wratten *et al.*, 1977).

Otro de los casos descritos es el de *Nembrotha* spp. Las concentraciones de las sustancias y los compuestos varían según la localidad de recolección (Paul *et al.*, 1990), en consonancia con las variaciones observadas en *Atapozoa* sp del mismo hábitat. Al parecer las tambjaminas también se han hallado en el briozoo *Bugula dentata* (Lindquist y Fenical, no publ.).

Tridachia crispata presenta según Ireland *et al.* (1979) e Ireland y Faulkner (1981) crispatene y crispatone, pero además de estos Ksebatí y Schmitz (1985) hallaron tridachiapyrone-A, B y C y otros tres propionatos en dicha especie procedente de otra zona de muestreo. Esto apoyaría su origen dietético, pero sin embargo se ha sugerido un origen biosintético (ver apartado siguiente). Esta podría ser una excepción a la regla general.

Los diaulusterols A y B (Williams *et al.*, 1986) de *Diaulula sandiegensis* están estructuralmente relacionados con el pinnasterol y el acetylpinasterol de *Laurencia pinnata*, aunque es altamente improbable que el nudibranquio se alimente de estas algas. Williams *et al.* (*op. cit.*) postulan un origen dietético sobre algún organismo no identificado para estos metabolitos. Según los mismos autores, los acetilenos clorados descritos en ejemplares de la misma especie pero procedentes de otro lugar (Walker y Faulkner, 1981), se obtendrían de otro alimento distinto, ya que no se han hallado en las esponjas que depreda (presas confirmadas mediante el contenido de su glándula digestiva), ni tampoco ningún posible precursor (Walker y Faulkner, 1981). La ausencia de estos productos en ejemplares de otras localidades (Faulkner, 1988a) apoya su origen dietético.

Se ha descrito también variabilidad en los carotenoides que los opistobranquios toman de sus presas, en una misma especie (Cullon, 1966; Harris, 1971).

Lógicamente, el hallar diferentes productos de estructura similar en la misma especie de lugares distintos, apoyaría un origen dietético, siendo la variabilidad geográfica debida a la depredación sobre diferentes presas. Esto

va relacionado también con el hecho de que la especie sea estenófaga o eurífaga, si bien esto se discutirá en el apartado 7.4.4.

Una vez asegurado que se trata de la misma especie en localidades distintas (existen varios casos de confusiones a nivel taxonómico), se puede decir que la variabilidad observada en las sustancias de un opistobranquio tiene dos componentes: 1) la variabilidad en los compuestos de una misma especie presa, y 2) la variabilidad debida al consumo de más de una especie presa similar. El primero de estos aspectos podría transformarse en el segundo en el caso de que hubiera varias citas de una especie presa que posteriormente resultaran ser dos o más especies.

Transformación de metabolitos de la especie presa.

Se incluyen aquí los casos en los que el opistobranquio obtiene de la dieta un metabolito que es transformado en otro producto. Hay varios casos descritos, que comentaremos brevemente, tanto de transformación en productos más activos, como en compuestos menos activos. Estos casos han sido demostrados muy recientemente, ya que Karuso (1987) recordaba que hasta entonces no existía evidencia de que esta transformación ocurriera, si bien posiblemente ocurría.

Un ejemplo de producto transformado a partir de otro se observa en *Oxynoe olivacea*. La caulerpenyne de *Caulerpa prolifera* (Amico *et al.*, 1978) se transforma en las oxytoxinas (Cimino y Sodano, 1989; Cimino *et al.*, 1990a). Un esquema de esto se puede observar en la Figura 7.1. *Oxynoe panamensis*, podría análogamente obtener su toxina de algún compuesto relacionado con el alga que le sirve de alimento, *Caulerpa sertularioides*. Otros productos de *Oxynoe* spp podrían proceder también de metabolitos de *Caulerpa* (Doty y Aguilar-Santos, 1970; Lewin, 1970).

El aplysinol de *Aplysia kurodai* (ver referencias en la Tabla 6.13.) podría derivar del laurinterol (Baker y Murphy, 1976). El origen de la aplysina a partir del laurinterol (de *Laurencia*) fue investigado por Stallard y Faulkner (1974). El pacifidiene de *Aplysia californica* (Stallard y Faulkner,

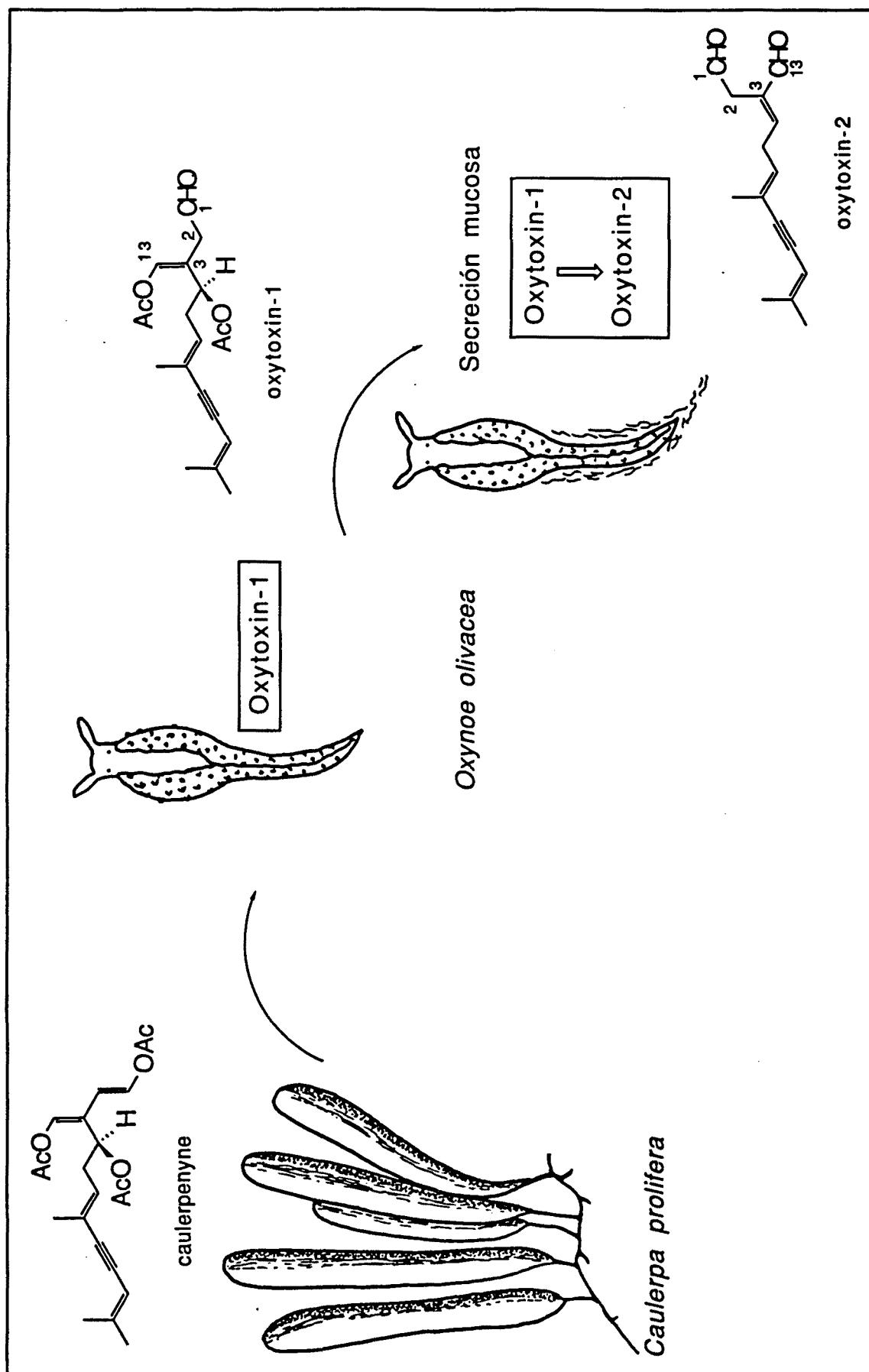


Figura 7.1. Obtención de las sustancias naturales de *Oxynoe olivacea* a partir de *Caulerpa prolifera*.

1974 a y b) podría derivar del pacifenol de *Laurencia pacifica*, *L. crispa* y *L. subopposita*, según Barrow (1983). *A. californica* obtiene aplysina marcada a partir de "lechuga de mar" impregnada con laurinterol marcado (Hashimoto, 1979).

La excepción a la relación *Dysidea-Hypselodoris* que hemos comentado anteriormente viene dada por las especies *Hypselodoris orsini-Cacospongia mollior*, ya comentada en el apartado 5.7. Cimino *et al.* (1982) observaron que de los tres compuestos presentes en la esponja: scalaradial (Cimino *et al.*, 1974), furoscalarol (Cafieri *et al.*, 1977; Cimino *et al.*, 1978) y deoxoscalarina (Cimino *et al.*, 1973), sólo los dos últimos estaban presentes en el molusco (que fue capturado sobre la misma esponja). Esto les llevó a sugerir que el nudibranquio transformaría el scalaradial en deoxoscalarina. En este caso la transformación lleva a compuestos menos activos. Estos estudios han sido recientemente ampliados por Cimino *et al.* (*en prensa*).

Chromodoris funerea presenta productos que se forman por oxidación de la furodysinina y de la furodysina, que se han hallado en *Dysidea* spp (Faulkner, 1988a). Sin embargo, en la esponja no se han hallado los compuestos de oxidación. Carté *et al.* (1986) demostraron que el molusco no sólo es capaz de acumular selectivamente los metabolitos de la esponja, sino que además los modifica para obtener alomonas más efectivas: la furodysinina de *Dysidea* se oxida a furodysinina hydroperóxido, que es más activa como repelente (Carté *et al.*, 1986; Faulkner, 1988a). De todas formas, hay que señalar que estos autores efectuaron el análisis químico con organismos conservados durante largo tiempo en disolventes orgánicos.

Hexabranchus sanguineus según Pawlik *et al.* (1988) debe transformar la halichondramida (compuesto mayoritario en *Halichondria* y que no se halla en el nudibranquio) en los otros productos citados en la Tabla 7.1., y que proceden también de la esponja (además de los metabolitos, se confirmó la relación de depredación analizando las espículas presentes en el tracto digestivo). La variabilidad geográfica en la composición de los metabolitos de esta especie de opistobranquio, con la presencia de kabiramida-B y -C en

otros lugares, se explicaría según los citados autores por una alimentación a base de otra especie de esponja (tipo *Halichondria*). La variación en la cantidad de estos macrólidos en algunos ejemplares, podría deberse a que no habían comido excesivamente antes de ser capturados y/o habían expulsado mucho muco al ser capturados. Este hecho también lo hemos observado en especies del género *Hypselodoris* (ver capítulo 5.3.). La concentración variable de macrólidos se sugiere que es por una dieta espongívora no selectiva (Francis, 1980). Si los macrólidos de *Halichondria* son sintetizados por la esponja o si proceden de bacterias simbiontes, es otra cuestión que permanece aún por aclarar. Por otro lado, y para la misma especie, *H. sanguineus*, Roesener y Scheuer (1986) señalan como esponja presa *Leucetta solida*, indicando que los compuestos hallados en las supuestas puestas del nudibranquio (ulapualide A y B) no se hallan en la mencionada esponja.

Aldisa sanguinea cooperi, que presenta los esteroides que hemos mencionado en el apartado 6.3. (Ayer y Andersen, 1982), vive "enterrada" en la esponja *Anthoarcuata graceae*, sobre la que es críptico y de la que se alimenta (Ayer y Andersen, *op. cit.*). Sin embargo esta esponja no contiene los esteroides hallados en el nudibranquio, si bien posee una mezcla de cetonas esteroidales que sí se hallan en el nudibranquio. Se sugirió que el opistobranquio obtiene un metabolito inactivo (cholestene) de la dieta y lo modifica químicamente para obtener sus productos repelentes (Gustafson y Andersen, 1985; Krebs, 1986).

Chromodoris youngbleuthi presenta tres sesterterpenos, de los cuales sólo uno se halla en su esponja presa (ver Tabla 7.1.). Este hecho, junto con las cantidades relativas de dichos compuestos, sugirieron a Terem y Scheuer (1986) que el 12-deacetyl-scalaradial de la esponja sería convertido en los otros dos metabolitos por el nudibranquio. Otros casos similares podrían ser los de *Glossodoris* spp (Rogers y Paul, 1991; Webb, 1988), en los que se obtienen también metabolitos menos activos.

Otro caso similar es *Elysia halimeda* que transforma el halimedatetraacetato de *Halimeda macroloba* (Paul y Van Alstyne, 1988). *Nembrotha* spp parecen transformar los productos de *Atapozoa* sp, además de acumular algunos de ellos selectivamente (Paul *et al.*, 1990).

Aspectos ecológicos.

En el apartado 7.4.4. se incluyen algunas consideraciones ecológicas sobre el origen de los metabolitos en los moluscos opistobranquios.

Los efectos de los metabolitos de la presa comparados con los efectos de otras características como calcificación o dureza del alga, han sido estudiados recientemente para *Dolabella auricularia* por Pennings y Paul (1992). Los efectos repelentes de los metabolitos de las algas parecen ser el factor de menor importancia para la depredación. Esto es lógico ya que esta especie obtiene muy probablemente sus defensas de dicha dieta.

7.1.2. Biosíntesis.

En este apartado se incluyen las especies que son capaces de elaborar sus propias sustancias de defensa. Se detallan en la Tabla 7.4., que se expone a continuación.

OPISTOBANQUIOS SUSTANCIAS	REFERENCIAS
<i>Navanax inermis</i> navenones A, B, C	Sleeper y Fenical (1977) Fenical et al. (1979) Sleeper et al. (1980)
<i>Archidoris odhneri</i> diterpeno glicérido	Gustafson y Andersen (1985)
<i>Archidoris montereyensis</i> diterpeno glicérido	Gustafson y Andersen (1985)

<i>Doris verrucosa</i>		
xylosil-MTA	Porcelli et al. (1989)	
verrucosinas	Avila et al. (1990a)	
esteroles	esta Tesis	
<i>Dendrodoris limbata</i>		
polygodial	Cimino et al. (1983, 1986a)	
ésteres drimánicos		
<i>Dendrodoris grandiflora</i>		
polygodial	Cimino et al. (1985d)	
ésteres drimánicos		
6-β-acetoxiolepuana		
<i>Tethys fimbria</i>		
prostaglandinas	Cimino et al. (1989b, 1991a, c)	
	Di Marzo et al. (1991a, 1992a)	
<i>Cyerce cristalina</i>		
polipropionatos	Di Marzo et al. (1991b)	
	Vardaro et al (1991)	
	Mollo (1992)	
<i>Placobranchus ocellatus</i>		
polipropionatos	Ireland y Scheuer (1979)	
<i>Ercolania funerea</i>		
polipropionatos	Mollo (1992)	
	Vardaro et al. (1992b)	

Tabla 7.4. Especies de opistobranquios en los que se ha demostrado la biosíntesis de sus metabolitos.

Voogt (1970) indicaba que en moluscos la biosíntesis se realiza a baja velocidad. Este hecho ha sido posteriormente discutido por otros autores (Garson, 1989 y referencias allí citadas), estando al parecer todos de acuerdo en que los resultados siempre se traducen en una baja incorporación.

La defensa mediante productos secundarios implica según Luckner (1984) la utilización de compuestos y energía del metabolismo primario, lo cual puede reducir el crecimiento y la reproducción. En plantas estos productos se fabrican en proporción directa respecto al "riesgo de depredación" (Luckner, 1984). Recientemente Garson (1989) revisó algunos aspectos de la biosíntesis de los productos naturales marinos.

Las navenonas al parecer se producirían en la glándula amarilla de *Navanax inermis* (Sleeper, 1981). *Haminoea cymbalum* presenta kumepaloxane, compuesto que no se halla en su presa, *Caulerpa racemosa* (Poiner *et al.*, 1989), y constituye un posible caso de biosíntesis.

El producto que presenta *Phlinopsis speciosa* está estructuralmente relacionado con los productos de *N. inermis*, por lo que se ha hipotetizado sobre su origen biosintético (Garson, 1989; Cimino y Sodano, 1989).

Uno de los primeros casos que demostraron que no todos los metabolitos en opistobranquios procedían de la dieta fue en *Dendrodoris limbata* (Cimino *et al.*, 1983). En dicha especie, tras un análisis de las posibles presas (*Suberites domuncula*, Cimino *et al.*, 1980b) que mostró la ausencia de sus metabolitos típicos, se realizaron estudios de biosíntesis. Una explicación más detallada al respecto se puede hallar en el capítulo 5.14., así como en el 5.15. para *D. grandiflora*.

Dendrodoris spp y *Archidoris* spp son capaces de convertir el mevalonato en terpenos (sesquiterpenos y diterpenos respectivamente). Okuda *et al.* (1983) analizaron, entre otras, la especie *Dendrodoris nigra*. Estaba descrito que se alimentaba de *Suberites* sp., pero dichos autores no la hallaron en las proximidades de los nudibranquios. Analizaron otras esponjas de áreas cercanas, incluyendo *Pseudosuberites pseudos*, en la que habían visto comer a varios porostomados, y ninguna de dichas esponjas contenía los sesquiterpenos drimánicos. Es de suponer, por analogía con las otras dos especies del género, que obtiene sus metabolitos mediante biosíntesis.

En este apartado hay que incluir naturalmente el caso de las verrucosas de *Doris verrucosa*, que se ha expuesto en el apartado 5.12. En esta misma especie se había descrito con anterioridad la biosíntesis de la xylosil-MTA (Porcelli *et al.*, 1989). Los valores obtenidos en nuestros experimentos con *Doris verrucosa* (559 dpm/mg y 1846 dpm/mg en 48 horas para las verrucosas) son similares a los de *Archidoris montereyensis* y *A. odhneri* (550, 3260 y 1810 dpm/mg en 24 horas para los distintos productos).

Los polipropionatos de *Cyerce nigricans*, análogamente a *C. cristalina*, podrían tener origen biosintético. Esto viene apoyado por la ausencia de estos compuestos en su especie presa, el alga *Chlorodesmis fastigiata* (Faulkner, 1991). Por otro lado, *Elysia timida* y *E. viridis* presentan polipropionatos que no se encuentran en sus presas respectivas (*Acetabularia mediterranea* y *Codium vermilara*), por lo que podrían ser de origen biosintético (Gavagnin *et al.*, 1992). Del mismo modo *Placida dendritica* presenta productos que no están presentes en el alga de la que se alimenta (*Bryopsis plumosa*) por lo que Vardaro *et al.* (1992a) sugieren la biosíntesis *de novo* para placidenos e *iso*-placidenos (que son estructuralmente similares a los cyercenes).

Asimismo, los productos de *Tridachiella diomedea* y *Tridachia crispata* por su relación con los productos de *Placobranchus ocellatus*, podrían tener también un origen biosintético (Garson, 1989). Además en la segunda de las especies mencionadas, se conoce que su especie presa, *Caulerpa sertularioides* no contiene estos polipropionatos. En contradicción con esto, en *Tridachia crispata* el hecho de presentar variabilidad geográfica, como hemos comentado anteriormente, apoyaría un origen dietético.

Cadlina luteomarginata presenta productos diversos cuya localización en las vísceras apoya un origen dietético (Hellou *et al.*, 1981, 1982; Gustafson y Andersen, 1985). Sin embargo, algunos de los compuestos mencionados por estos autores (albicanol, albicanol acetato y luteone) no se hallaron en ninguna posible presa y no se localizaban en las vísceras. Por ello, Gustafson y Andersen (1985) sugirieron que estas sustancias fueran elaboradas por el nudibranquio. Resultados preliminares de Gustafson y Andersen (1985) parecían indicar que también los tres compuestos descritos para *Acanthodoris nanaimoensis* (nanaimoal, acanthodoral e *iso*-acanthodoral) podrían tener origen biosintético, aunque no se han encontrado en la bibliografía resultados posteriores que lo confirmen.

Triopha catalinae y *Polydora tricolor* contienen triophamina (Gustafson y Andersen, 1982, 1985). Ambos se alimentan de briozoos, por lo que podría suponerse un origen dietético. Es un caso dudoso, ya que según Faulkner *et al.* (1990) podría ser de biosíntesis al hallarse en ejemplares de diferentes localidades. Por otro lado, su rareza estructural (Piers *et al.*, 1984)

apoyaría que fuese biosintetizada por el molusco. El caso de *Diaulula sandiegensis* es igualmente dudoso, ya que presenta acetilenos clorados que no han sido hallados en ninguna de las especies de las que se le ha visto alimentarse (Walker y Faulkner, 1981).

Otros casos propuestos como de posible biosíntesis son los productos de *Austrodoris kerguelensis* (Davies-Coleman y Faulkner, 1991) y los de *Bulla gouldiana* (Spinella *et al.*, *en prensa*).

En relación al momento de aparición de las sustancias en las larvas y/o juveniles, probablemente aparezcan en el momento de activación del mecanismo de biosíntesis. En el caso de las especies que hemos estudiado en esta Tesis, las puestas de *Doris verrucosa* y de *Dendrodoris spp* no contienen ni verrucosinas ni polygodial respectivamente (aunque sí otros metabolitos relacionados en sus respectivos apartados). En el momento de eclosión de la larva y aparición de la postlarva, o en su caso del juvenil por desarrollo directo, podría ser iniciada la síntesis. Como se ha expuesto en el apartado 5.14., se ha comprobado mediante TLC la ausencia de polygodial y olepupuana en los juveniles (de alrededor de 1 mm de longitud máxima) de *Dendrodoris limbata*, si bien la 7-deacetoxy-olepupuana parece estar presente (ver apartado 5.14.). Es posible que la vía metabólica correspondiente se active en la dirección de estas sustancias en un momento posterior del desarrollo. El estudio genético de los mecanismos que regulan la síntesis de estos metabolitos sería sin duda de gran interés.