

Efecto de los metabolitos de defensa de la estrella de mar  
*Coscinasterias tenuispina* sobre el desarrollo de especies de interés en  
acuicultura

Effect of defense metabolites of the starfish *Coscinasterias tenuispina*  
on the development of species of interest in aquaculture.



Trabajo fin de carrera

**Laura Cagide Carrillo**

Tutorizado por María Luisa Souto Suárez y Nathália Nocchi

Grado en Biología. Marzo 2023

## **Agradecimientos**

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento al personal del Grupo de Acuicultura Marina Canaria del Centro Oceanográfico de Canarias/ Instituto Español de Oceanografía (COC/IEO)) especialmente a María Jesús Lago Rouco y a Eduardo Almansa Berro por su apoyo de manera incondicional mostrado durante estos meses.

Reconocer públicamente el esfuerzo del Instituto de Bio-Orgánica Antonio González y a su departamento de “Productos Naturales Marinos” (ProdMad) por su implicación durante la realización del Trabajo Fin de Grado.

Por último, quiero reconocer en este trabajo a mi tutora la Doctora María Luisa Souto Suarez y especialmente a mi cotutora la Doctora Nathália Nocchi por su comprensión, entrega y cariño mostrado en el día a día de estas prácticas.

Y a ustedes, ofrecerles mi más sincero reconocimiento. Muchas gracias. Y, sobre todo, gracias por haber creído en mí.

# Índice

Resumen .....	1
Abstract .....	2
1. Introducción .....	3
1.1 Productos naturales marinos .....	3
1.2 Interacciones ecológicas mediadas químicamente y acuicultura.....	4
1.3 Estrellas de mar .....	5
1.4 <i>Coscinasterias tenuispina</i> .....	6
2. Objetivos... ..	8
3. Materiales y métodos .....	8
3.1 Material biológico .....	8
3.1.1 Recolección de <i>Coscinasterias tenuispina</i> .....	8
3.1.2 Biomodelos de los ensayos de alelopatía y toxicidad.....	8
3.2 Bioensayo de alelopatía de los metabolitos exudados en agua.....	10
3.3 Preparación de los extractos .....	10
3.3.1 Extracción de los metabolitos exudados en agua.....	10
3.3.2 Extracción de los metabolitos del material biológico.....	11
3.4 Bioensayos de toxicidad .....	12
3.4.1 Análisis del umbral de toxicidad de los disolventes.....	12
3.4.2 Análisis de toxicidad de los extractos de <i>Coscinasterias tenuispina</i> frente a los organismos .....	12
3.5 Análisis estadísticos.....	13
4. Resultados.....	13
4.1 Bioensayo de alelopatía de los metabolitos exudados en agua.....	13
4.2 Extracción metabolitos .....	14
4.2.1 Metabolitos exudados en agua por <i>Coscinasterias tenuispina</i> .....	14
4.2.2 Metabolitos producidos por <i>Coscinasterias tenuispina</i> .....	15
4.3 Toxicidad .....	16
4.3.1 Análisis del umbral de toxicidad de los disolventes .....	16
4.3.2 Bioensayo de toxicidad con los extractos de <i>Coscinasterias</i> <i>tenuispina</i> en larvas de pulpo.....	17
4.3.3 Bioensayo de toxicidad con los extractos de <i>Coscinasterias</i> <i>tenuispina</i> en artemias .....	18
4.3.4 Bioensayo de toxicidad con los extractos de <i>Coscinasterias</i> <i>tenuispina</i> en rotíferos... ..	20
5. Discusión .....	23
6. Conclusiones .....	26
6. Conclusions .....	26
7. Bibliografía .....	27

# Resumen

Los productos naturales, también conocidos como metabolitos secundarios, son sustancias producidas por microorganismos, plantas y animales. Estos destacan por ser esenciales para la supervivencia de los organismos productores además de por su gran diversidad estructural. Las estrellas de mar (filo Echinodermata) son fuente de fascinantes metabolitos secundarios con potenciales actividades farmacológicas y papeles ecológicos. El objetivo del presente trabajo fue establecer estudios preliminares del efecto de los metabolitos de la estrella de mar *Coscinasterias tenuispina* sobre el desarrollo de especies de interés en acuicultura. Se utilizó como biomodelo para los ensayos de alelopatía y toxicidad larvas del pulpo *Octopus vulgaris*, *Artemia sp.* y rotífero *Brachionus plicatilis*. Tras realizar los experimentos se observó que la estrella de mar exuda en el agua metabolitos alelopáticos tóxicos para las larvas de pulpo, y que los organismos responden de maneras distintas a las sustancias producida por *C. tenuispina*. Las sustancias polares (extracto en agua y en metanol) fueron tóxicas para las larvas pulpo y *Artemia*, mientras que los metabolitos apolares y de media polaridad (extracto hexano y extracto diclorometano) generaron una elevada tasa de mortalidad en rotíferos. De esta manera se ha evidenciado que es crucial el conocimiento de las interacciones ecológicas mediadas químicamente en comunidades marinas, principalmente entre especies de interés en la acuicultura marina para implementación de un sistema de acuicultura multitrófica integrada.

Palabras clave: *Coscinasterias tenuispina*, estrella de mar, toxicidad, alelopatía, productos naturales, metabolitos secundarios, interacciones ecológicas, defensas químicas, comunicación química, pistas químicas, acuicultura.

# Abstract

Natural products, also known as secondary metabolites, are substances produced by micro-organisms, plants and animals. They stand out because they are essential for the survival of the producing organisms in addition to their great structural diversity. Sea stars (phylum Echinodermata) are a source of fascinating secondary metabolites with potential pharmacological activities and ecological roles. The aim of the present work was to establish preliminary studies of the effect of metabolites from the starfish *Coscinasterias tenuispina* on the development of species of interest in aquaculture. Larvae of the octopus *Octopus vulgaris*, *Artemia sp.* and rotifers *Brachionus plicatilis* were used as biomodels for allelopathy and toxicity tests. The experiments showed that the starfish exude allelopathic metabolites into the water that are toxic to octopus larvae, and that the organisms respond differently to the substances produced by *C. tenuispina*. The polar substances (extract in water and methanol) were toxic to octopus and *Artemia* larvae, while the apolar and medium-polar metabolites (hexane extract and dichloromethane extract) generated a high mortality rate in rotifers. Thus, it has become evident that knowledge of chemically mediated ecological interactions in marine communities, mainly between species of interest in marine aquaculture, is crucial for the implementation of an integrated multi-trophic aquaculture system.

Keywords: *Coscinasterias tenuispina*, starfish, toxicity, allelopathy, natural products, secondary metabolites, ecological interactions, chemical defences, chemical communication, chemical cues, aquaculture.

Este trabajo se desarrolló en un entorno colaborativo formado por el grupo de Productos Marinos del Instituto de Bio-Orgánica Antonio González/Universidad de La Laguna (IUBO/ULL), y el Grupo de Acuicultura Marina Canaria del Centro Oceanográfico De Canarias/ Instituto Español de Oceanografía (COC/IEO). Durante todas las etapas de este trabajo estos dos grupos han trabajado de forma coordinada. Los resultados presentados en esa memoria son experimentaciones preliminares que serán utilizados por los grupos de investigación involucrados para el desarrollo del proyecto.

# 1. Introducción

## 1.1. Productos Naturales Marinos

Los productos naturales, también conocidos como metabolitos secundarios, son pequeñas moléculas de relativamente pocos elementos (carbono, hidrógeno, oxígeno y, ocasionalmente, nitrógeno, azufre o halógenos), producidas por microorganismos, plantas y animales. Se destacan gracias a su gran diversidad estructural y grados de complejidad, propios de los variados orígenes biosintéticos de los que proceden. Las primeras teorías sustentan que estos productos eran sustancias residuales del metabolismo primario y, por lo tanto, se acuñó el término metabolitos secundarios, ya que estos metabolitos no se consideraban importantes para el organismo productor como los metabolitos primarios, que participan en los procesos directos de crecimiento, desarrollo y reproducción, y su ausencia provoca una muerte inminente (Williams, 1989). Sin embargo, ahora ya se sabe que tales sustancias se consideran de extrema importancia para la supervivencia de los organismos productores. Además, los productos naturales son potentes y prometedoras fuentes de compuestos bioactivos de interés farmacológico y biotecnológico (Liu, et al. 2019; Maier, 2008).

La biota marina y sus metabolitos, en gran parte inexplorados, se han vuelto accesibles para los biólogos marinos y los químicos orgánicos, aumentando en los últimos 60 años la cantidad de organismos en investigación (Pawlik, et a. 2013). Desde entonces, se han aislado alrededor de 40.000 sustancias de organismos marinos como: microorganismos; macroalgas; esponjas; cnidarios; briozoos; tunicados; corales y equinodermos (Carroll, et a. 2023). Los organismos marinos poseen metabolitos secundarios con una gran diversidad química, ya que, sus estructuras son muy diferentes a las que se hallan en el ambiente terrestre (Demeyer et al., 2014; Kamyab, 2019). Estas sustancias se encuentran distribuidas en varias clases, como terpenos, fenoles, polifenoles, acetogeninas, alcaloides y otros (Carroll, et a. 2023).

El medio marino cubre el 71% de la superficie de la Tierra (Aguilar-Perera, 2019) y su profundidad es muy variable. Los ecosistemas marinos albergan el 80% de los organismos vivos conocidos, que se distribuyen por todos los océanos, el Pacífico, Atlántico, Índico, Antártico y Ártico, cada uno de ellos presenta ecosistemas muy diferentes unos de otros con distintas temperaturas, profundidades, organismos y entidades químicas diferentes a las terrestres (WoRMS, 2023). El medio marino consta de diferentes subsistemas: ecosistemas intermareales, arrecifes de coral y pastos marinos. Es un ambiente que posee una rica biodiversidad que va desde organismos primitivos hasta organismos más complejos (Thushari y Senevirathna, 2020). Las duras condiciones bióticas y abióticas marinas favorecieron a los organismos la producción de una gran variedad de moléculas con estructuras únicas en términos de diversidad, características estructurales y funciones para garantizar su aptitud, supervivencia e interacciones ecológicas con el entorno en el que viven (Hay, et al. 2019).

## **1.2. Interacciones ecológicas mediadas químicamente y acuicultura**

La primera forma de interacción entre organismos probablemente se llevó a cabo mediante la transferencia de información química (Lindsey, et al. 1974). Una variedad de compuestos influye en las interacciones entre organismos de manera positiva o negativa a niveles intraespecíficos e interespecíficos. En particular, estos compuestos pueden funcionar como "señales" intencionales o como "pistas" liberadas involuntariamente (Saha, et al. 2019). Estas sustancias, que pueden percibirse en muy bajas concentraciones, juegan un papel importante en el ajuste conductual y fisiológico de los organismos receptores en el reconocimiento de su entorno y en el mantenimiento de la estructura, función y equilibrio de los ecosistemas. El rango de peso molecular de las señales químicas es amplio. Los organismos marinos detectan moléculas orgánicas pequeñas (es decir, < 1,5 kDa), llamadas metabolitos secundarios, hasta péptidos, proteínas y complejos proteicos (Kamio, et al. 2022).

La información química forma una gran parte del lenguaje de la vida en el mar. Es ubicua y proviene de fuentes abióticas y bióticas intraespecíficas e interespecíficas. Para la mayoría de las especies marinas, las sustancias químicas determinan estrategias de alimentación, respuestas a depredadores, respuestas alelopáticas, asociaciones, selección de anfitrión, reproducción, asentamiento y metamorfosis larval, interacciones competitivas, jerarquías de dominancia y transferencia de energía y nutrientes dentro y entre los ecosistemas marinos. Los estudios sobre estas interacciones mediadas químicamente entre organismos brindan información sobre la ecología y la evolución de las comunidades marinas (Brönmark, et al. 2000; Vos, et al. 2006; Hay, et al. 2019).

El conocimiento de las interacciones ecológicas mediadas químicamente ya se utiliza para gestionar procesos agrícolas en contextos terrestres, pero las aplicaciones en sistemas marinos están poco exploradas. Metabolitos producidos y exudados por organismos marinos pueden ser, por ejemplo, alelopáticos, o sea, tóxicos para otros organismos, lo que perjudica las redes en el contexto de la acuicultura. La comunicación química podría explotarse para ayudar a gestionar múltiples especies acuícolas en un entorno comunitario (Saha, et al. 2019).

La mejor comprensión de este lenguaje químico puede brindar nuevas herramientas y estrategias para la gestión de comunidades ecológicas artificiales en entornos cerrados o sistemas semicerrados de especies de interés en la acuicultura marina (Kamio, et al. 2022). Proporcionando vías potenciales para el crecimiento de la acuicultura marina sostenible a través del desarrollo de una base de conocimientos fortalecida, innovación mejorada, capacidad predictiva, y planes de gestión adaptables para el uso sostenible y optimizado de los recursos marinos (Saha, et al. 2019). Por lo tanto, mejorar nuestra comprensión de la ecología química entre las especies de interés en acuicultura puede beneficiar sustancialmente a las industrias marinas, el sistema de acuicultura multitrófica y mejorar el crecimiento económico azul.

### **1.3. Estrellas de mar**

Los asteroideos (Asteroidea), conocidos popularmente como estrellas de mar, son miembros de Echinodermata, un importante filo de invertebrados que se encuentra exclusivamente en entornos marinos (Mutschke y Mah, 2009; Barreto, 2019). Estos organismos son componentes importantes y conspicuos en la estructuración de las comunidades bentónicas marinas (especies clave) (Dong, et al. 2011). De singular relevancia científica, las estrellas de mar han atraído un interés debido a su amplia adaptabilidad a varios hábitats (intermareal a abisal; polar a templado a tropical), diversidad de dieta (herbívoros, carnívoros, omnívoros, detritívoros) (Motti, et al. 2018), gran rango de tamaño y, a menudo, su alta fecundidad y regeneración (Cortés-Rivera, et al. 2016). A parte son fuentes de fascinantes metabolitos secundarios estructuralmente diversificados que exhiben diferentes potenciales de actividades farmacológicas (Dong, et al. 2011) y papeles ecológicos.

Está ampliamente establecida la capacidad quimiosensorial (de corto a largo plazo) como componente integral de la ecología de Asteroidea. Los metabolitos secundarios de las estrellas de mar tienen roles ecológicos relevantes como señales y pistas químicas para reproducción, desove, asentamiento y metamorfosis de larvas, detección de presas y búsqueda de alimento,



iniciación y mantenimiento de simbiosis, agregación, ubicación del hábitat y estrategias de defensa contra depredador y alelopatía (Motti, et al. 2018).

Las estrellas de mar tienen un alto contenido de valiosos nutrientes como vitaminas, minerales y metabolitos como péptidos, esteroides, compuestos fenólicos, antraquinonas, alcaloides, fosfolípidos, ácidos grasos, esfingolípidos, glicosaminoglicanos, polisacáridos sulfatados y lectinas (Popov, et al. 2022; Bordbar, et al. 2011). Entre estos compuestos, los más interesantes son los esteroides, tanto apolares como polares, los glucósidos triterpénicos y los lípidos polares. Forman un gran grupo de compuestos biológicamente activos, incluidos los polihidroxiesteroides, los glucósidos relacionados y los oligoglucósidos de esteroides (asterosaponinas) (Popov, et al. 2022) con acciones citotóxicas, antifúngicas, antivirales, antibacterianas, antiinflamatorias, analgésicas, ictiotóxicas, hemolíticas, antibioincrustantes, anticancerígenas, inmunomoduladoras y neuritogénicas (Maier, 2005; Maier, 2008; Demeyer, et al. 2014).

Actualmente, muchas especies marinas son candidatas potenciales para la diversificación de la acuicultura (Sonnenholzner-Varas, 2021; Reina-Hernández, 2022). Entre ellas, las estrellas de mar presentan un gran potencial para su cultivo acuícola por todas sus características biológicas y químicas ya mencionadas anteriormente, que las tornan una especie de interés tanto para uso en la alimentación acuícola mediante la preparación de harinas como suplemento en la dieta de especies marina y/o para producción de sustancias bioactivas de interés biotecnológico. Otra de las ventajas de cultivar estrellas de mar es su gran potencial para su integración en sistemas de acuicultura multitrofica integrada, ya que se pueden mantener fácilmente con los desechos de tanques de otros cultivos de especies marinas (Reina-Hernández, 2022). Sin embargo, hay que tener en cuenta la presencia y efectos de sus metabolitos en otras especies importantes en los sistemas de acuicultura cerrados y semicerrados.

#### ***1.4. Coscinasterias tenuispina***

*Coscinasteria tenuispina* (Figura 1), conocida popularmente como estrella espinosa azul o estrella de espinas finas, es una estrella de mar perteneciente al filo Echinodermata, clase Asteroidea, orden Forcipulatida y familia Asteroidea (Reina-Hernández, 2022; Barreto, 2019), que alcanza hasta 18 cm de tamaño. Se trata de un organismo con una simetría irregular y posee entre 6 y 12 (generalmente 7) (Ergüden y Turan, 2017) brazos que se localizan alrededor del disco central. *C. tenuispina* presenta en la parte superior unas espinas que se localizan de forma irregular sobre los brazos de estas en 5 hileras longitudinales. Su



**Figura 1:** Ejemplar de *Coscinasterias tenuispina* (Foto: Laura Cagide)

coloración es variable ya que en la parte superior es amarillento-blanquecino con machas pardonegruzcas o amarillas (Ergüden y Turan, 2017), también pueden ser rojas o azul turquesa con textura áspera debido a sus espinas, pero su parte inferior es siempre de color blancoamarillento a amarillo.

Esta especie vive comúnmente en el infralitoral (Reina-Hernández, 2022), una zona completamente marina. Se puede encontrar desde aguas superficiales en la zona del intermareal hasta los 50 metros de profundidad (Barreto, 2019; Ergüden y Turan, 2017), además de ser capaz de vivir

en ambientes hidrodinámicos. *C. tenuispina* se puede localizar en el mar Mediterráneo, Francia, España y Portugal, las Azores y otras islas del Atlántico, las Bermudas, Cuba y la costa americana entre Carolina del Norte y Santos, Brasil (Barreto, 2019). Generalmente es observada en hábitats rocosos (Ergüden y Turan, 2017) y suelen ser más activas por la noche (Vicens, 2009).

Este género es heterogónia, es decir, posee una reproducción tanto sexual como asexual (Vicens, 2009; Alves, et al. 2002; Seto, et al. 2013; García-Cisneros, et al. 2017). Normalmente se reproduce sexualmente en invierno mientras que en verano prolifera por reproducción asexual debido a la fuerte influencia de la temperatura y la alimentación (García-Cisneros, et al. 2017). Para ello el disco germinativo se rompe en dos secciones en un proceso denominado fisión (Sterling y Schuster, 2011), desarrollando brazos adicionales y convirtiéndose en un nuevo individuo, ésta, suele ocurrir en la etapa adulta de los individuos (Reina-Hernández, 2022; Alves, et al. 2002). Esta especie presenta una gran capacidad de regeneración. Por otro lado, la reproducción sexual de las estrellas también está regulada por factores externos. La producción de las gónadas está relacionada con la temperatura mientras que otros factores, como por ejemplo el fotoperiodo regula el momento reproductivo. En Canarias las poblaciones de *C. tenuispina* son parcialmente clonales, y están formadas por varios genotipos (García-Cisneros, et al. 2017).

Algunos autores destacan la especie *C. tenuispina* por sus propiedades farmacológicas (Reina-Hernández, 2022; Maier, 2005). Estas pueden deberse por esteroides, saponinas, derivados glicosilados que muestran un amplio espectro de actividades biológicas como propiedades antitumorales, antiinflamatorias, antialérgicas y antivirales entre otras (Thao, et al. 2015).

## 2. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo fue establecer estudios preliminares del efecto de los metabolitos de la estrella de mar *C. tenuispina* sobre el desarrollo de especies de interés en acuicultura en Canarias.

Para la consecución de este trabajo, se abordaron los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto alelopático de los metabolitos de *C. tenuispina* exudados en el agua sobre larvas de pulpo.
2. Extraer los metabolitos producidos por *C. tenuispina*.
3. Evaluar la toxicidad de los diferentes extractos de *C. tenuispina* frente a larvas de pulpo, rotíferos y artemias.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Material biológico.

#### 3.1.1. Recolección de *Coscinasterias tenuispina*.

Especímenes de la estrella de mar *C. tenuispina* fueron recolectados en las canaletas y zonas de desagüe de los tanques de la planta de cultivo del Centro Oceanográfico de Canarias del Instituto Español de Oceanografía (COC-IEO-CSIC). *C. tenuispina* es muy abundante en estas canaletas porque se alimentan de efluentes y restos de alimentos de estos tanques.

Los individuos recolectados fueron mantenidos en tanques de cultivo con régimen de luz correspondiente al fotoperiodo natural, flujo caudal de entrada del agua de las mismas canaletas donde fueron recolectadas. Se colocaron algunas rocas en el fondo del tanque como refugios, mejorando su adaptación a la cautividad. Parte de los individuos recolectados fueron usados en los experimentos de toxicidad de los metabolitos exudados y la mayor parte destinada para la extracción de los metabolitos.

#### 3.1.2. Biomodelos de los ensayos de alelopatía y toxicidad

La toxicidad y alelopatía de los metabolitos de *C. tenuispina* fue evaluada en tres organismos marinos: paralarvas de pulpo común *Octopus vulgaris*, nauplios de *Artemia* sp. y rotífero *Brachionus plicatilis*. Las especies seleccionadas son representativas de diferentes *phylum* del ambiente marino, lo que permite una idea preliminar del efecto de la toxicidad de los compuestos en diferentes tipos de organismos marinos. Además, son especies claves y de

gran interés en la acuicultura y cumplen con los requisitos básicos para ser empleados en los estudios de toxicidad: rápido desarrollo, alta fecundidad y fácil manejo. Siendo excelentes biomodelos de estudio de toxicidad de metabolitos de organismos marinos en el ambiente. Cabe resaltar que, debido a la singularidad de las especies en estudio, los datos no son comparables con cultivos celulares *in vitro* y no hay otras alternativas experimentales que confirmen la viabilidad de los ensayos que usan estos organismos modelo.

La obtención y mantenimiento de los organismos, y los bioensayos se realizaron en el Centro Oceanográfico De Canarias/ Instituto-Español de Oceanografía (IEO-CSIC). Los experimentos se realizaron, en la medida de lo posible, siguiendo las Directrices para el cuidado y bienestar de los cefalópodos publicado por Fiorito et al. (2015). Además, en todos los experimentos se minimizó el uso de los animales a lo estrictamente necesario.

Para obtención de las paralarvas de pulpo, los reproductores de *O. vulgaris* fueron capturados por pescadores artesanales profesionales en Tenerife y transportados según Pieroni, et al. (2022). Los individuos se mantuvieron aislados en tanques de fibra de vidrio de 4.000 L según Iglesias, et al. (2014) y Ponte, et al. (2022), bajo un fotoperiodo natural de ubicación geográfica de recolección (de 10:14 a 11:13 - luz: oscuridad), temperatura  $20,7 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  y salinidad  $36,8 \pm 0,1$ . Alrededor del 50% de la superficie de cada tanque se cubrió con una red verde sombreada. El flujo de agua del tanque de cultivo fue de 6 L/min. Cada día se suministró *ad libitum* a los reproductores una mezcla de calamares y cangrejos congelados. Se colocaron refugios de PVC dentro de los tanques para proporcionar 2 ó 3 puntos de refugio para cada espécimen. La presencia de huevos se verificó semanalmente para evitar molestar a los criadores. Una vez producida la puesta de huevos, la hembra se mantuvo en un tanque de incubación de 500 L a la misma temperatura del agua. La hembra cuidó de la puesta sin ser alimentada hasta la eclosión. Las crías de *O. vulgaris* se sacaron del tanque de incubación 12 h antes del inicio de los experimentos para garantizar que sólo se utilizaban paralarvas recién eclosionadas.

Los nauplios de *Artemia* sp. se obtuvieron por eclosión de los quistes (INVE Aquaculture, Bélgica), después de un proceso de descapsulación (Sorgeloos, et al. 2001) e incubación (Reis, et al. 2017). Los rotíferos (*B. plicatilis*), cepa S1, se cultivaron en tanques de 1500 L, bajo condiciones de luz continua (2000 lux), agua con temperatura de  $23^{\circ}\text{C}$ , salinidad de 25 ppm, aireación moderada y alimentados con levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*).

## 3.2 Bioensayo de alelopatía de los metabolitos exudados en agua

Se realizó un bioensayo preliminar en laboratorio con paralarvas de pulpo para evaluar el efecto alelopático de los metabolitos liberados en el agua por *C. tenuispina*. El diseño experimental consistió en exponer las larvas a dos tratamientos y un Control:

- Tratamiento Presencia: las larvas fueron expuestas en acuarios junto con una estrella ( $32 \pm 13$  g).
- Tratamiento Macerado: este tratamiento consistió en exponer las larvas al agua donde ha estado una estrella ( $41 \pm 6$  g) previamente durante 24 h.
- Control: las larvas fueron expuestas solamente al agua de mar.

Los experimentos fueron realizados en acuarios con 1 litro de agua del mar a 20°C y aireación constante. La densidad larvaria fue de 10 paralarvas por litro. En ambos tratamientos, las estrellas se sumergieron dentro de una bolsa de malla de 500 micras para evitar que atrapen o ingieran las paralarvas. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Al final de 24h de exposición fue contabilizado el número de larvas vivas y muertas para realización del cálculo de porcentaje de mortalidad:

$$\% \text{ mortalidad} = (NM * 100) / NT$$

Siendo NT= Número total de individuos y NM= Número total de individuos muertos

Posteriormente toda el agua utilizada en este experimento fue congelada para la extracción y evaluación de los metabolitos exudados.

## 3.3 Preparación de los extractos

### 3.3.1. Extracción de los metabolitos exudado en agua

Tras obtener las muestras del bioensayo de alelopatía obtuvimos un total de 8 litros (3 muestras de 1 litro cada una de las réplicas de Control, 2 muestras de 1 litro cada una de las réplicas de Presencia, 3 muestras de 1 litro cada una de las réplicas de Macerado)

Para evaluar las sustancias alelopáticas tóxicas producidas y exudadas por *C. tenuispina*, fue llevada a cabo la extracción de los metabolitos presentes en el agua de mar de los tratamientos y Control del experimento descrito el apartado 3.2 en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos RP-C18 (25-40  $\mu$ m, 5 g, Götec®). Este cartucho se caracteriza por la presencia de resina en su interior, de tal manera que, los compuestos presentes en las muestras de agua quedaron retenidos. Inicialmente todos los cartuchos utilizados se estabilizaron con

12,5 mL de MeOH de HPLC, a continuación, fueron acondicionados utilizando 37,5 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1). Seguidamente se pasaron las muestras de agua quedando los compuestos exudados atrapados en el cartucho. Finalizando este proceso los cartuchos fueron lavados con 7,5 mL de H<sub>2</sub>O destilada para eliminar las sales adheridas a la resina del cartucho. Al eliminar las sales se realizó una extracción de los metabolitos absorbidos con 17,5 mL de MeOH. Una vez extraídos los compuestos se procedió a la eliminación del disolvente mediante el rotavapor. Los extractos de los metabolitos exudados en agua obtenidos a partir de los 3 tratamientos (Control, Presencia y Macerado) se almacenaron a -4°C hasta su posterior uso.

### 3.3.2. Extracción de los metabolitos del material biológico

Los ejemplares de *C. tenuispina* recolectados para extracción de los metabolitos fueron sometidos a un proceso de extracción utilizando agua y distintos disolventes orgánicos para explorar un amplio rango de polaridad y extraer el mayor número de sustancias posibles producidas por la estrella.

Inicialmente las estrellas frescas fueron sometidas a una extracción acuosa en agua desionizada (2,47 mL/g de estrella fresca, cantidad suficiente para sumergir todo el material) a 4°C durante 24 horas. Después de este periodo, se sacaron las estrellas y el agua fue filtrada. Este procedimiento de extracción y filtración se repitió tres veces. Al final se liofilizó el agua de las 3 extracciones separadamente, obteniendo 3 extractos acuosos: extracto H<sub>2</sub>O1, H<sub>2</sub>O2 y H<sub>2</sub>O3. Los extractos fueron almacenados a -20 °C.

Finalizada la extracción acuosa, el residuo del material biológico fue congelado, liofilizado, triturado y sometido a re-extracción. Esta segunda etapa consistió en una extracción secuencial por maceración con los disolventes orgánicos en polaridad creciente: hexano (HEX), diclorometano (DCM) y metanol (MeOH), respectivamente. Todas las extracciones fueron realizadas a temperatura ambiente, en la proporción de 7 mL de disolvente para cada gramo de estrella seca, asistida por ultrasonido durante 20 min y seguido de 24 horas (h) de reposo. Después de ese periodo se filtró el disolvente y se volvió a extraer el material biológico con el mismo disolvente. Este procedimiento se realizó 3 veces para cada disolvente. Los disolventes de las 3 extracciones de cada caso fueron reunidos y eliminados a presión reducida empleando el rotavapor. Al final se obtuvo 3 extractos orgánicos secuenciales: extracto Hex, extracto DCM y extracto MeOH. Las muestras fueron almacenadas a -4°C hasta su posterior uso en los ensayos de toxicidad con los diferentes biomodelos seleccionados.

### 3.4 Bioensayos de toxicidad

#### 3.4.1 Análisis del umbral de toxicidad de los disolventes

Se realizó un bioensayo inicial para determinar la toxicidad de los disolventes en paralarvas de pulpo (*O. vulgaris*), rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y *Artemia sp.* con la finalidad de determinar qué disolvente emplear al objeto de solubilizar los extractos acuosos y orgánicos en los siguientes experimentos con los organismos modelos. Los disolventes propuestos fueron dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (MeOH) y etanol (EtOH). El ensayo consistió en exponer a los diferentes organismos durante un transcurso de 24 horas con los disolventes propuestos a distintas concentraciones: 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1% y 0,05% en agua de mar. El agua de mar fue utilizada como Control en los experimentos realizados. Los experimentos se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos con volumen final de 2,5 mL. En el caso de *O. vulgaris* se realizaron 6 réplicas añadiendo un total de 3 larvas por pocillo. Para las artemias y los rotíferos se elaboraron 3 réplicas añadiendo 250 y 625 individuos por pocillo, respectivamente. Al finalizar el análisis del umbral de toxicidad de los disolventes, se contabilizó la mortalidad y la supervivencia de cada uno de los organismos para determinar el % de mortalidad.

#### 3.4.2 Análisis de toxicidad de los extractos de *Coscinasterias tenuispina* frente a los organismos

El diseño experimental del ensayo de toxicidad consistió en exponer a los distintos organismos propuestos a diferentes extractos de *C. tenuispina* obtenidos previamente (orgánicos y acuosos). De cada extracto (H<sub>2</sub>O1, H<sub>2</sub>O2, H<sub>2</sub>O3, MeOH, DCM, HEX) se preparó una solución madre de 50 mg/ml en DMSO. En los primeros pocillos de las placas de 24, se añadieron 10 µL del extracto. Seguidamente, mediante una pipeta, se homogeneizó la muestra realizando diluciones seriadas (100 µL/mL, 50 µL/mL, 25 µL/mL, 12,5 µL/mL, 6,25 µL/mL, 3,75 µL/mL) en agua de mar. El DMSO fue usado como blanco de disolvente en la concentración máxima de 0,2% y agua de mar como Control, en todos los experimentos. Se añadieron 3 individuos de *O. vulgaris*, 250 de *B. plicatilis* y 625 de artemias, por pocillo, sumando un volumen total de 2,5 mL. El periodo de exposición fue de 24 horas para las larvas de pulpo y 48 horas para artemias y rotíferos. Se contabilizó la mortalidad cada 24 horas para obtener el % de mortalidad.

### 3.5 Análisis estadísticos

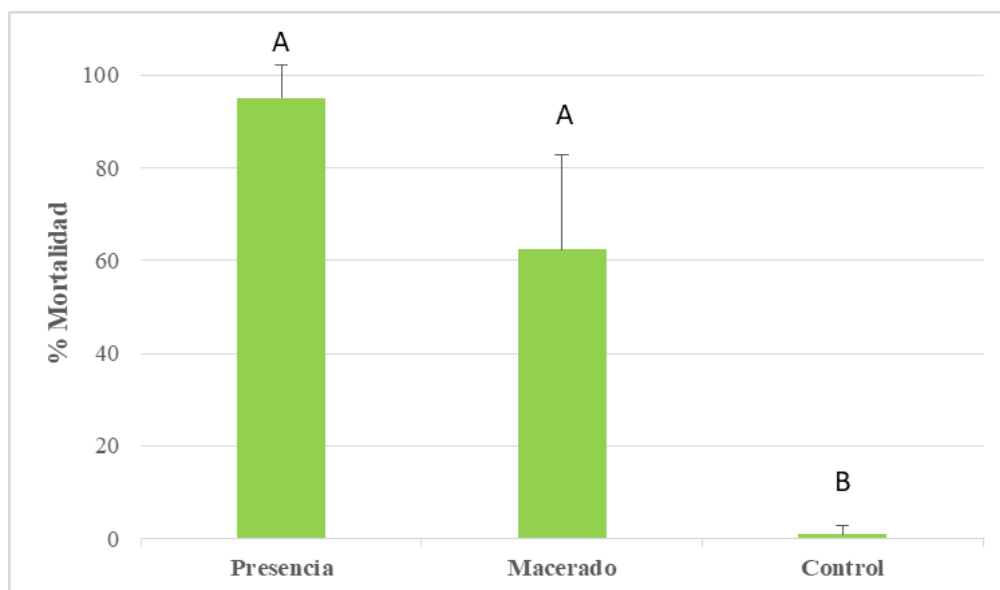
Para evaluar la toxicidad de las sustancias producidas y exudadas por *C. tenuispina*, los datos obtenidos de mortalidad de los organismos estudiados fueron analizados mediante un test de varianza ANOVA. Para el bioensayo de toxicidad de los metabolitos exudados en agua se utilizó ANOVA 1 factor, mientras que, para los bioensayos de toxicidad: análisis del umbral de toxicidad de los disolventes y análisis de los extractos en organismos (*O. vulgaris*, *B. plicatilis* y *Artemia sp.*) se utilizó ANOVA 2 factores (extractos o disolventes y concentraciones). Ante la existencia de diferencias significativas en los experimentos, se procedió al análisis de comparaciones múltiples (prueba post-hoc) a través del test HSD de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Todo ello se realizó mediante un programa de Interfaz Gráfica de Usuario denominado JAMOVI.

## 4. Resultados

### 4.1 Bioensayo de alelopatía de los metabolitos exudados en agua

Una vez transcurridas las 24 horas del experimento del bioensayo de alelopatía con los metabolitos exudados en agua de *C. tenuispina* que se realizó con las larvas de pulpo *O. vulgaris* se observaron los siguientes resultados. Los tratamientos Presencia y Macerado produjeron una mortalidad de 95% y 62%, respectivamente frente al Control en que se observó una mortalidad de 1% (Figura 2). En los tratamientos con *C. tenuispina* no se observó diferencias entre el % de mortalidad, sin embargo, estos tratamientos sí presentaron una diferencia significativa con el Control (ANOVA:  $F= 134$  y  $P= 0,009$ ). Estos resultados indican que la estrella de mar liberó metabolitos secundarios al agua que resultaron significativamente tóxicos para las larvas de pulpo.





**Figura 2.** Porcentaje (%) de mortalidad de las larvas de pulpo *Octopus vulgaris* en el bioensayo de alelopatía de los metabolitos de *Coscinasterias tenuispina* exudados en agua pasadas 24 horas de experimento. Dónde, Presencia: las larvas estaban expuestas con una estrella, Macerado: las larvas estaban expuestas al agua donde ha estado una estrella previamente durante 24 h y Control: las larvas estaban solamente en agua de mar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (Post-Hoc de Tukey,  $p < 0,05$ ) en el test de ANOVA de un factor ( $F = 134$  y  $p = 0,009$ ).

## 4.2 Extracción metabolitos

### 4.2.1 Metabolitos exudados en agua por *Coscinasterias tenuispina*

Para la extracción de los metabolitos presentes en agua de mar utilizadas en los experimentos de alelopatía de los metabolitos exudados en agua mencionados en la sección 3.3.1, se utilizó un cartucho RP-C18 (25-40  $\mu\text{m}$ , 5 g, Götec®).

En la tabla 1 se adjunta la concentración de los metabolitos exudados en agua realizada en el bioensayo de toxicidad, donde se observó una mayor concentración de metabolitos en los tratamientos de Presencia y Macerado, confirmando que *C. tenuispina* libera metabolitos alelopáticos tóxicos para larvas de pulpo en el agua de mar.

**Tabla 1.** Concentraciones de los metabolitos extraídos del agua de mar de los tratamientos del experimento de bioensayo de alelopatía de los metabolitos exudados en agua.

Tratamientos	Concentración en agua (mg/L)	Concentración en la estrella (mg/g de material biológico fresco)
Control	16,2	
Presencia	77,9	3,5
Macerado	74,8	3,0

#### 4.2.2 Metabolitos producidos por *Coscinasterias tenuispina*

El total de individuos que se obtuvo para la extracción en este estudio fue de 39 estrellas con un peso húmedo de 808,5 gramos. Una vez deshidratadas en el liofilizador su peso en seco fue de 169,8 gramos. A partir de este material fueron obtenidos 3 extractos acuosos y 3 extractos orgánicos en MeOH, DCM y HEX.

El mayor rendimiento se obtuvo de los extractos acuosos, que sumados se obtuvo un rendimiento de 21,6 % (H<sub>2</sub>O1= 10,0%, H<sub>2</sub>O2= 7,2% y H<sub>2</sub>O3= 4,4%) y metanólico (MeOH = 18,9%). Demostrando que *C. tenuispina* produce gran cantidad de sustancias polares. En la tabla 2 se adjuntan las masas y los rendimientos de los extractos.

**Tabla 2.** Masa (g) y rendimiento (%) de extractos acuosos (H<sub>2</sub>O1, H<sub>2</sub>O2 y H<sub>2</sub>O3) y extractos orgánicos (HEX= extracto en hexano, DCM= extracto en diclorometano y MeOH= extracto en metanol) obtenidos de *Coscinasterias tenuispina*.

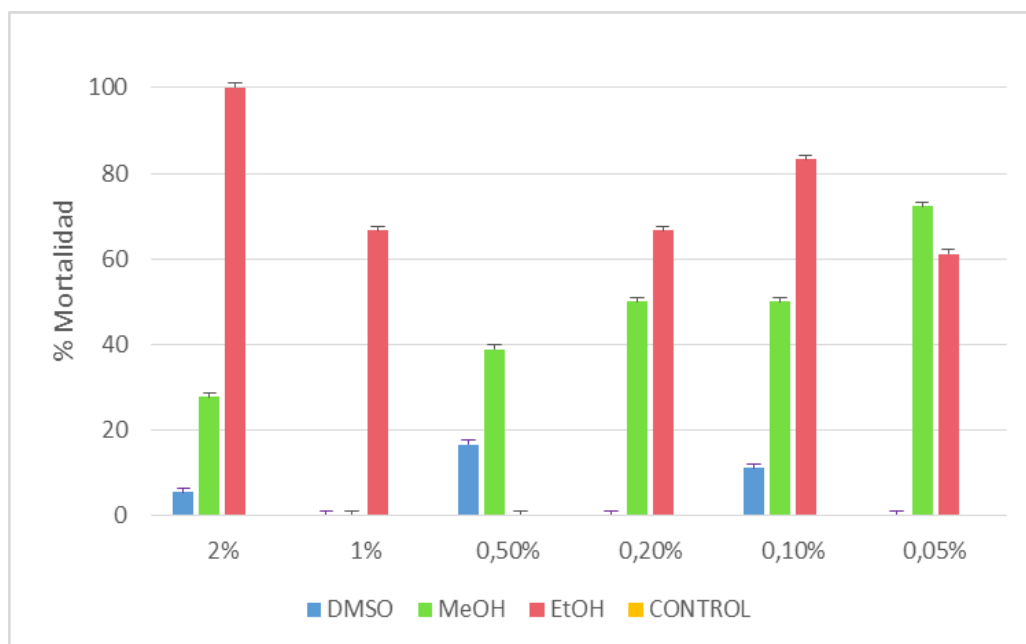
Extracto	Masa (g)	Rendimiento del extracto (%) con relación al material biológico seco
H <sub>2</sub> O1	17,1	10,0%
H <sub>2</sub> O2	12,3	7,2%
H <sub>2</sub> O3	7,5	4,4%
HEX	6,8	4,0%
DCM	2,1	1,2%
MeOH	32,1	18,9%

## 4.3 Toxicidad

### 4.3.1 Análisis del umbral de toxicidad de los disolventes

Se realizó un ensayo con los disolventes DMSO, MeOH y EtOH con el objeto de determinar el grado de toxicidad de cada uno de ellos en los organismos elegidos como biomodelos de toxicidad. Transcurrido el periodo de duración del experimento, 24 horas, se contabilizaron los organismos vivos y muertos. El pulpo fue el organismo más sensible a los disolventes, en comparación a las artemias y los rotíferos, que, tuvieron una supervivencia de 100% con todos los disolventes y concentraciones probadas. De esta manera lo que determinó la elección del disolvente y la concentración menos tóxica para los experimentos fue la mortalidad en larvas de pulpo.

En la figura 3 se representa el % de mortalidad en el ensayo con las larvas de pulpo. Se observó que los disolventes más tóxicos fueron metanol y etanol. El DMSO, en sus distintas concentraciones: 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1% y 0,05% provocó una menor tasa de mortalidad. A partir de estos resultados, el DMSO fue seleccionado para solubilizar las muestras (extractos) usados en los experimentos posteriores a una concentración máxima de 0,2%. En la tabla 3 están descritos los resultados del análisis estadístico ANOVA de dos factores (disolventes y concentración) empleados para el tratamiento de los datos obtenidos en este experimento.



**Figura 3.** Porcentaje (%) de mortalidad de las larvas de pulpo *Octopus vulgaris* en el bioensayo del umbral de toxicidad de los disolventes pasadas 24 horas (DMSO= dimetilsulfóxido, MeOH

= metanol, EtOH= etanol,) a distintas concentraciones (2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1% y 0,05%.) y Control (agua de mar).

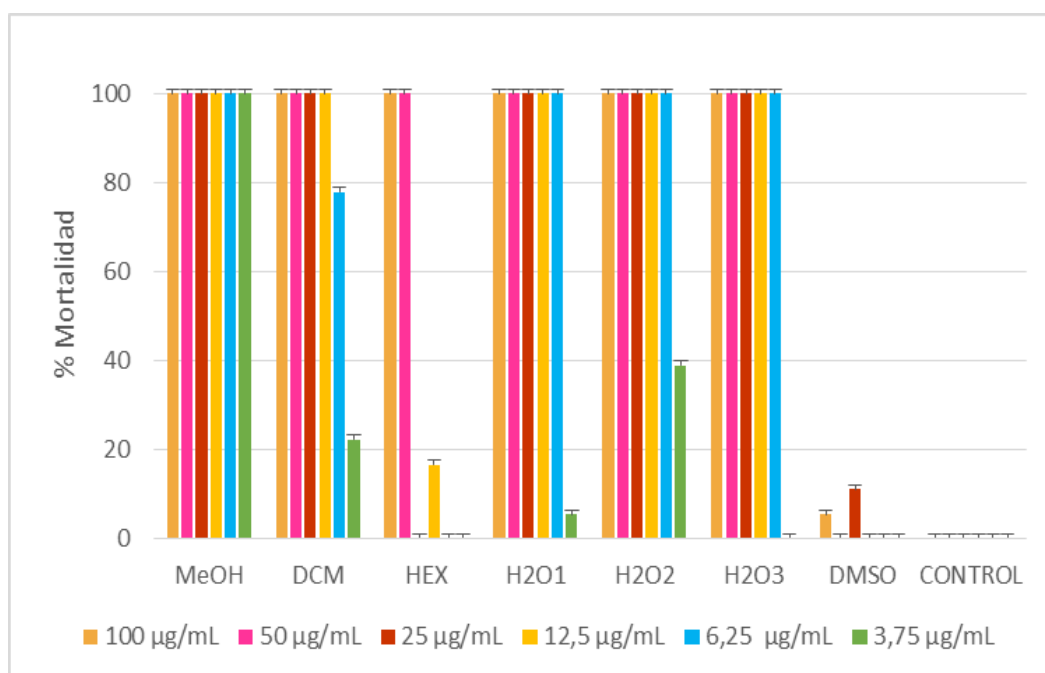
**Tabla 3.** Resultados del análisis estadístico ANOVA de 2 factores (F) realizado en el bioensayo del umbral de toxicidad con los disolventes y las larvas de pulpo *Octopus vulgaris*. GL= grados de libertad; valor de  $p \leq 0,05$  representa diferencias significativas.

	Suma de cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
<b>Concentración</b>	10732	5	2146	2,12	0,068
<b>Extracto</b>	95285	3	31762	31,31	<,001
<b>Concentración*Extracto</b>	43346	15	2890	2,85	<,001
<b>Residuos</b>	121745	120	1015		

#### 4.3.2 Bioensayo de toxicidad con los extractos de *Coscinasterias tenuispina* en larvas de pulpo

En el bioensayo con *O. vulgaris* los organismos fueron expuestos durante 24 horas a los extractos orgánicos y acuosos de *C. tenuispina*. Transcurrido dicho periodo se determinó el % de mortalidad, que se puede observar en la figura 4.

Todos los extractos a concentraciones elevadas (100 y 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) fueron significativamente tóxicos para las larvas de *O. vulgaris*, produciendo una mortalidad de 100%. El extracto más tóxico fue el metanólico (MeOH), provocando el 100% de mortalidad en todas las concentraciones ensayadas. Los extractos acuosos (H<sub>2</sub>O1, H<sub>2</sub>O2 y H<sub>2</sub>O3) fueron los siguientes en provocar una elevada tasa de mortalidad, siendo la concentración de 3,75  $\mu\text{L}/\text{mL}$  la menos tóxica. El extracto hexánico (HEX) no presentó toxicidad en bajas concentraciones con tasa de mortalidad comparadas al Control. En la tabla 4 están descritos los resultados del análisis estadístico ANOVA de dos factores (extracto y concentración) empleados para el tratamiento de los datos obtenidos en este experimento.



**Figura 4.** Porcentaje (%) de mortalidad de *O. vulgaris* en el bioensayo de toxicidad de los extractos con larvas de pulpo pasadas 24 horas con los extractos orgánicos y acuosos (MeOH, DCM, Hex, H<sub>2</sub>O<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) de *Coscinasterias tenuispina* en las diferentes concentraciones (100 µL/mL, 50 µL/mL, 25 µL/mL, 12,5 µL/mL, 6,25 µL/mL, 3,75 µL/mL), el disolvente DMSO (Blanco) y el Control (agua de mar).

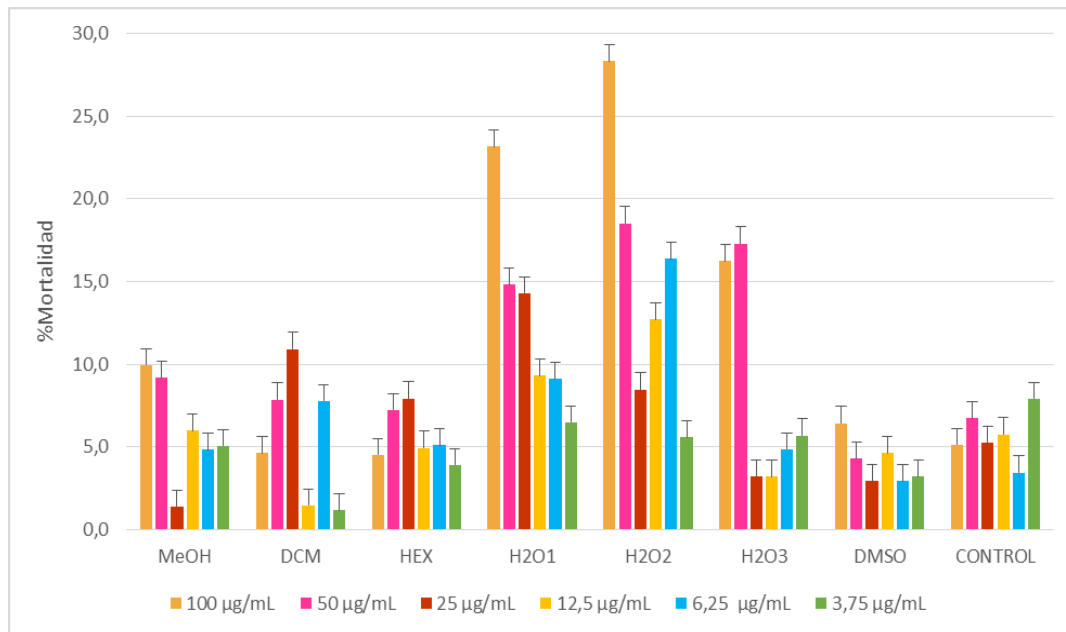
**Tabla 4.** Resultados del análisis estadístico ANOVA de 2 factores (F) realizado en el bioensayo de toxicidad de los extractos con las larvas de pulpo *Octopus vulgaris*. GL= grados de libertad; valor de p≤0,05 representa diferencias significativas.

	Suma de cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
<b>Concentración</b>	0	NaN			
<b>Extracto</b>	415810	7	59401		<,001
<b>Concentración*Extracto</b>	120813	35	3452		<,001
<b>Residuos</b>	28333	230	123		

#### 4.3.3 Bioensayo de toxicidad con los extractos de *Coscinasterias tenuispina* en artemias

En el bioensayo con *Artemia sp.* los organismos fueron expuestos a un periodo total de 48 horas a los extractos orgánicos y acuosos de *C. tenuispina*. Transcurridas las primeras 24 horas se determinó el % de mortalidad, que se puede observar en la figura 5. Los extractos acuosos (H<sub>2</sub>O<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) a la concentración máxima (100 µL/mL) produjeron un porcentaje de mortalidad de 23,6%, 28,3% y 16,2%, respectivamente, mientras tanto, en la concentración de 50 µL/mL los extractos acuosos produjeron una mortalidad de 14,8%, 18,5% y 17,3%, respectivamente, siendo los más tóxicos. El resto de los extractos presentaron una baja

toxicidad, con menos del 10% de mortalidad. En la tabla 5 están descritos los resultados del análisis estadístico ANOVA de dos factores (extracto y concentración) empleados para el tratamiento de los datos obtenidos en este experimento.



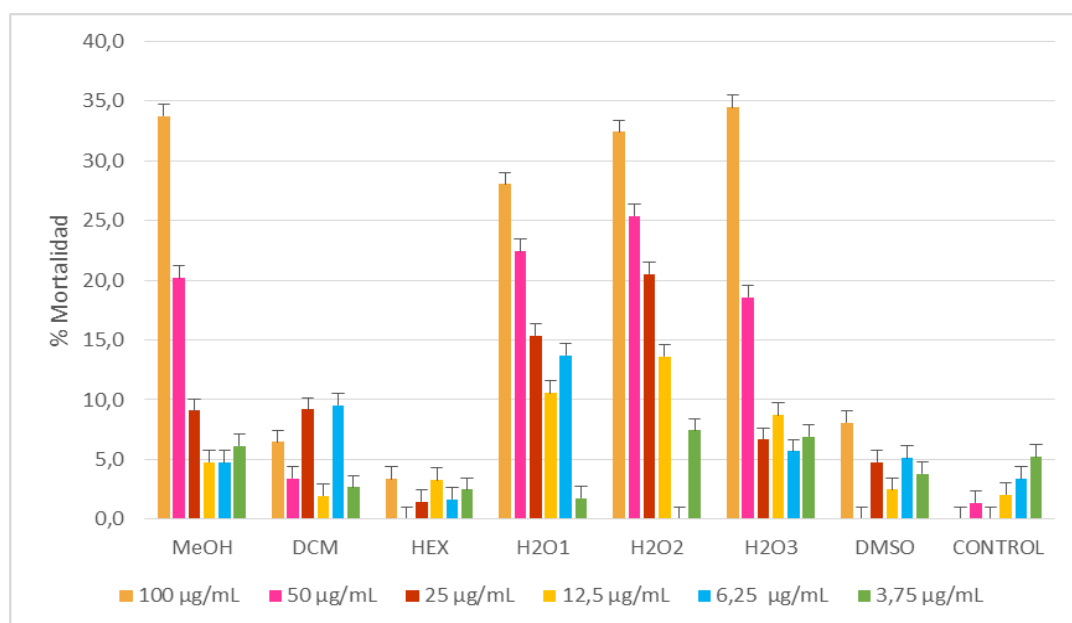
**Figura 5.** Porcentaje (%) de mortalidad de *Artemia sp.* en el el bioensayo de toxicidad de los extractos con rotífero pasadas 24 horas con los extractos orgánicos y acuosos, (MeOH, DCM, Hex, H<sub>2</sub>O1, H<sub>2</sub>O2, H<sub>2</sub>O3) de *Coscinasterias tenuispina* en las diferentes concentraciones (100 µL/mL, 50 µL/mL, 25 µL/mL, 12,5 µL/mL, 6,25 µL/mL, 3,75 µL/mL), el disolvente DMSO (Blanco) y el Control (agua de mar).

**Tabla 5.** Resultados del análisis estadístico ANOVA de 2 factores (F) realizado en el bioensayo de toxicidad de los extractos con *Artemia sp.* pasadas 24 horas. GL= grados de libertad; valor de  $p \leq 0,05$  representa diferencias significativas.

	Suma de cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
<b>Concentración</b>	892	5	178,4	4,32	0,001
<b>Extracto</b>	1961	7	280,2	6,78	<,001
<b>Concentración*Extracto</b>	1911	35	54,6	1,32	0,146
<b>Residuos</b>	3969	96	41,3		

La figura 6 muestra el % de mortalidad de las artemias al finalizar el periodo de exposición del experimento, 48 horas. En este caso, a concentraciones elevadas (100 y 50 µL/mL), se observa una elevada tasa de mortalidad generada por los extractos acuosos (H<sub>2</sub>O1 H<sub>2</sub>O2 y H<sub>2</sub>O3) y el extracto en metanol. En la concentración de 100 µL/mL los extractos H<sub>2</sub>O1, H<sub>2</sub>O2, H<sub>2</sub>O3 y MeOH presentaron una mortalidad del 28,0%, 32,4%, 34,5% y 33,7%, respectivamente, mientras que, en 50 µL/mL sus mortalidades fueron de 22,4%, 25,4%, 18,6% y 20,2%,

respectivamente. Sin embargo, el resto de los extractos produjeron una menor tasa de toxicidad en comparación a las primeras 24 horas, con una mortalidad por debajo de 8,1%. En el bioensayo de toxicidad de los extractos con *Artemia sp.* de 48 horas los extractos de *C. tenuispina* que más toxicidad produjeron fueron los extractos acuosos y el extracto en metanol. Mientras que, con 24 horas los extractos que más mortalidad presentaron fueron los acuosos. En la tabla 6 están descritos los resultados del análisis estadístico ANOVA de dos factores (extracto y concentración) empleados para el tratamiento de los datos obtenidos en este experimento.



**Figura 6.** Porcentaje (%) de mortalidad de *Artemia sp.* en el bioensayo de toxicidad de los extractos con artemias pasadas 48 horas con los extractos orgánicos y acuosos, (MeOH, DCM, Hex, H<sub>2</sub>O1, H<sub>2</sub>O2, H<sub>2</sub>O3) de *Coscinasterias tenuispina* en las diferentes concentraciones (100 µL/mL, 50 µL/mL, 25 µL/mL, 12,5 µL/mL, 6,25 µL/mL, 3,75 µL/mL), el disolvente DMSO (Blanco) y el Control (agua de mar).

**Tabla 6.** Resultados del análisis estadístico ANOVA de 2 factores (F) realizado en el bioensayo de toxicidad de los extractos con *Artemia sp.* pasadas 48 horas. GL= grados de libertad; valor de  $p \leq 0,05$  representa diferencias significativas.

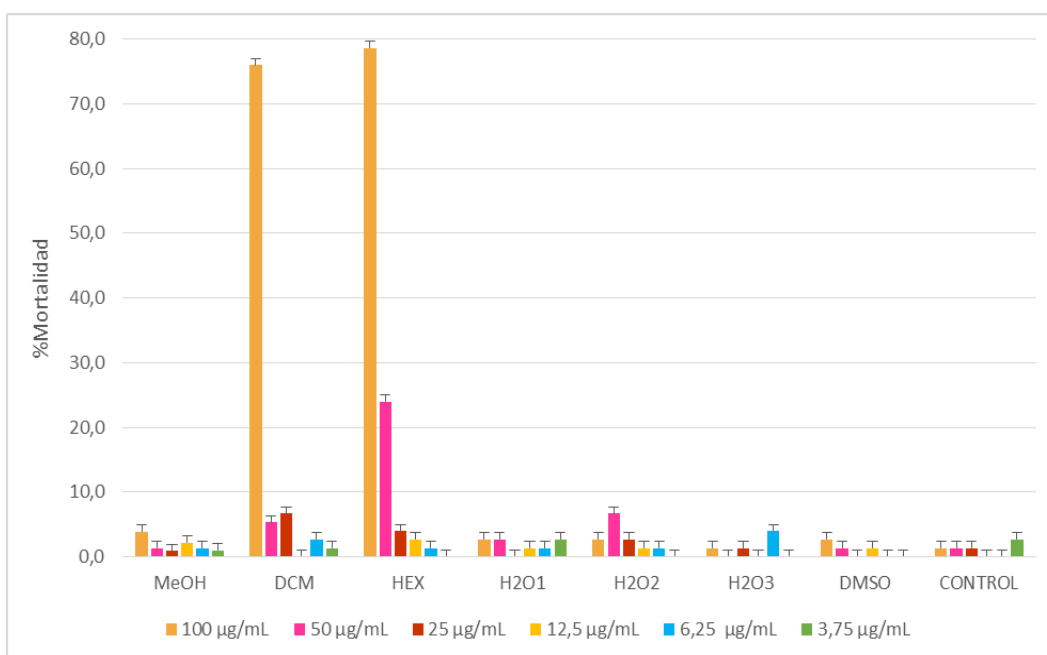
	Suma de cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
<b>Concentración</b>	3731	5	746,3	20,03	<,001
<b>Extracto</b>	5439	7	777,0	20,85	<,001
<b>Concentración*Extracto</b>	5242	35	149,8	4,02	<,001
<b>Residuos</b>	3577	96	37,3		

#### 4.3.4 Bioensayo de toxicidad con los extractos de *Coscinasterias tenuispina* en rotíferos

En el bioensayo con *Brachionus plicatilis* se añadieron aproximadamente 625 rotíferos

por pocillo con un periodo máximo de exposición de 48 horas. Transcurridas las primeras 24 horas se determinó el % de mortalidad, los resultados se pueden observar en la figura 7.

Los extractos de *C. tenuispina* en diclorometano (DCM) y hexano (HEX) a concentraciones elevadas (100 µL/mL) fueron significativamente más tóxicos para *Brachionus plicatilis*, produciendo una mortalidad del 76% y 78%, respectivamente. En todas las concentraciones los demás extractos presentaron una baja toxicidad, con menos del 10% de mortalidad. Salvo en el extracto hexánico, que, en la concentración de 50 µL/mL, provocó una mortalidad del 24%. En la tabla 7 están descritos los resultados del análisis estadístico ANOVA de dos factores (extracto y concentración) empleados para el tratamiento de los datos obtenidos en este experimento.

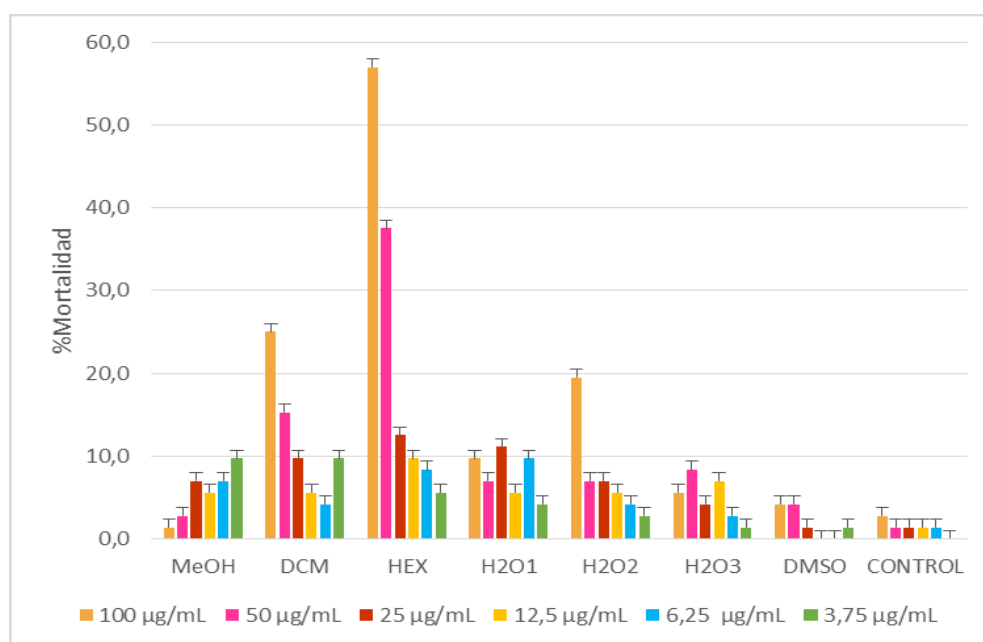


**Figura 7.** Porcentaje (%) de mortalidad de *Brachionus plicatilis* en el bioensayo de toxicidad de los extractos con rotífero pasadas 24 horas con los extractos orgánicos y acuosos, (MeOH, DCM, Hex, H<sub>2</sub>O<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) de *Coscinasterias tenuispina* en las diferentes concentraciones (100 µL/mL, 50 µL/mL, 25 µL/mL, 12,5 µL/mL, 6,25 µL/mL, 3,75 µL/mL), el disolvente DMSO (Blanco) y el Control (agua de mar).

**Tabla 7.** Resultados del análisis estadístico ANOVA de 2 factores (F) realizado en el bioensayo de toxicidad de los extractos con rotíferos *Brachionus plicatilis* pasadas 24 horas. GL= grados de libertad; valor de  $p \leq 0,05$  representa diferencias significativas

	Suma de cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
<b>Concentración</b>	7167	5	1433,3	43,4	<,001
<b>Extracto</b>	7608	7	1086,8	32,9	<,001
<b>Concentración*Extracto</b>	19767	35	17,1		<,001
<b>Residuos</b>	3170	96	33,0		





**Figura 8.** Porcentaje (%) de mortalidad de *Brachionus plicatilis* en el bioensayo de toxicidad de los extractos rotífero pasadas 48 horas con los extractos orgánicos y acuosos, (MeOH, DCM, Hex, H<sub>2</sub>O<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) de *Coscinasterias tenuispina* en las diferentes concentraciones (100 µL/mL, 50 µL/mL, 25 µL/mL, 12,5 µL/mL, 6,25 µL/mL, 3,75 µL/mL), el disolvente DMSO (Blanco) y el Control (agua de mar).

**Tabla 8.** Resultados del análisis estadístico ANOVA de 2 factores (F) realizado el bioensayo de toxicidad de los extractos con rotíferos *Brachionus plicatilis* pasadas 48 horas. GL= grados de libertad; valor de  $p \leq 0,05$  representa diferencias significativas.

	Suma de cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	p
<b>Concentración</b>	2390	5	478,0	12,21	<,001
<b>Extracto</b>	5508	7	786,9	20,09	<,001
<b>Concentración*Extracto</b>	6039	35	172,5	4,41	<,001
<b>Residuos</b>	3759	96	39,2		

Por otro lado, en la figura 8, se presentan los resultados de mortalidad de los rotíferos frente a los extractos de *C. tenuispina* transcurridas 48 horas de experimento. Los extractos en hexano y diclorometano a concentraciones elevadas (100 y 50 µL/mL) fueron significativamente tóxicos para *Brachionus plicatilis*, produciendo una mortalidad de 56,9%, 37,5%, 25% y 15,3%, respectivamente. El extracto más tóxico continuó siendo el extracto en hexano. El extracto acuoso (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en comparación al primer periodo de 24 horas, aumentó su tasa de mortalidad a 19,4% en 100 µL/mL. El resto de los extractos en todas las concentraciones

presentaron una baja toxicidad, menor que 13% de mortalidad. En la tabla 8 están descritos los resultados del análisis estadístico ANOVA de dos factores (extracto y concentración) empleados para el tratamiento de los datos obtenidos en este experimento.

El efecto de los extractos de *C. tenuispina* en rotíferos presentan el mismo comportamiento en 24h y 48h, demostrando que las sustancias de media polaridad (extracto DCM) y apolares (extracto HEX) producidas por *C. tenuispina* son tóxicas para los rotíferos, ya en las primeras 24h de exposición.

## 5. Discusión

Los organismos acuáticos poseen la capacidad de producir y detectar una variación infinita de estructuras moleculares, desde pequeños metabolitos hasta grandes complejos proteicos, conocidas como “infoquímicos” o semioquímicos (kairomonas, alomonas, feromonas y hormonas). Esto sucede con el fin de encontrar diferentes hábitats y parejas, elegir alimentos y evitar peligros como la depredación. Estas señales se pueden liberar a través de una lesión, excreción, etc (Kamio, et al. 2022). Las estrellas de mar se caracterizan por presentar como módulo sensorial primario la quimiosensación, esta, participa en eventos clave en la vida de los asteroideos (Motti, et al. 2018). Estas señales químicas pueden transmitirse a través de cascadas tróficas y otras interacciones indirectas a grandes distancias, y perdurar en el tiempo desde minutos hasta días (Zimmer y Butman 2000).

En este trabajo se observó que la estrella de mar *C. tenuispina* produce metabolitos secundarios que son exudados al agua que, a su vez, poseen efectos alelopáticos y tóxicos para ciertos organismos marinos. En el experimento de alelopatía de los metabolitos de *C. tenuispina* exudados en agua con larvas de pulpo se observó que, los tratamientos Presencia y Macerado produjeron una elevada mortalidad en comparación al Control, con sólo el 1%. Esto, como se mencionó en los resultados (sección 4.1), demuestra que la especie *C. tenuispina* libera sustancias con efecto alelopático tóxicos para las larvas de pulpo, que detecta estos semioquímicos exógenos a través de mecanismos neurobiológicos dentro de su sistema quimiosensorial. Los pulpos son animales que poseen una gran cantidad de lóbulos en su sistema nervioso dedicados a decodificar e integrar diferentes percepciones táctiles, visuales y quimiosensoriales (Maselli, et al. 2020).

De acuerdo con el bioensayo de toxicidad de los extractos realizado con paralarvas de

*O. vulgaris*, los extractos de *C. tenuispina* en diclorometano (DCM) y hexano (HEX), a pesar de presentar una baja toxicidad con respecto a los demás extractos, en las máximas concentraciones ensayadas (100 y 50 µL/mL) provocaron una elevada tasa de mortalidad. Sin embargo, los extractos metanólicos y acuosos fueron los más tóxicos para las larvas de pulpo, generando % de mortalidad comparables a la registrada en el experimento con las sustancias exudadas. Esto puede deberse a que los pulpos durante sus primeras fases de desarrollo son muy vulnerables y sensibles, además de necesitar requerimientos estrictos para su adecuado crecimiento (Mora, 2022). El extracto metanólico y los extractos acuosos poseen sustancias con características polares, además, el extracto del agua también presenta proteínas y sales (Motti, 2018). Por esta característica química, se podría inferir que los metabolitos presentes en estos extractos podrían corresponder a saponinas, dado su carácter anfipático (Magedans, et al. 2021), lo que les permite disolverse en sustancias polares. Por lo tanto, se podría concluir que, los metabolitos alelopáticos tóxicos para las larvas del pulpo *O. vulgaris*, exudados por *C. tenuispina* en el agua de mar, podrían tratarse de los mismos presentes en los extractos acuosos y metanólico.

Los asteroideos producen derivados de esteroides, ácidos grasos, ceramidas y algunos alcaloides para defenderse o comunicarse (Kamyab, et al. 2019). Dentro de los esteroides, destacan las saponinas que son glucósidos esteroides o triterpenoides. Podemos diferenciar tres grupos de saponinas: la asterosaponina, glucósidos polihidroxilados y saponinas macrocíclicos (Demeyer et al., 2014; Kamyab, et al. 2019). Las saponinas son una clase de metabolitos secundarios de las estrellas de mar que se caracterizan por influir en sus procesos fisiológicos e inmunológicos, participando en funciones reproductivas, de defensa y digestivas (Kamyab, et al. 2019). Además, estos compuestos presentan un amplio espectro de actividades biológicas como: antifúngica, citotóxica, hemolítica, antiviral, antitumoral e inmunomodulatoria (Maier, 2008). Las saponinas son capaces de generar complejos con esteroides, produciendo alteración en las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares debido a formación de canales iónicos y poros de mayor tamaño (Maier, 2008). Este puede ser el principal mecanismo de acción responsable por la toxicidad de estos metabolitos.

En relación al bioensayo de toxicidad de los extractos con artemias, estos organismos son un alimento utilizado en la acuicultura por su fácil cultivo y capacidad de manipular, además de ofrecer resultados confiables en cuanto a la alternativa poco costosa, rápida y sencilla (Sánchez y Neira, 2005). En cultivos de larvas de pulpo a grandes volúmenes, se necesita un suministro diario de miles de presas vivas. Y en ese contexto, las artemias a día de hoy son el único alimento sin problemas de disponibilidad y bien aceptada por las larvas desde

su estado de nauplio hasta la fase adulta (Moxica, et al. 2002). Como organismo modelo en ensayo de toxicidad, *Artemia sp.* es considerado un crustáceo muy sensible a compuestos químicos bioactivos (González, et al. 2003), que le hace un buen organismo modelo para detección de sustancia tóxicas. Por otro lado, los disolventes etanol y metanol, que se utilizan como agentes de disolución en la prueba de letalidad de *Artemia salina* con el objeto de evaluar las propiedades farmacológicas de los productos naturales, a elevadas concentraciones son tóxicos para este organismo (Geetha et al. 2013). A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se puede observar que los extractos de *C. tenuispina* más tóxicos para *Artemia* son los mismos que para las larvas de pulpo (extractos acuosos y extracto metanólico). Y en un contexto de acuicultura de estas especies (*O. vulgaris*: depredador y *Artemia sp.* presa) ambas serían afectadas por las sustancias polares de *C. tenuispina*.

Para finalizar, en el bioensayo de toxicidad de los extractos realizado con *Brachionus plicatilis*, con los resultados obtenidos (en la sección de resultados 4.3.4) pasadas 24 y 48 horas, los extractos que más mortalidad produjeron a los rotíferos fueron con hexano (HEX) y diclorometano (DCM), este último en menor proporción. Debido al proceso de extracción empleado estos extractos orgánicos están relativamente enriquecidos en moléculas más pequeñas, de caracteres moderadamente polares y apolares. Por lo que, distinto de los demás organismos ensayados, los rotíferos son más sensibles a las sustancias apolar y de media polaridad producidas por *C. tenuispina*.

En la investigación biológica, se ha evidenciado que es crucial emplear diferentes especies en estudios de toxicidad, tal como se ha hecho en este caso con *O. vulgaris*, *Artemia sp.* y *Brachionus plicatilis*. Principalmente en el contexto de interacciones ecológicas de comunidades artificiales en entornos cerrados o sistemas semicerrados de especies de interés en la acuicultura marina. Esto se debe a que los organismos pueden presentar diferentes respuestas ante los mismos metabolitos, influenciadas por factores como la variabilidad en la composición química de los extractos (orgánicos y acuosos) y las diferencias en los mecanismos de defensa. De este modo, el uso de múltiples especies puede brindar una visión más completa del grado de toxicidad de las sustancias provenientes de *C. tenuispina* en el medio marino. Una vez que muchos semioquímicos de asteroides permanecen ocultos dentro de mezclas complejas de sustancias, por lo que descifrar los componentes bioactivos sigue siendo un desafío importante en la investigación futura (Saha, 2019). Dicha investigación facilitaría la capacidad para abordar mejor los problemas ecológicos que se ven directamente afectados por este grupo de animales y explotar esta información para beneficiar el crecimiento azul (Kamio, 2022).

## 6. Conclusiones

1. La estrella de mar, *C. tenuispina*, exuda metabolitos en el agua con efecto alelopático para las larvas de *O. vulgaris*.
2. Los metabolitos polares extraídos de *C. tenuispina* (extracto acuoso y extracto metanólico) fueron tóxicos para larvas de *O. vulgaris* y *Artemia sp.* mientras que los metabolitos apolares y de media polaridad (extracto en hexano y extracto en diclorometano) afectaron a *B. plicatilis*.
3. Los metabolitos de *C. tenuispina* resultaron tóxicos en todos los organismos estudiados durante las primeras 24h de contacto.
4. Las sustancias alelopáticas tóxicas para las larvas de *O. vulgaris* exudadas al agua por la estrella de mar pueden ser las mismas presentes en los extractos acuosos y metanólico.

En relación a los objetivos trazados, este trabajo ha dado pasos claves en el establecimiento de un protocolo de estudio de los efectos de los metabolitos de *C. tenuispina* sobre el desarrollo de especies de interés en acuicultura. A partir de los resultados preliminares obtenidos se continuarán los estudios para optimizar los ensayos de toxicidad y obtener la concentración letal 50 (CL50), además de ampliar el estudio de toxicidad a otras especies de interés en la acuicultura como el misidaceo *Neomysis sp.*, el anfípodo *Elasmopus rapax* y zoea del cangrejo *Grapsus grapsus*. A parte, también se seguirá con la determinación del perfil químico de los extractos de *C. tenuispina*, aislamiento e identificación de los metabolitos tóxicos producidos y exudados en agua.

## 6. Conclusions

1. The starfish, *C. tenuispina*, exudes metabolites into the water that exhibit high toxicity to *O. vulgaris* larvae.
2. The polar metabolites extracted from *C. tenuispina* (aqueous extract and methanolic extract) were toxic to *O. vulgaris* and *Artemia sp* larvae, while the apolar and medium polar metabolites (hexane extract and dichloromethane extract) affected *B. plicatilis*.
3. The metabolites of *C. tenuispina* were toxic to all studied organisms during the first 24 hours of contact.

4. The toxic substances for *O. vulgaris* larvae exuded into the water by the starfish may be the same as those present in the aqueous and methanolic extracts.

In relation to the outlined objectives, this work has taken key steps in establishing a protocol for studying the effects of *C. tenuispina* metabolites on the development of aquaculture species of interest. Based on the preliminary results obtained, studies will continue to optimize toxicity assays and obtain the lethal concentration 50 (LC50), as well as expanding the toxicity study to other aquaculture species of interest such as the mysid *Neomysis sp.*, the amphipod *Elasmopus rapax*, and the zoea of the crab *Grapsus grapsus*. Additionally, the determination of the chemical profile of *C. tenuispina* extracts, isolation, and identification of the toxic metabolites produced and exuded in water will also be continued.

## 7. Bibliografía

- Aguilar-Perera, A.** (2019). El océano y sus recursos naturales bajo amenaza ambiental. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 12(1).
- Alves, L.S.S., Pereira, A., & Ventura, C.** (2002). Sexual and asexual reproduction of *Coscinasterias tenuispina* (Echinodermata: Asteroidea) from Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Biology*, 140, 95-101. <https://doi.org/10.1007/s002270100663>
- Barreto Pérez, L.** (2019). Forcipulátidos en las Islas Canarias. *Biología y ecología de la estrella de mar Coscinasterias tenuispina*.
- Bordbar, S., Anwar, F., & Saari, N.** (2011). High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods—A Review. *Mar Drugs*, 9(10), 1761-1805. <https://doi.org/10.3390/md9101761>
- Brönmark, C., & Hansson, L. A.** (2000). Chemical communication in aquatic systems: An introduction. *Oikos*, 88(1), 103-109. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.880113.x>
- Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., & Prinsep, M. R.** (2023). Marine natural products. *Natural Product Reports*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1039/d0np90043j>
- Cortes Rivera, Y., Hernandez, R.I., Del Angel, P.S.M., Zarza Meza, E., & Cuervo Gonzalez, R.** (2016). Potencial regenerativo de la estrella de mar *Linckia guildingui*. *Hidrobiología*, 26(1), 103-108.
- Demeyer, M., De Winter, J., Caulier, G., Eeckhaut, I., Flammang, P., & Gerbaux, P.** (2014). Molecular diversity and body distribution of saponins in the sea star *Asterias rubens* by mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 168, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.11.001>
- Dong, G., Xu, T., Yang, B., Lin, X., Zhou, X., Yang, X., Liu, Y.** (2011). Chemical constituents and bioactivities of starfish: a review. *Chemistry & biodiversity*, 8(4), 740-754.
- Ergüden, D., & Turan, C.** (2017). The occurrence of blue spiny starfish *Coscinasterias tenuispina* (Lamarck, 1816) in Mersin Bay (NE Mediterranean, Turkey). *Mediterranean Marine Science*, 18(3), 1-23.
- Fiorito, G., Affuso, A., Basil, J., Cole, A., de Girolamo, P., D'Angelo, L., Dickel, L., Gestal, C., Grasso, F., Kuba, M., Mark, F., Melillo, D., Osorio, D., Perkins, K., Ponte, G., Shashar, N., Smith, D., Smith, J., & Andrews, P. L.** (2015). Guidelines for the care and welfare of cephalopods in research -A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. *Lab. Anim.*, 49(1), 1-90. <https://doi.org/10.1177/0023677215580006>
- García-Cisneros, A., Pérez-Portela, R., Wangenstein, O. S., Campos-Canet, M., & Palacín, C.** (2017).

- Hope springs eternal in the starfish gonad: preserved potential for sexual reproduction in a single-clone population of a fissiparous starfish. *Hydrobiologia*, 787(1), 291–305. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2971-8>
- Geethaa, S., Thavamany, P. J., Chiew, S. P., & Thong, O. M.** (2013). Interference from ordinarily used solvents in the outcomes of *Artemia salina* lethality test. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(4), 179-182. <https://doi.org/10.4103/2231-4040>.
- González, A. M., Presa, M. F., & Lurá, M. C.** (2003). Ensayo de toxicidad a *Artemia salina*: puesta a punto y aplicación a micotoxina. *Revista FABICIB*, 7, 117-122
- Hay, M. E.** (2009). Marine chemical ecology: Chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, 1, 193-212. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163708>.
- Iglesias, J., & Fuentes, L.** (2014). *Octopus vulgaris*. Paralarval culture (pp. 427-450). In J. Iglesias, L. Fuentes, & R. Villanueva (Eds.), *Cephalopod Culture*. Springer. Dordrecht.
- Kamio, M., Yambe, H., & Fusetani, N.** (2022). Chemical signals for intra-specific chemical communication and inter-specific interactions in aquatic environments: Applications for fishing and aquaculture. *Fisheries Science*, 88(2), 203-239. <https://doi.org/10.1007/s12562-021-01563-0>
- Kamyab, E., Kellermann, M. Y., Kunzmann, A., & Schupp, P. J.** (2020). Chemical Biodiversity and Bioactivities of Saponins in Echinodermata with an Emphasis on Sea Cucumbers (Holothuroidea). In S. Jungblut, V. Liebich, & M. Bode-Dalby (Eds.), *YOUMARES 9 - The Oceans: Our Research, Our Future* (pp. 205-222). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-20389-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-20389-4_7)
- Lindsey, J., & Lasker, R.** (1974). Chemical signals in the sea: Marine allelochemicals and evolution. *Fishery Bulletin*, 72, 1-11.
- Liu, L., Zheng, Y.-Y., Shao, C.-L., & Wang, C.-Y.** (2019). Metabolites from marine invertebrates and their symbiotic microorganisms: Molecular diversity discovery, mining, and application. *Marine Life Science & Technology*, 1, 60-94. <https://doi.org/10.1007/s42995-019-00021-2>.
- Magedans, Y.V.S., Phillips, M.A. & Fett-Neto, A.G.** (2021). Production of plant bioactive triterpenoid saponins: from metabolites to genes and back. *Phytochemistry Reviews*, 20, 461-482. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09720-4>
- Maier, M. S.** (2005). Metabolitos secundarios bioactivos de organismos marinos pertenecientes al phylum Echinodermata. *Revista de la Sociedad Química de México*, 49(4), 223-232.
- Maier, M. S.** (2008). Biological activities of sulfated glycosides from echinoderms. *Studies in Natural Products Chemistry*, 35, 311-354. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(08\)80008-7](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(08)80008-7).
- Maselli, V., Al-Soudy, A.-S., Buglione, M., Aria, M., Polese, G., & Di Cosmo, A.** (2020). Sensorial Hierarchy in *Octopus vulgaris*'s Food Choice: Chemical vs. Visual. *Animals*, 10(3), 457. <https://doi.org/10.3390/ani10030457>
- Mora Martin, A.** (2020). Efecto del tipo de procesado de microalgas en la capacidad antioxidante y composición lipídica de presas vivas (rotífero y *Artemia*)
- Motti, C. A., Bose, U., Roberts, R. E., et al.** (2018). Chemical ecology of chemosensation in Asteroidea: insights into pest management strategies. *Journal of Chemical Ecology*, 44, 147-177. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0926-4>
- Moxica, C., Linares, F., Otero, J.J., Iglesias, J., & Sánchez, F.J.** (2002). Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, en tanques de 9 m<sup>3</sup>. *Bol. Inst. Esp. Oceanografía*, 18(1-4), 31-36.
- Mutschke, E., & Mah, C.** (2009). Asteroidea-Estrellas de Mar. *Fauna Marina Bentónica de la Patagonia Chilena, Nature in Focus*.
- Pawlik, J. R., Amsler, C. D., Ritson-Williams, R., McClintock, J. B., Baker, B. J., & Paul, V. J.** (2013). Marine chemical ecology: a science born of scuba. In *Research and Discoveries: The Revolution of Science through Scuba*. Smithsonian Institution Scholarly Press.
- Pieroni, E. M., Sykes, A. V., Galligioni, V., Estefanell, J., Hetherington, S., Brocca, M., Correia, J., Ferreira, A., & Fiorito, G.** (2022). Review on the methods of capture and transport of cephalopods for scientific purposes. Outcomes of FELASA Working Group ‘Capture and Transport of Cephalopods’. *Lab. Anim.*, 0(0), 1-12.

- Ponte, G., Rumbedakis, K., Galligioni, V., Dickel, L., Bellanger, C., Pereira, J., Vidal, E. A. G., Grigoriou, P., Alleva, E., Santucci, D., Gili, C., Botta, G., Imperadore, P., Tarallo, A., Juergens, L., Northrup, E., Anderson, D., Aricò, A., De Luca, M., Pieroni, E. M., & Fiorito, G.** (2022). General and species-specific recommendations for minimal requirements for the use of cephalopods in scientific research. *Laboratory Animals*, 57(1). <https://doi.org/10.1177/00236772221111261>
- Popov, R. S., Ivanchina, N. V., & Dmitrenok, P. S.** (2022). Application of MS-Based Metabolomic Approaches in Analysis of Starfish and Sea Cucumber Bioactive Compounds. *Mar. Drugs*, 20(5), 320. <https://doi.org/10.3390>
- Reina Hernández, E.M.** (2022). La estrella de mar *Coscinasterias tenuispina* (Lamarck, 1816) como suplemento alimenticio de especies marinas y como posible candidata para acuicultura multitrófica integrada.
- Reis, D. B., Acosta, N. G., Almansa, E., Navarro, J. C., Tocher, D. R., Andrade, J. P., Sykes, A. V., & Rodríguez, C.** (2017). Comparative study on fatty acid metabolism of early stages of two crustacean species: *Artemia* sp. metanauplii and *Grapsus adscensionis* zoeae, as live prey for marine animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 204, 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.11.002>
- Saha, M., Berdalet, E., Carotenuto, Y., Fink, P., Harder, T., John, U., ... & Steinke, M.** (2019). Using chemical language to shape future marine health. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 17(9), 530-537. <https://doi.org/10.1002/fee.2111>.
- Sánchez, L. & Neira, A.** (2005). Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* L y *Psidium guineense* Sw. [General lethality bioassay in *Artemia salina* to the fractions of the ethanolic extract of *Psidium guajava* L and *Psidium guineense* Sw.]. *Cultura Científica*, Fundación Universitaria Juan de Castellanos.
- Seto, Y., Komatsu, M., Wakabayashi, K., & Fujita, D.** (2013). Asexual reproduction of *Coscinasterias acutispina* (Stimpson, 1862) in tank culture. *Cahiers de Biologie Marine*, 54, 641-647.
- Sonnenholzner-Varas, J.-I.** (2021). ¿Hacia dónde va la acuicultura de equinodermos en América Latina? Potencial, retos y oportunidades. *Revista de Biología Tropical*, 69, 514-549. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69isuppl.1.46393>
- Sorgeloos, P., Dhert, P., & Candreva, P.** (2001). Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200, 147-159. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00698-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00698-6)
- Sterling, K. A., & Shuster, S. M.** (2011). Rates of fission in *Aquilonastra corallicola* Marsh (Echinodermata: Asterozoa) as affected by population density. *Invertebrate Reproduction and Development*, 55(1), 1-5. <https://doi.org/10.1080/07924259.2010.548631> /md20050320.
- Thao NP, Luyen BT, Koo JE, Kim S, Koh YS, Cuong NX, Nam NH, Van Kiem P, Kim YH, Van Minh C.** (2015). Anti-inflammatory components of the Vietnamese starfish *Protoreaster nodosus*. *Biological Research*, 48(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0002-2>
- Thushari, G. G. N., & Senevirathna, J. D. M.** (2020). Plastic pollution in the marine environment. *Heliyon*, 6(8), e04709. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04709>
- Vicens-Vicens, A.** (2009). Capacidad de *Coscinasterias tenuispina* (Echinodermata: Asterozoa) para distinguir tonos en el espectro visible reiterando comportamientos aprendidos. *Anales Universitarios de Etología*, 3, 52-57.
- Vos, M., Vet, L. E., Wäckers, F. L., Middelburg, J. J., van der Putten, W. H., Mooij, W. M., ... & Van Donk, E.** (2006). Infochemicals structure marine, terrestrial and freshwater food webs: Implications for ecological informatics. *Ecological Informatics*, 1, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2005.10.004>.
- Williams, D. H., Stone, M. J., Hauck, P. R., & Rahman, S. K.** (1989). Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?. *Journal of Natural Products*, 52(6), 1189-1208.
- WoRMS** (2023) World Register of Marine Species. Retrieved from <https://www.marinespecies.org> at VLIZ.
- Zimmer RK, Butman CA** (2000). Chemical signaling processes in the marine environment. *Biological Bulletin*, 198(2), 168-187. doi: 10.2307/1542522.